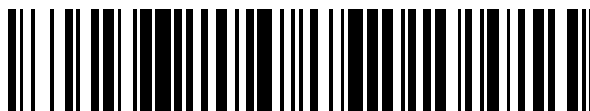


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 079**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6886** (2008.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/EP2015/062331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15726957 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3152577**

54 Título: **Significación de la heterogeneidad de HER2 intratumoral en el cáncer de mama y usos de la misma**

30 Prioridad:

**06.06.2014 US 201462009057 P**

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

**30.10.2018**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)  
1910 Innovation Park Drive  
Tucson, AZ 85755, US**

72 Inventor/es:

**NITTA, HIRO;  
PADILLA, MARY T.;  
RANGER-MOORE, JAMES;  
DENNIS, ESLIE;  
KUROZUMI, SASAGU y  
KUROSUMI, MASAFUMI**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 688 079 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Significación de la heterogeneidad de HER2 intratumoral en el cáncer de mama y usos de la misma

### 5 **CAMPO**

Esta divulgación se refiere a procedimientos de medición de la heterogeneidad tisular y uso de la misma como herramienta pronóstica y predictiva en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama.

### 10 **ANTECEDENTES**

El cáncer de mama representa aproximadamente un 23 % de todos los cánceres en todo el mundo y es responsable de cientos de miles de decesos cada año. Los cánceres de mama varían en su respuesta a diferentes tratamientos y es importante seleccionar un tratamiento apropiado para cada enfermo. El estado del receptor es un sistema de clasificación común que se usa para seleccionar tratamientos para un enfermo con cáncer de mama. Los tumores de mama pueden tener (dan positivo para) o carecer de (dan negativo para) proteína del receptor estrogénico (RE), proteína HER2 (también conocida como ErbB2) y/o proteína del receptor progesterónico (RP). Los tumores de mama también se examinan de manera rutinaria para determinar la amplificación del gen HER2, como otra medida de si el tumor da positivo o negativo para HER2. Algunos tumores de mama dan negativo para los tres marcadores y se denominan tumores "triple negativos".

Los tumores positivos para el receptor estrogénico (RE) y/o el receptor progesterónico (RP) se tratan típicamente con tratamiento de bloqueo hormonal (tal como tamoxifeno), mientras que los tumores positivos para HER2 se tratan con medicamentos dirigidos a HER2 tales como trastuzumab o lapatinib. Aunque los procedimientos actuales de clasificación del cáncer de mama y el tratamiento selectivo han mejorado las respuestas del enfermo, muchos tumores positivos para HER2 no reaccionan a, o adquieren resistencia a, los tratamientos dirigidos a HER2. Los procedimientos actuales de detección de HER2 pueden producir resultados positivos falsos, debido en parte a la heterogeneidad del tumor. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de mejorar los procedimientos de detección molecular actuales para clasificar de forma rápida y exacta los tumores de mama y seleccionar los tratamientos apropiados en el consultorio.

La calificación de HER2, ya sea la amplificación del gen HER2 o la sobreexpresión de la proteína HER2 sola, se ha usado como una guía para los tratamientos dirigidos a HER2. Nitta *et al.* (Diagn Pathol. 7:60, 2012) describen un ensayo de gen-proteína para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en cortes histológicos de cáncer de mama incluidos en parafina y fijados con formol. Nishida *et al.* (Mod Pathol. 27 (supl. 2):195A, 2014) investigan la heterogeneidad intratumoral en el cáncer gástrico mediante el análisis simultáneo de la sobreexpresión de proteína y la amplificación del gen usando un ensayo de gen-proteína. Lee *et al.* (Eur J de Cancer. 49, 1448, 2013) evalúan la significación clínica de la heterogeneidad de HER2 intratumoral en el cáncer gástrico. Hofmann *et al.* (Histopathol. 52:797, 2008) evalúan un sistema de calificación de HER2 para el cáncer gástrico. Si bien estos ensayos han sido muy beneficiosos para los enfermos con cáncer de mama, continuamente se buscan nuevos ensayos que puedan estratificar o predecir adicionalmente la reacción de un paciente a un tratamiento.

### 45 **SUMARIO**

En modos de realización ilustrativos, se proporciona un procedimiento para predecir el grado de respuesta a un tratamiento dirigido a HER2 evaluando la heterogeneidad de HER2 en un tumor, comprendiendo el procedimiento: poner en contacto una muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína HER2 y detectar la proteína HER2 en la muestra, poner en contacto la muestra de tumor con una sonda de ácido nucleico que se una específicamente al ADN genómico de HER2 y detectar el estado de amplificación del gen HER2 en la muestra, y calificar a la proteína HER2 (IHQ) y al gen HER2 (DISH). La calificación se clasifica como: grupo A para muestras que presentan IHQ 3+ y DISH+, grupo B para muestras que presentan IHQ 3+ y DISH-, grupo C para muestras que presentan IHQ 2+ y DISH+, grupo D para muestras que presentan IHQ 2+ y DISH-, grupo E para muestras que presentan IHQ 0, 1+ y DISH+, y grupo F para muestras que presentan IHQ 0, 1+ y DISH-. El procedimiento comprende además predecir que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el tumor revela un primer foco que tiene una primera calificación que es del grupo F y un segundo foco que tiene una segunda calificación seleccionada del grupo A al grupo E.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende además someter a ensayo una segunda muestra de tumor para determinar el receptor estrogénico (RE) y el receptor progesterónico (RP), en el que la etapa de predecir que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 comprende predecir que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC). En otras palabras, se predice que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es TNBC. En todavía otro modo de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor estrogénico (RE) y detectar la proteína del RE en la muestra, poner en contacto la muestra de

tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor progesterónico (RP) y detectar la proteína del RP en la muestra. El procedimiento incluye además predecir que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC). En otro modo de realización, el tratamiento dirigido a HER-2 se selecciona del grupo que consiste en trastuzumab, trastuzumab emtansina, pertuzumab, neratinib y lapatinib.

En modos de realización ilustrativos, se proporciona un procedimiento de calificación de una muestra de tumor, comprendiendo el procedimiento: poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína HER2 y detectar la proteína HER2 en la muestra, poner en contacto la muestra de tumor con una sonda de ácido nucleico que se una específicamente al ADN genómico de HER2 y detectar el estado de amplificación del gen HER2 en la muestra, calificando a la proteína HER2 (IHQ) y al gen HER2 (DISH) de acuerdo con los grupos A-F mencionados anteriormente. El procedimiento comprende además calificar a la muestra de tumor como heterogénea si el tumor revela un primer foco que es del grupo F y un segundo foco que tiene una segunda calificación seleccionada del grupo A al grupo E.

En otro modo de realización, el procedimiento comprende además pronosticar un cociente de riesgos instantáneos mayor que 5 si la muestra se califica como heterogénea. En todavía otro modo de realización, el procedimiento comprende además someter a ensayo una segunda muestra de tumor para determinar el receptor estrogénico (RE) y el receptor progesterónico (RP), en el que se predice que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC). En todavía otro modo de realización, el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor estrogénico (RE) y detectar la proteína del RE en la muestra; poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor progesterónico (RP) y detectar la proteína del RP en la muestra, en el que se predice que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC). En un modo de realización, el procedimiento comprende además pronosticar una calificación de supervivencia significativamente peor en comparación con una calificación de no heterogéneo (SSR:  $p=0,0176$ ; SEC:  $p=0,0199$ ) si la muestra se califica como heterogénea.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las siguientes figuras se presentan a color.

Las **FIGS. 1A y B** son un par de imágenes de una muestra de tejido de tumor de mama teñida para el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y la proteína del RE (color rojo) con un aumento de 4X (FIG. 1A) y un aumento de 60X (FIG. 1B). La muestra está amplificada para el gen HER2, da positivo para la proteína HER2 y positivo para la proteína del RE. Sin embargo, algunas células (encerradas en círculos) dan negativo para la proteína HER2, aunque dan positivo para la proteína del RE y tienen amplificación del gen HER2.

Las **FIGS. 2A y B** son un par de imágenes de una muestra de tejido de tumor de mama teñida para el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y la proteína del RE (color rojo) con un aumento de 4X (FIG. 2A) y un aumento de 60X (FIG. 2B). La muestra ha amplificado el gen HER2 y da positivo para la proteína del RE, pero da negativo para la proteína HER2, como se evidencia por la tinción marrón tenue o ausente.

Las **FIGS. 3A y B** son un par de imágenes de una muestra de tejido de tumor de mama teñida para el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y la proteína del RE (color rojo) con un aumento de 4X (FIG. 3A) y un aumento de 60X (FIG. 3B). La muestra la amplificación del gen HER2 y da positivo para la proteína HER2, pero da negativo para el RE, como se evidencia por la falta de tinción roja. La tinción roja en la FIG. 3B es la tinción de la proteína del RE en células de glándula mamaria normales en la muestra.

Las **FIGS. 4A-C** son una serie de imágenes que muestran IHQ de la proteína del RE con tinción con DAB iVIEW (FIG. 4A) o tinción con rojo ULTRA VIEW (FIG. 4B) e IHQ/ISH del gen y la proteína HER2 con tinción IHQ con rojo ULTRA VIEW (FIG. 4C) en una muestra de tejido mamario, con un aumento de 20X.

Las **FIGS. 5A-C** son una serie de imágenes que muestran IHQ de la proteína Ki67 con tinción con DAB iVIEW (FIG. 5A) o tinción con rojo ULTRAVIEW (FIG. 5B) e IHQ/ISH del gen y la proteína HER2 con tinción IHQ con rojo ULTRA VIEW (FIG. 5C) en una muestra de tejido mamario, con un aumento de 20X.

La **FIG. 6** es una imagen de detección ejemplar del gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y Ki67 (color rojo) en una muestra de tejido mamario.

Las **FIGS. 7A-D** son una serie de imágenes de tinción de la proteína HER2 (tinción marrón), el gen HER2 (puntos negros) y la proteína Ki67 (tinción roja) (FIGS. 7A y C) o la proteína HER2 (tinción marrón), el gen HER2 (puntos negros) y la proteína del RE (tinción roja) (FIGS. 7B y D) en una muestra de tejido mamario con un aumento de 20X (FIGS. 7A y B) o un aumento de 60X (FIGS. 7C y D).

Las **FIGS. 8A-C** son una serie de imágenes que muestran el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (tinción marrón) y la proteína del RE (tinción roja) en una muestra de tejido mamario ambiguo de HER2. La FIG. 8B muestra la muestra con un aumento de 10X. El área roja encerrada en recuadros en la FIG. 8B se muestra en la FIG. 8A con un aumento de 60X y el área azul encerrada en recuadros en la FIG. 8B se muestra en la FIG. 8C con un aumento de 60X.

Las **FIGS. 9A-C** son una serie de imágenes que muestran el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (tinción marrón) y la proteína del RE (tinción roja) en una muestra de tejido mamario positivo para HER2. La FIG. 9B muestra la muestra con un aumento de 10X. El área roja encerrada en recuadros en la FIG. 9B se muestra en la FIG. 9A con un aumento de 60X y el área azul encerrada en recuadros en la FIG. 9B se muestra en la FIG. 9C con un aumento de 60X.

Las **FIGS. 10A y B** son un par de imágenes que muestran la tinción de la proteína HER2 (marrón), la proteína del RE (violeta), el gen HER2 (manchas negras) y el ADN centromérico del cromosoma 17 (manchas rojas) en una muestra ejemplar de tejido mamario positivo para HER2/positivo para el RE con un aumento de 20X (FIG. 10A) y un aumento de 60X (FIG. 10B).

Las **FIGS. 11A y B** son un par de imágenes que muestran la tinción de la proteína HER2 (marrón), la proteína del RE (violeta), el gen HER2 (manchas negras) y el ADN centromérico del cromosoma 17 (manchas rojas) en una muestra ejemplar de tejido mamario negativo para HER2/positivo para el RE con un aumento de 20X (FIG. 11A) y con un aumento de 60X (FIG. 11B).

Las **FIGS. 12A-C** son tres microfotografías de un caso de displasia de cuello uterino en las que 12A usa un lavado riguroso de 68 °C, 12B usa un lavado riguroso de 72 °C y 12C usa un lavado riguroso de 76 °C.

Las **FIGS. 13A-C** muestran tres microfotografías de un tumor de xenoinjerto ZR-75-1 en las que 13A usa un lavado riguroso de 68 °C, 13B usa un lavado riguroso de 72 °C y 13C usa un lavado riguroso de 76 °C.

Las **FIGS. 14A-B** son microfotografías del ensayo de gen-proteína HER2 que emplea un enfoque de lavado riguroso doble en el que la FIG. 14A muestra un tumor de xenoinjerto ZR-75-1 y la FIG. 14B muestra un caso de displasia de cuello uterino.

Las **FIGS. 15A-B** muestran el ensayo de gen-proteína HER2 que emplea un enfoque de lavado riguroso doble en el que la FIG. 15A muestra un tumor de cáncer de mama con el objetivo 4X y la FIG. 15B muestra el mismo caso con el objetivo 100X.

Las **FIGS. 16A-B** muestran el ensayo de gen-proteína HER2 que emplea un enfoque de lavado riguroso doble en el que la FIG. 16A muestra un tumor de cáncer de mama con el objetivo 4X y la FIG. 16B muestra el mismo caso con el objetivo 100X.

Las **FIGS. 17A-B** son un gráfico (FIG. 17A) y una tabla (FIG. 17B) que muestran la supervivencia sin remisión (SSR) por un grupo de ensayo clínico como se determina por el ensayo de gen-proteína.

Las **FIGS. 18A-B** son un gráfico (FIG. 18A) y una tabla (FIG. 18B) que muestran la supervivencia específica al cáncer (SEC) por el grupo de ensayo clínico como se determina por el ensayo de gen-proteína.

Las **FIGS. 19A-B**, son gráficos para <SSR> (FIG. 19A) y <SEC> (FIG. 19B) que muestran el impacto de la heterogeneidad en el contexto del ensayo de gen-proteína en el grupo de ensayo clínico.

La **FIG. 20** muestra una subpoblación de los datos mostrados en la FIG. 19, en la que la población era cáncer de mama triple negativo (TNBC, para el RE, el RP y dentro del grupo F para el ensayo de gen-proteína).

Las **FIGS. 21A-B**, son microfotografías de un tejido representativo teñido de acuerdo con el ensayo de gen-proteína con un objetivo de 10x (FIG. 21A) y con 60x (FIG. 21B), que proporciona evidencia en cuanto a una causa biológica de la heterogeneidad de neoplasia maligna.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La clasificación estándar de tumores de mama incluye determinar el estado del tumor para el RE, el RP y HER2 y la selección del tratamiento en función de si el tumor da positivo para el RE, positivo para HER2 o es triple negativo. Sin embargo, se ha reconocido más recientemente que un subconjunto de tumores positivos para HER2 dan positivo para el RE, y que dichos tumores pueden reaccionar favorablemente a una combinación de tratamientos antiestrogénicos y anti-HER2 (por ejemplo, Rimawi *et al.*, J. Clin. Oncol. 14:1726-1731, 2013; Montemurro *et al.*, Ann. Oncol. doi: 10.1093/annonc/mdt287, 2013; Vaz-Luis *et al.*, Ann. Oncol. 24:283-291, 2013). Por tanto, la identificación exacta de tumores positivos para HER2/positivos para el RE es cada vez más importante. Además, existe un reconocimiento creciente de la discordancia entre la expresión de la proteína HER2 y los resultados de la

amplificación del gen HER2 y el papel potencial de la heterogeneidad del tumor en dicha discordancia (por ejemplo, Nitta *et al.*, *Diagn. Pathol.* 7:60, 2012). Por tanto, sigue existiendo la necesidad de ensayos mejorados para identificar con exactitud los tumores positivos para HER2, así como los tumores positivos para HER2/positivos para el RE.

5 La heterogeneidad tisular (por ejemplo, heterogeneidad tumoral) desconcierta los diagnósticos de cáncer. En una muestra de tejido heterogéneo, la recogida de los resultados de análisis individuales de múltiples marcadores únicos es inferior a un enfoque multiplexado en una única muestra por varias razones. En primer lugar, la multiplexación hace posible identificar las células dentro de la muestra que expresan múltiples marcadores en una población de  
10 células que expresa diferencialmente esos marcadores únicos de forma heterogénea. Por ejemplo, dos ensayos de marcador único para una muestra que expresa de forma heterogénea los marcadores A y B a través de la población de células establecerían que, para ambos marcadores, existen células positivas y negativas para ambos marcadores. Los dos ensayos de marcador único no proporcionarían el grado en que la positividad y la negatividad se solapan dentro de las células. Como tal, no se puede conocer el grado en que las células son heterogéneas.  
15 Usando los ensayos de marcador único, el grado en que las células dan negativo para ambos marcadores, positivo para un marcador único o positivo para ambos marcadores no sería cuantificable. Si bien este beneficio se realiza en un formato de ensayo doble, los beneficios se combinan para niveles más altos de multiplexación. Incluso en tejidos homogéneos, donde la multiplexación no proporcionaría una ventaja tan clara, la multiplexación tiene otras ventajas, tales como la conservación de la muestra.

## 20 I. Términos

Los procedimientos y materiales adecuados para la práctica y/o prueba de modos de realización de la divulgación se describen a continuación.

25 Por ejemplo, los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica a los que se refiere la divulgación se describen en diversas referencias generales y más específicas, que incluyen, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos hasta el 2000); Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4.<sup>a</sup> ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

35 A fin de facilitar la revisión de los diversos modos de realización de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos específicos:

40 Anticuerpo: un polipéptido que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada y se une específicamente a un epítipo de un antígeno (tal como proteína HER2 o proteína del RE). Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o fragmentos de anticuerpos. Un anticuerpo se puede conjugar o marcar de otro modo con un marcador detectable, tal como una enzima, hapteno o fluoróforo.

45 Marcador detectable: una molécula o material que puede producir una señal (tal como una señal visual, eléctrica u otra) que indica la presencia y/o cantidad de una diana (tal como una proteína o ácido nucleico) en una muestra. Cuando se conjuga a una molécula de unión específica (por ejemplo, un anticuerpo o sonda de ácido nucleico), el marcador detectable se puede usar para localizar y/o cuantificar la diana a la que se dirige la molécula de unión específica. Un marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente, y se pueden usar varios marcadores detectables diferentes en combinación para detectar una o más dianas. Por ejemplo, un primer marcador detectable, tal como un hapteno conjugado con un anticuerpo específico para una diana, se puede detectar indirectamente  
50 usando un segundo marcador detectable que está conjugado con una molécula que se une específicamente al primer marcador detectable. Además, múltiples marcadores detectables que se pueden detectar por separado se pueden conjugar a diferentes moléculas de unión específica que se unen específicamente a diferentes dianas para proporcionar un ensayo múltiple que puede proporcionar la detección de las múltiples dianas en una única muestra.

55 Los marcadores detectables incluyen moléculas cromogénicas, fluorescentes, fosforescentes y/o luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una señal detectable (tal como mediante la conversión de una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o mediante la producción de un precipitado o el aumento de la turbidez de la muestra), haptenos que se pueden detectar a través de interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados adicionales de anticuerpos  
60 marcados de forma detectable, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen: enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa,  $\beta$ -galactosidasa o  $\beta$ -glucuronidasa; fluoróforos, tales como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas (muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes se pueden encontrar en *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, Molecular Probes, Eugene, OR); nanopartículas, tales como puntos cuánticos (patentes de EE. UU. n.<sup>os</sup> 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos metálicos, tales como los quelatos DOTA y DPTA de iones metálicos radiactivos o  
65

paramagnéticos como Gd3+; y liposomas, por ejemplo, liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, se usa un sustrato detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia variedad de dichos compuestos está disponible comercialmente, por ejemplo, de Life Technologies, Carlsbad, CA).

De forma alternativa, se puede usar una enzima en un esquema de detección metalográfica. En algunos ejemplos, los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como la fosfatasa alcalina, en combinación con un ion metálico soluble en agua y un sustrato inactivo de oxidorreducción de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo de oxidorreducción por la enzima, y el agente activo de oxidorreducción reduce el ion metálico, provocando que forme un precipitado detectable (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 7.642.064; 7.632.652). En otros ejemplos, los procedimientos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como peroxidasa de rábano picante) junto con un ion metálico soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, nuevamente para formar un precipitado detectable (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.670.113).

Los haptenos son pequeñas moléculas que pueden estar unidas por anticuerpos. Los haptenos ejemplares incluyen dinitrofenilo (DNP), biotina, digoxigenina (DIG) y fluoresceína. Los haptenos adicionales incluyen haptenos de oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triperpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y ciclolignano, tales como los divulgados en la pat. de EE. UU. n.º 7.695.929.

Receptor estrogénico (RE): también conocido como receptor estrogénico 1 (ESR1), receptor estrogénico alfa (ER-alfa), receptor nuclear estrogénico alfa; n.º de acceso de ID de gen GenBank 2099. Un factor de transcripción activado por hormonas. Tras la unión al estrógeno (u otros agonistas del RE), el receptor estrogénico se localiza en el núcleo y forma homodímeros o heterodímeros con el receptor estrogénico 2 y activa la transcripción de diversos genes.

Las secuencias de ácido nucleico y proteínas del RE están disponibles al público. Por ejemplo, el gen del RE está localizado en el cromosoma 6q25.1 y su secuencia se divulga como el n.º de acceso GenBank NC\_000006.11 (152011631-152424409). Los n.ºs de acceso GenBank NM\_001122742, NM\_001122741, NM\_001122740, NM\_000125, XM\_005266856 y XM\_005266857 divulgan secuencias de ácido nucleico del RE, y los n.ºs de acceso GenBank: NP\_001116214, NP\_001116213, NP\_001116212, NP\_000116, XP\_005266913 y XP\_005266914 divulgan secuencias de proteínas del RE, como se proporciona por GenBank el 4 de octubre de 2013.

HER2: también conocido como homólogo 2 de oncogén vírico de la eritroleucemia aviar v-erb-b2 (ErbB2), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, Her2/neu, c-erb B2/neu y homólogo oncogénico derivado de neuroblastoma/glioblastoma; n.º de acceso de ID de gen GenBank 2064. Como miembro de la familia del receptor tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico, Her2 se heterodimeriza con otros miembros de la familia de receptores del FCE unido a ligando, aunque carece de un dominio de unión a ligando y no se puede unir a los propios ligandos. La amplificación y/o sobreexpresión de Her2 se produce en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y ovario.

Las secuencias de ácido nucleico y proteína Her2 están disponibles al público. Por ejemplo, el gen Her2 está localizado en el cromosoma 17q12 y su secuencia se divulga como n.º de acceso GenBank NC\_000017.10 (37844167-37884915). Los n.ºs de acceso GenBank NM\_001005862, NM\_004448, XM\_005257139 y XM\_005257140 divulgan las secuencias de ácido nucleico de Her2 y los n.ºs de acceso GenBank: NP\_001005862, NP\_004439, XP\_005257196 y XP\_005257197 divulgan las secuencias de proteína Her2, como se proporciona por GenBank el 4 de octubre de 2013.

Inmunohistoquímica (IHQ): un procedimiento de determinación de la presencia o distribución de un antígeno en una muestra mediante la detección de la interacción del antígeno con un agente de unión específica, tal como un anticuerpo. Una muestra se pone en contacto con un anticuerpo detectado por medio de un marcador detectable conjugado con el anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado con un anticuerpo secundario, que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta).

Calificación de la proteína HER2 (IHQ): calificación de una muestra de proteína HER2 usando los siguientes criterios de la FDA para inmunohistoquímica (IHQ): calificación 0 (IHQ 0), calificación 1+ (IHQ 1), calificación 2+ (IHQ 2+), calificación 3+ (IHQ 3+).

Hibridación *in situ* (ISH): un procedimiento para determinar la presencia o distribución de un ácido nucleico en una muestra usando hibridación de una sonda de ácido nucleico marcada para localizar una secuencia específica de ADN o ARN en una porción o corte de tejido (*in situ*) o, si el tejido es suficientemente pequeño (por ejemplo, semillas de vegetales, embriones de *Drosophila*), en todo el tejido (ISH de preparación completa). Se puede usar ISH de ADN para determinar la estructura de los cromosomas, tal como para su uso en diagnósticos médicos para evaluar la integridad cromosómica y/o determinar el número de copias del gen en una muestra. La ISH de ARN mide y localiza los ARNm y otros transcritos dentro de cortes histológicos o preparaciones completas.

Para ISH, las células y los tejidos de muestra se tratan habitualmente para fijar los ácidos nucleicos diana en su lugar y para incrementar el acceso de la sonda a la molécula diana. La sonda marcada de forma detectable se hibrida con la secuencia diana a temperatura elevada, y luego la sonda en exceso se elimina por lavado. Los parámetros de la solución, tales como temperatura, concentración de sal y/o detergente, se pueden manipular para eliminar cualquier interacción no idéntica (por ejemplo, de modo que solamente las coincidencias de secuencia exacta permanezcan unidas). Luego, la sonda marcada se localiza y potencialmente se cuantifica en el tejido usando ya sea autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente. La ISH también puede usar dos o más sondas, que típicamente se marcan de manera diferente para detectar simultáneamente dos o más ácidos nucleicos.

Hibridación *in situ* dual (DISH): un procedimiento de hibridación *in situ* (ISH) que usa dos sondas para detectar dos secuencias diana diferentes. Típicamente, estas dos sondas se marcan de manera diferente. En los procedimientos presentados en el presente documento, DISH puede ser un ensayo para determinar el estado de amplificación del gen HER2 poniendo en contacto una muestra de un tumor con una sonda específica de HER2 y una sonda de centrómero del cromosoma 17 y determinando una proporción de ADN genómico de HER2 con respecto a ADN centromérico del cromosoma 17 (tal como una proporción de número de copias del gen HER2 con respecto a número de copias del centrómero del cromosoma 17). El procedimiento incluye utilizar diferentes marcadores detectables y/o sistemas de detección para cada uno de los ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17, de manera que cada uno se pueda detectar visualmente de forma individual en una única muestra.

Calificación del gen HER2 (DISH): Calificación de una muestra para determinar el gen HER2 usando los siguientes criterios de la FDA en función de la proporción de ADN genómico de HER2 con respecto a ADN centromérico del cromosoma 17 como se determina en un ensayo de DISH: DISH- (negativo:  $HER2/CEN17 < 2$ ) DISH+ (positivo:  $HER2/CEN17 \geq 2,0$ ).

Sonda: un ácido nucleico aislado (tal como un oligonucleótido sintético aislado), unido a un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores típicos incluyen isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos (incluyendo, pero no limitados a, DNP) y enzimas. Se analizan los procedimientos para el marcaje y una orientación en la elección de marcadores apropiados para diversos fines, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. and Wiley-Intersciences, 1992).

Las sondas se pueden seleccionar para proporcionar una especificidad deseada, y pueden comprender al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos de un ácido nucleico diana. En ejemplos particulares, las sondas pueden incluir al menos 100, 250, 500, 600, 1000 o más nucleótidos de un ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, la sonda incluye segmentos de nucleótidos que son de porciones no contiguas de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico genómico de HER2.

Muestra: el término "muestra" se refiere a cualquier sustancia (o material) líquida, semisólida o sólida en o sobre la que puede estar presente una diana. En particular, una muestra puede ser una muestra biológica o una muestra obtenida de un material biológico. Las muestras biológicas ejemplares incluyen muestras de tejido y/o muestras de citología, por ejemplo, obtenidas de un sujeto animal, tal como un sujeto humano. En otros ejemplos, una muestra biológica puede ser un líquido biológico obtenido, por ejemplo, de sangre, plasma, suero, orina, bilis, ascitis, saliva, líquido cefalorraquídeo, humor acuoso o vítreo, o cualquier secreción corporal, un transudado, un exudado. (por ejemplo, líquido obtenido de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación) o líquido obtenido de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad). Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de cualquier órgano o tejido (incluyendo una pieza de biopsia o de necropsia, tal como una biopsia tumoral) o puede incluir una célula (ya sea una célula primaria o una célula cultivada) o un medio acondicionado por cualquier célula o tejido u órgano.

Unión específica: un término que se refiere a la unión de un agente que se une preferentemente a una diana definida (tal como un anticuerpo a una proteína o antígeno específico o una sonda de ácido nucleico a una secuencia de ácido nucleico específica). Con respecto a una proteína diana, "se une específicamente" se refiere a la asociación preferente de un anticuerpo u otro ligando, en su totalidad o en parte, con un polipéptido específico. "Se une específicamente" se refiere a la asociación preferente de una sonda de ácido nucleico, en su totalidad o en parte, con un ácido nucleico específico, cuando se refiere a un ácido nucleico diana.

Un agente de unión específica se une sustancialmente solamente a una diana particular. Se puede producir una cantidad minoritaria de interacción no específica entre un agente de unión específica y una proteína o ácido nucleico no diana. La unión específica de anticuerpo a antígeno típicamente da como resultado un incremento mayor de 2 veces, tal como mayor de 5 veces, mayor de 10 veces o mayor de 100 veces en la cantidad de anticuerpo u otro ligando unido (por unidad de tiempo) a una proteína diana, en comparación con una proteína no diana. Se pueden usar los formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que reaccionen específicamente con una proteína particular (tal como anticuerpos que se unan específicamente a la proteína HER2 o a la proteína del RE). Véase

Harlow & Lane, *Antibodies, A Laborator y Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos.

La unión específica de una sonda de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico diana típicamente da como resultado un incremento mayor de 2 veces, tal como mayor de 5 veces, mayor de 10 veces o mayor de 100 veces en la cantidad de sonda de ácido nucleico unida a un ácido nucleico diana en comparación con un ácido nucleico no diana. Una variedad de condiciones de ISH son apropiadas para seleccionar sondas de ácidos nucleicos que se unan específicamente con una secuencia de ácido nucleico particular (tal como una sonda específica de HER2 o una sonda de centrómero del cromosoma 17).

Sujeto: cualquier organismo vertebrado multicelular, tal como mamíferos humanos o no humanos (por ejemplo, sujetos de veterinaria).

## II. Descripción general de varios modos de realización

En el presente documento se describen procedimientos para detectar múltiples moléculas diana (tales como dos o más proteínas y/o ácidos nucleicos) en una única muestra. En modos de realización particulares, los procedimientos incluyen la detección de la presencia y/o la cantidad de proteína HER2, proteína del RE y ADN genómico de HER2 (tal como el número de copias del gen HER2) en una única muestra. En algunos modos de realización, los procedimientos incluyen además la detección de la presencia y/o la cantidad de ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra y, en algunos ejemplos, la determinación de una proporción de ADN genómico de HER2 con respecto a ADN centromérico del cromosoma 17 (tal como una proporción del número de copias del gen HER2 con respecto al número de copias del centrómero del cromosoma 17). Los procedimientos incluyen utilizar diferentes marcadores detectables y/o sistemas de detección para cada uno de las proteína HER2, proteína del RE, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 (si está incluido), de manera que cada uno se pueda detectar visualmente de forma individual en una única muestra.

En algunos modos de realización de los procedimientos, una muestra se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HER2 y se detecta la proteína HER2, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del RE y se detecta la proteína del RE, y la muestra se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente al ADN genómico de HER2 y se detecta el ADN genómico de HER2. La detección de la proteína HER2, la proteína del RE y el ADN genómico de HER2 se puede realizar de forma concomitante o secuencial. En un modo de realización específica, el procedimiento incluye detectar de forma secuencial la proteína HER2 (poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico de HER2 y detectar la proteína HER2 en la muestra), seguido de detectar la proteína del RE (poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico del RE y detectar la proteína del RE en la muestra), y luego seguido de detectar el ADN genómico de HER2 (poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica de ADN genómico de HER2 y detectar el ADN genómico de HER2).

Como ejemplo, se hace referencia a las FIGS. 1A-B, que muestran un par de imágenes de una muestra de tejido tumoral de mama teñido para el gen HER2 (tinción nuclear punteada negra), proteína HER2 (tinción marrón de la membrana) y proteína del RE (tinción citoplásmica roja) con un aumento de 4X (FIG. 1A) y un aumento de 60X (FIG. 1B). La muestra está amplificada para el gen HER2, da positivo para la proteína HER2 y positivo para la proteína del RE. Sin embargo, algunas células (encerradas en círculos) dan negativo para la proteína HER2, aunque dan positivo para la proteína del RE y tienen amplificación del gen HER2. Dado que los tratamientos dirigidos a HER2 se dirigen a la proteína HER2, esta heterogeneidad podría dar como resultado que el tratamiento sea incapaz de afectar (por ejemplo, inhibir o incluso destruir) a las células tumorales que están amplificadas para el gen HER2, pero que no sobreexpresan la proteína HER2. Sin embargo, las células que dan positivo para el RE aún se verían afectadas por los tratamientos dirigidos al RE.

En modos de realización adicionales, el procedimiento incluye poner en contacto simultáneamente la muestra con una sonda de ácido nucleico específica de ADN genómico de HER2 y una sonda de ácido nucleico específica de ADN genómico de centrómero del cromosoma 17 y detectar el ADN genómico de HER2 y luego detectar el ADN genómico de centrómero del cromosoma 17.

En algunos ejemplos de los procedimientos divulgados, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HER2. Los procedimientos de construcción de anticuerpos específicos de HER2 son conocidos en la técnica. Además, dichos anticuerpos pueden estar disponibles comercialmente. En un ejemplo específico, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2, tal como anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER-2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, por ejemplo, número de catálogo 790-2991). Los anticuerpos específicos de HER2 adicionales incluyen anticuerpo anti-c-erbB2 A0485 (Dako, Carpinteria, CA). En algunos ejemplos, el anticuerpo específico de HER2 se marca de forma detectable, permitiendo la detección de la proteína HER2 en la muestra. En otros ejemplos, después de poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-HER2 (el anticuerpo primario), la muestra se pone en contacto con un anticuerpo secundario marcado de forma detectable obtenido contra el anticuerpo primario, tal como un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP)) o un



anticuerpo secundario conjugado con un hapteno que se puede detectar con un reactivo adicional conjugado con una enzima. La presencia de la proteína HER2 se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de cromógeno y/o sustrato que produce un precipitado coloreado en las proximidades del anticuerpo anti-HER2. La presencia y/o cantidad de proteína HER2 se detecta determinando la intensidad de tinción en la muestra. En algunos ejemplos, la intensidad de tinción se valora mediante un lector de portaobjetos en una escala numérica, tal como una escala de 0-3 (por ejemplo, donde 0 indica que no hay tinción en relación con el fondo, 1 indica tinción débil, 2 indica tinción moderada y 3 indica tinción fuerte).

En un ejemplo particular, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a la proteína HER2 (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 4B5), por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-HER2 se una específicamente a la proteína HER2 en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo secundario biotinilado que se une específicamente al anticuerpo primario, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo primario. La muestra se pone luego en contacto con estreptavidina conjugada con HRP, por ejemplo en condiciones suficientes para que la estreptavidina-HRP se una específicamente a la biotina, seguido de poner en contacto la muestra con sustrato de peróxido de hidrógeno y cromógeno de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que produce un precipitado marrón cerca del anticuerpo anti-HER2 (y la proteína HER2) que se puede detectar visualmente mediante microscopía óptica (campo claro). En un ejemplo, los reactivos (excepto el anticuerpo anti-HER2) se incluyen en un kit, tal como el kit de detección con DAB IVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 760-091). Un experto en la técnica puede seleccionar reactivos de detección alternativos (tales como anticuerpos secundarios, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) que incluyen los que producen un precipitado de color diferente para la detección de la proteína HER2.

En algunos ejemplos de los procedimientos divulgados, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del RE. Los procedimientos de construcción de anticuerpos específicos del RE son conocidos en la técnica. Además, dichos anticuerpos pueden estar disponibles comercialmente. En un ejemplo específico, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-RE, tal como anticuerpo monoclonal de conejo anti-RE (SP1) (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, por ejemplo, número de catálogo 790-4324). Los anticuerpos específicos del RE adicionales incluyen anticuerpos monoclonales anti-RE 1D5 y ER-2-123 (Dako, Carpinteria, CA). En algunos ejemplos, el anticuerpo específico del RE se marca de forma detectable, permitiendo la detección de la proteína del RE en la muestra. En otros ejemplos, después de poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-RE (el anticuerpo primario), la muestra se pone en contacto con un anticuerpo secundario marcado de forma detectable obtenido contra el anticuerpo primario, tal como un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (por ejemplo, AP o HRP) o un anticuerpo secundario conjugado con un hapteno que se puede detectar con un reactivo adicional conjugado con una enzima. La presencia de la proteína del RE se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de cromógeno y/o sustrato, que produce un precipitado coloreado en las proximidades del anticuerpo anti-RE. La presencia y/o cantidad de proteína del RE se detecta determinando la intensidad de tinción en la muestra. En algunos ejemplos, la tinción se califica mediante un lector de portaobjetos determinando un porcentaje de células tumorales en la muestra que están teñidas para la proteína del RE.

En un ejemplo particular, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a la proteína del RE (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de conejo anti-RE SP1), por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-RE se una específicamente a la proteína del RE en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo secundario conjugado con AP que se une específicamente al anticuerpo primario, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo primario. La muestra se pone luego en contacto con un fosfato de naftol y cromógeno Fast Red, que produce un precipitado rojo cerca del anticuerpo anti-RE (y la proteína del RE) que se puede detectar visualmente mediante microscopía óptica. En un ejemplo, los reactivos (excepto el anticuerpo anti-RE) se incluyen en un kit, tal como el kit de detección ULTRA VIEW Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 760-501). Un experto en la técnica puede seleccionar reactivos de detección alternativos (tales como anticuerpos, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) que incluyan los que producen un precipitado de color diferente para la detección de la proteína del RE.

De forma alternativa, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a la proteína del RE (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de conejo anti-RE SP1), por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-RE se una específicamente a la proteína del RE en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo secundario biotinilado que se une específicamente al anticuerpo primario, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo primario. La muestra se pone luego en contacto con estreptavidina-HRP, seguido de peróxido de hidrógeno y cromógeno Discovery Purple (conjugado de tiramida-rodamina, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de pieza 700-229), que produce un tinte violeta unido a la muestra cerca del anticuerpo anti-RE (y la proteína del RE) que se puede detectar visualmente mediante microscopía óptica.

En algunos ejemplos de los procedimientos divulgados, la muestra se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente al ADN genómico de HER2. Los procedimientos de construcción de sondas de

ácido nucleico específicas de HER2 son conocidos por un experto en la técnica. Las sondas de ácido nucleico específicas de HER2 también pueden estar disponibles comercialmente. Por ejemplo, una sonda de HER2 adecuada para su uso en los procedimientos divulgados incluye la sonda de HER2 incluida en el cóctel de sondas de dual ISH de HER2 INFORM (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 780-4422). En un ejemplo, la muestra se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico de HER2 marcada con hapteno, por ejemplo en condiciones específicas para que la sonda se una específicamente a (hibride con) el ADN genómico de HER2 en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo que se une específicamente al hapteno, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo se una específicamente al hapteno. El anticuerpo se puede conjugar con una enzima (tal como AP o HRP) o de forma alternativa, la muestra se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo antihapteno, donde el segundo anticuerpo se conjuga con una enzima. La presencia de ADN genómico de HER2 se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de cromógeno y/o sustrato para producir un precipitado coloreado en las proximidades de la sonda de ácido nucleico de HER2. En algunos ejemplos, el número de copias del gen de ADN de HER2 en la muestra se califica mediante un lector de portaobjetos contando el número de áreas de precipitados ("manchas") en los núcleos de las células tumorales.

En un ejemplo particular, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con una sonda de ADN genómico de HER2 conjugada con dinitrofenilo (DNP), por ejemplo en condiciones suficientes para que la sonda de HER2 se una específicamente al ADN genómico de HER2 en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo antihapteno que se une específicamente a DNP, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-DNP se una específicamente al DNP. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo secundario conjugado con HRP que se une específicamente al anticuerpo anti-DNP, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo anti-DNP. La muestra se pone luego en contacto con el cromógeno y el sustrato acetato de plata, hidroquinona y peróxido de hidrógeno. Los iones de plata se reducen mediante la hidroquinona a iones de plata metálicos que se pueden detectar visualmente mediante microscopía óptica como manchas negras. En un ejemplo, los reactivos (excepto la sonda de HER2) se incluyen en un kit, tal como el kit de detección ULTRA VIEW SISH DNP Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 760-098). Un experto en la técnica puede seleccionar reactivos de detección alternativos (tales como haptenos, anticuerpos, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) que incluyan los que producen un precipitado de color diferente para la detección de ADN genómico de HER2.

En ejemplos adicionales, los procedimientos divulgados incluyen además poner en contacto la muestra con una sonda que se une específicamente al ADN centromérico del cromosoma 17 y detectar el ADN del cromosoma 17 (tal como el número de copias del cromosoma 17) en la muestra. En algunos ejemplos de los procedimientos divulgados, la muestra se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente al ADN centromérico del cromosoma 17. Los procedimientos de construcción de sondas de ácido nucleico específicas de centrómero del cromosoma 17 son conocidos por un experto en la técnica. Además, las sondas de ácido nucleico de centrómero del cromosoma 17 también pueden estar disponibles comercialmente. Por ejemplo, una sonda de centrómero del cromosoma 17 adecuada para su uso en los procedimientos divulgados incluye la sonda de centrómero del cromosoma 17 incluida en el cóctel de sondas de ISH dual de HER2 INFORM (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 780-4422). En un ejemplo, la muestra se pone en contacto con una sonda de ácido nucleico de centrómero del cromosoma 17 marcada con hapteno, por ejemplo en condiciones específicas para que la sonda se una específicamente a (hibride con) el ADN genómico de centrómero del cromosoma 17 en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo que se une específicamente al hapteno, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo se una específicamente al hapteno. El anticuerpo se puede conjugar con una enzima (tal como AP o HRP) o de forma alternativa, la muestra se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo antihapteno, donde el segundo anticuerpo se conjuga con una enzima. La presencia del ADN genómico de centrómero del cromosoma 17 se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de cromógeno y/o sustrato para producir un precipitado coloreado en las proximidades de la sonda de ácido nucleico de centrómero del cromosoma 17. En algunos ejemplos, el número de copias del gen de ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra se califica mediante un lector de portaobjetos contando el número de áreas de precipitados ("manchas") en los núcleos de las células tumorales.

En un ejemplo particular, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con una sonda de ADN centromérico del cromosoma 17 conjugada con digoxigenina (DIG), por ejemplo en condiciones suficientes para que la sonda de centrómero del cromosoma 17 se una específicamente al ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo antihapteno que se une específicamente a DIG, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-DIG se una específicamente a la DIG. La muestra se pone luego en contacto con un anticuerpo secundario conjugado con AP que se une específicamente al anticuerpo anti-DIG, por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo anti-DIG. La muestra se pone luego en contacto con un fosfato de naftol y Fast Red, produciendo un precipitado rojo que se deposita en los núcleos cerca de la sonda de centrómero del cromosoma 17 (y el ADN centromérico del cromosoma 17) y se puede detectar visualmente mediante microscopía óptica como manchas rojas. En un ejemplo, los reactivos (excepto la sonda de centrómero del cromosoma 17) se incluyen en un kit, tal como el kit de detección ULTRAVIEW Red ISH DIG Detection Kit (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 760-505). Un

experto en la técnica puede seleccionar reactivos de detección alternativos (tales como haptenos, anticuerpos, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) que incluyan los que producen un precipitado de color diferente para la detección de ADN centromérico del cromosoma 17.

5 Los procedimientos divulgados se dirigen a la detección de múltiples dianas de proteínas y ácidos nucleicos en una única muestra. Como resultado, la señal detectable para cada miembro del ensayo debe ser individualmente distinguible. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la señal visual generada por el ensayo de detección para cada miembro del ensayo es de un color diferente. En un ejemplo específico, los procedimientos dan como resultado una tinción marrón para la proteína HER2 (por ejemplo, tinción marrón en la membrana celular), tinción roja para la proteína del RE (por ejemplo, tinción roja en el núcleo) y tinción negra para el ADN genómico de HER2 (por ejemplo, manchas negras en el núcleo, tal como manchas negras individualmente distinguibles o grupos de manchas negras). En otro ejemplo específico, los procedimientos dan como resultado una tinción marrón para la proteína de HER2, tinción violeta para la proteína del RE y tinción negra para el ADN genómico de HER2. Un experto en la técnica puede seleccionar diferentes combinaciones de reactivos de detección para proporcionar tinción de diferentes colores para cada uno de las proteína HER2, proteína del RE y ADN genómico de HER2. En ejemplos adicionales, los procedimientos dan como resultado además tinción roja para el ADN centromérico del cromosoma 17 (por ejemplo, manchas rojas en el núcleo, tales como manchas rojas individualmente distinguibles o grupos de manchas rojas). En un ejemplo particular, los procedimientos dan como resultado tinción marrón de la proteína HER2, tinción violeta de la proteína del RE, tinción negra del ADN genómico de HER2 y tinción roja del ADN centromérico del cromosoma 17. En algunos modos de realización, se utiliza tinción de proteína HER2 con tinción de DAB (marrón) porque este es el sistema de detección actualmente aceptado y es conocido para los anatomopatólogos. Sin embargo, se pueden usar combinaciones de colores adicionales.

Los procedimientos divulgados en el presente documento también pueden incluir etapas para el pretratamiento de muestras de tejido antes o entre las etapas que incluyen poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico de HER2 y un anticuerpo específico del RE, una sonda de ácido nucleico específica de HER2, y/o una sonda de ácido nucleico específica de centrómero del cromosoma 17. Estas etapas son conocidas por un experto en la técnica y pueden incluir la desparafinación de una muestra (tal como una muestra de FFPE), acondicionamiento celular, lavados, etc. Un protocolo ejemplar, que incluye dicho pretratamiento y otras etapas se proporciona en el ejemplo 1. Un experto en la técnica puede hacer ajustes a estas condiciones (por ejemplo, ajustes minoritarios a los tiempos y/o temperaturas de incubaciones, etapas de lavado, etc.).

Los cromógenos ejemplares que se pueden usar en los procedimientos divulgados incluyen (pero no se limitan a) los mostrados en la tabla 1. Si bien no es exhaustiva, la tabla 1 proporciona información sobre las variedades de cromógenos actualmente disponibles. Otros cromógenos ilustrativos incluyen los descritos en la publ. de pat. de EE. UU. 2013/0260379 y en la sol. de pat. prov. de EE. UU. n.º 61/831.552, presentada el 5 de junio de 2013.

**Tabla 1: Reactivos de detección cromogénica**

<b>Abr.</b>	<b>Nombre</b>	<b>Color</b>	<b>Enzima</b>
DAB	3,3'-diamino-bencidina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	marrón-negro	peroxidasa
AEC	3-amino-9-etil-carbazol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	rojo	peroxidasa
CN	4-cloro-1-naftol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	azul	peroxidasa
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato + nitroazul de tetrazolio	índigo-negro	fosfatasa alcalina
FAST RED	4-cloro-2-metilbencenodiazonio + 2,4-dimetilanilida-fosfato del ácido 3-hidroxi-2-naftoico	rojo	fosfatasa alcalina
FAST BLUE	Sal disódica de fosfato de AS-MX naftol + sal hemi(cloruro de zinc) sal de Fast Blue BB	azul	fosfatasa alcalina
FUCSINA	Naftol AS-BI + New Fuchsin	rojo	fosfatasa alcalina
NBT	nitroazul de tetrazolio + metosulfato de fenacina	azul-violeta	deshidrogenasa
ALK GOLD†	dihidrogenofosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo + Fast blue BB	amarillo-dorado	fosfatasa alcalina

La tabla 1, si bien no es exhaustiva, proporciona información sobre las variedades de sustancias cromogénicas actualmente disponibles (†documento WQ2012/024185, Kelly *et al.* "Substrates for Chromogenic detection and methods of use in detection assays and kits").

En algunos modos de realización, los procedimientos incluyen determinar si la muestra da positivo o negativo para HER2. En algunos ejemplos, se determina que la muestra da positivo o negativo para la proteína HER2, positivo o negativo para la amplificación del gen HER2, o ambas. Un experto en la técnica puede determinar si una muestra (tal como una muestra de tumor de mama) da positivo o negativo para la proteína HER2 y/o la amplificación del gen HER2. En algunos ejemplos, la muestra se califica semicuantitativamente para la proteína HER2, tal como 0 (negativo), 1+ (negativo), 2+ (ambiguo) o 3+ (positivo). En algunos ejemplos, la muestra se califica para la

amplificación del gen HER2 en función del número de copias del gen HER2, tal como seis o más copias de HER2 (positivo) o menos de seis copias de HER2 (negativo). En otros ejemplos, la muestra se califica para la amplificación del gen HER2 en función de la proporción del número de copias del gen HER2 con respecto al número de copias de centrómero del cromosoma 17, tal como  $HER2/CEN17 < 1,8$  (negativo),  $1,8 \geq HER2/CEN17 < 2,2$  (ambiguo).  
 5 HER2/CEN17 > 2,2 (positivo). Están disponibles directrices de prueba de HER2 adicionales e incluyen las descritas en Wolff *et al.*, J. Clin. Oncol., doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984.

En algunos modos de realización, los procedimientos también incluyen determinar si la muestra da positivo o negativo para la proteína del RE. Un experto en la técnica puede determinar si una muestra (tal como una muestra  
 10 de tumor de mama) da positivo o negativo para la proteína del RE. En algunos ejemplos, se determina que una muestra da positivo para el RE si hay tinción de proteína del RE en el núcleo de  $\geq 1$  % de las células tumorales en la muestra y se determina que da negativo para el RE si hay tinción de proteína del RE en el núcleo de  $< 1$  % de las células tumorales en la muestra. En ejemplos adicionales, se determina que una muestra tiene baja expresión del RE si se detecta tinción del RE en 1-10 % de las células tumorales en la muestra y se determina que tiene una  
 15 expresión alta del RE si se detecta tinción del RE en  $> 10$  % de las células tumorales en la muestra.

Los procedimientos descritos se pueden automatizar (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1). Los sistemas para IHQ y/o ISH automatizados están disponibles comercialmente, tales como el sistema de tinción de portaobjetos BENCHMARK ULTRA, el sistema de tinción de portaobjetos BENCHMARK XT y el sistema de tinción de portaobjetos DISCOVERY XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), las estaciones de tinción de portaobjetos BOND-MAX y BOND-III (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) y la estación de tinción de portaobjetos IQ Kinetic (Biocare Medical, Concord, CA). Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de una serie de patentes de Estados Unidos que divulgan sistemas y procedimientos para realizar análisis automatizados, incluyendo las patentes de EE. UU. n.ºs 5.650.327; 5.654.200; 6.296.809; 6.352.861; 6.582.962; 6.827.901 y 6.943.029.

### 25 III. Muestras

Las muestras ejemplares incluyen, sin limitación, frotis de sangre, preparaciones con citocentrifugadora, frotis de citología, biopsias con aguja gruesa y/o biopsias aspirativas. En algunos ejemplos, las muestras incluyen cortes histológicos (por ejemplo, cortes histológicos criostáticos y/o cortes histológicos incluidos en parafina). En modos de realización particulares, las muestras incluyen células tumorales, tales como células tumorales de mama o células tumorales de ovario. Los procedimientos de obtención de una muestra biológica de un sujeto son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los procedimientos de obtención de tejido mamario o células mamarias son rutinarios. Las muestras biológicas ejemplares se pueden aislar a partir de células o tejidos normales, o a partir de células o tejidos neoplásicos. En ejemplos particulares, una muestra biológica incluye una muestra de tumor, tal como una muestra de tumor de mama.

Por ejemplo, se puede obtener una muestra de un tumor de mama que contiene material celular por escisión quirúrgica de todo o parte del tumor, recogiendo una biopsia aspirativa del tumor, así como otros procedimientos conocidos en la técnica. En ejemplos particulares, se aplica una muestra de tejido o células a un sustrato y se analiza para detectar proteína HER2, proteína del RE y ADN genómico de HER2. Un soporte sólido puede contener la muestra biológica y permitir la detección cómoda de componentes (por ejemplo, proteínas y/o moléculas de ácido nucleico) en la muestra. Los soportes ejemplares incluyen portaobjetos de microscopio (por ejemplo, portaobjetos de microscopio de vidrio o portaobjetos de microscopio de plástico), cubreobjetos (por ejemplo, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), placas de cultivo de tejidos, placas de múltiples pocillos, membranas (por ejemplo, nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF)) o micromatrices genéticas BIACORE™.

Las muestras descritas en el presente documento se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido ahora o desarrollado a partir de ahora en la técnica. En general, las muestras de tejido se preparan fijando e incluyendo el tejido en un medio. En otros ejemplos, las muestras incluyen una suspensión celular que se prepara como una monocapa sobre un soporte sólido (tal como un portaobjetos de vidrio), por ejemplo extendiendo o centrifugando células sobre el soporte sólido. En otros ejemplos, se pueden usar cortes histológicos recién congelados (por ejemplo, no fijados) en los procedimientos divulgados en el presente documento.

El procedimiento de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra de tejido conserva las células y los constituyentes del tejido lo más cercano posible a un estado vital y les permite someterse a procedimientos preparatorios sin cambios significativos. La fijación detiene la autólisis y los procesos de descomposición bacteriana que comienzan tras la muerte celular, y estabiliza los componentes celulares y tisulares para que resistan las etapas posteriores del procesamiento del tejido, tales como para ISH o IHQ.

Los tejidos se pueden fijar mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo perfusión o inmersión en un fijador. Los fijadores se pueden clasificar como agentes de entrecruzamiento (tales como aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de entrecruzamiento no aldehídicos), agentes oxidantes (por ejemplo, iones metálicos y complejos, tales como tetróxido de osmio y ácido crómico), agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro de mercurio, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy,

methacarn, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y fijadores diversos (por ejemplo, fijación con volumen excluido y fijación con vapor). También se pueden incluir aditivos en el fijador, tales como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales metálicas (tales como cloruro de cinc, sulfato de zinc y sales de litio) y lantano.

5 El fijador más comúnmente usado en la preparación de muestras es el formaldehído, en general en forma de una solución de formol (formaldehído al 4 % en una solución tampón, denominado formol tamponado al 10 %). En un ejemplo, el fijador es formol tamponado neutro al 10 %.

10 En algunos ejemplos, se usa un medio de inclusión. Un medio de inclusión es un material inerte en el que se incluyen tejidos y/o células para ayudar a conservarlos para análisis futuros. La inclusión también posibilita cortar las muestras de tejido en cortes finos. Los medios de inclusión incluyen parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plásticos o acrílicos. Muchos medios de inclusión son hidrófobos; por lo tanto, puede ser necesario eliminar el material inerte antes del análisis histológico o citológico, que utiliza principalmente reactivos hidrófilos. El término  
15 desparafinación o desparafinado se usa ampliamente en el presente documento para referirse a la eliminación parcial o completa de cualquier tipo de medio de inclusión de una muestra biológica. Por ejemplo, los cortes histológicos incluidos en parafina se desparafinan mediante el paso a través de disolventes orgánicos, tales como tolueno, xileno, limoneno u otros disolventes adecuados.

#### 20 **IV. Procedimientos de tratamiento**

Los procedimientos divulgados pueden incluir además seleccionar y/o administrar un tratamiento al sujeto. En algunos ejemplos, se selecciona y administra un tratamiento en función del estado de HER2 y/o del RE del tumor del sujeto. Por ejemplo, a un sujeto con un tumor positivo para el RE/negativo para HER2 se le administran uno o más  
25 medicamentos antiestrogénicos, tales como tamoxifeno, letrozol, toremifeno, fulvestrant, anastrozol y/o exemestano. A un sujeto con un tumor positivo para HER2/negativo para el RE se le administra uno o más tratamientos dirigidos a HER2, tales como trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y/o trastuzumab emtansina. A un sujeto con un tumor positivo para HER2/positivo para el RE se le administra tanto uno o más medicamentos antiestrogénicos como uno o más  
30 tratamientos dirigidos a HER2. En un ejemplo, a un sujeto con un tumor positivo para HER2/positivo para el RE se le administra trastuzumab y letrozol; trastuzumab y anastrozol; o trastuzumab, lapatinib y letrozol. En ejemplos adicionales, a los sujetos también se les administra quimioterapia de inducción, independientemente del estado del RE o HER2. Por ejemplo, se pueden tratar los sujetos con taxanos (tales como paclitaxel o docetaxel), antraciclinas (tales como daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina o mitoxantrona), ciclofosfamida, capecitabina, 5-fluorouracilo, metotrexato o combinaciones de los mismos. Un experto en la técnica puede seleccionar tratamientos apropiados  
35 para un sujeto en función del estado de HER2 y del RE del sujeto, y la edad, el estado, los antecedentes de tratamiento previo del sujeto y otros factores.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características específicas de modos de realización de trabajo y protocolos generales. El alcance de la presente divulgación no está limitado a aquellas  
40 características ejemplificadas por los siguientes ejemplos.

#### **Ejemplo 1**

##### **Ensayo de gen-proteína para HER2 y el RE**

45 Este ejemplo describe un ensayo de gen-proteína múltiple para la detección de la proteína HER2, la proteína del RE y el número de copias del gen HER2 en una muestra.

Se desarrolló un ensayo múltiple para la detección de la proteína HER2 y del RE y el número de copias del gen HER2 en una única muestra. La proteína HER2 se detectó en primer lugar mediante IHQ usando anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2/neu (4B5) PATHWAY (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección con DAB iVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A continuación, se detectó la proteína del RE mediante IHQ usando anticuerpo monoclonal de conejo del receptor antiestrogénico (SP1) CONFIRM (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección ULTRAVIEW Universal DAB (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Finalmente, se  
55 detectó el ADN genómico de HER2 con ISH usando una sonda de HER2 marcada con DNP y se detectó con detección ULTRAVIEW SISH DNP (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Todas las etapas se realizaron en un instrumento de tinción de IHQ/ISH automatizado BENCHMARK XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS) con NexES V10.6 como sigue:

- 60 (1) horneando: 60 °C durante 4 minutos, enjuagar;
- (2) la desparafinación se realizó para eliminar la parafina para la penetración del reactivo usando EZ Prep (n.º de catálogo de VMSI: 950-102): 2x8 minutos a 72 °C, enjuagar;
- 65 (3) el acondicionamiento celular se realizó usando CC1 usado (n.º de catálogo de VMSI: 950-124) 2x16 minutos y 1x8 minutos a 95 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;

- (4) tratar con inhibidor IVIEW (n.º de catálogo de VMSI: 253-2187) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- 5 (5) aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo anti-HER2/neu 4B5 PATHWAY (n.º de catálogo de VMSI 790-2991), incubado durante 32 minutos a 37 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- (6) detección con el sistema de detección con DAB IVIEW: bloqueador de biotina A (n.º de catálogo de VMSI 253-2030) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar, bloqueador de biotina B (n.º de catálogo de VMSI 253-2031) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar, Ig de biotina IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2188) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, SA-HRP IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2189) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, DAB IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2190) y peróxido de hidrógeno IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2191) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, y cobre IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2192) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 10 (7) se aplicó tampón de reacción y la muestra se incubó a 95 °C durante 8 minutos, se incubó 4 minutos sin calentamiento, se enjuagó con tampón de reacción;
- (8) aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo anti-RE (SP1) CONFIRM (n.º de catálogo de VMSI 790-4324), incubado durante 16 minutos a 37 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- 20 (9) la detección se realizó con el sistema de detección ULTRAVIEW Universal Alkaline Phosphatase Red: multímero ULTRAVIEW Red Universal Alkaline Phosphatase (n.º de catálogo de VMSI 253-4327) durante 16 minutos a 37 °C, enjuagar, potenciador ULTRAVIEW Red (n.º de catálogo de VMSI 253-4326) durante 4 minutos a 37 °C, naftol ULTRAVIEW Red (n.º de catálogo de VMSI 253-4328) durante 4 minutos a 37 °C, Fast Red A ULTRAVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-429) y Fast Red B ULTRAVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-4330) durante 16 minutos a 37 °C, enjuagar (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 25 (10) aplicar 900 µl de tampón de enjuague, 4 minutos a 37 °C, acondicionamiento celular: acondicionador celular 2 (n.º de catálogo de VMSI 950-123) durante 3 ciclos de 8 minutos a 90 °C, enjuagar;
- 30 (11) tratamiento con proteasa: ISH Protease 2 (n.º de catálogo de VMSI 780-4148) durante 12 minutos a 37 °C, enjuagar;
- 35 (12) aclaración: solución HybClear (n.º de catálogo de VMSI 780-4572) durante 4 minutos a 52 °C;
- (13) sonda: sonda con DNP para HER2 (n.º de catálogo de VMSI 780-4422) durante 4 minutos a 52 °C, 4 minutos a 80 °C y 6 horas a 44 °C, enjuagar;
- 40 (14) lavado riguroso con tampón de enjuague 4x8 minutos a 72 °C, enjuagar;
- (15) detección con el sistema de detección ULTRAVIEW SISH-DNP: anticuerpo anti-DNP/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4414) durante 20 minutos a 37 °C, enjuagar, DNP-HRP/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4413) durante 24 minutos a 37 °C, enjuagar, DNP-cromógeno A/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4410) durante 4 minutos a temperatura ambiente, enjuagar, DNP-cromógeno A/ISH argéntica durante 4 minutos a temperatura ambiente, DNP-cromógeno B/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4411) durante 4 minutos a temperatura ambiente, y DNP-cromógeno C/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4412) durante 8 minutos a temperatura ambiente, enjuagar;
- 45 (16) contratinción y postcontratinción: 8 minutos con hematoxilina II (n.º de catálogo de VMSI: 790-2208), enjuagar, postcontratinción durante 4 minutos con reactivo de tinción azul (n.º de catálogo de VMSI: 760-2037).

El protocolo de tinción da como resultado la tinción marrón de la proteína HER2, la tinción roja de la proteína del RE y la tinción negra del ADN genómico de HER2. Se proporcionan las muestras representativas de tumor de mama que muestran una muestra que tiene el gen HER2 amplificado, da positivo para la proteína HER2 y positivo para la proteína del RE (FIGS. 1A y B), una muestra con el gen HER2 amplificado, negativo para la proteína HER2 y positivo para la proteína del RE (FIGS. 2A y B) y una muestra con el gen HER2 amplificado, positivo para la proteína HER2 y negativo para la proteína del RE (FIGS. 3A y B). Se observó heterogeneidad dentro de la muestra. Por ejemplo, incluso en la muestra positiva para la proteína HER2 (FIG. 1), algunas células dieron positivo para amplificación del gen HER2 y para la proteína del RE, pero carecían de la proteína HER2 (células encerradas en círculos en la FIG. 1B).

## **Ejemplo 2**

### **65 Comparación de procedimientos de detección y uso de Ki67**

Este ejemplo describe la comparación de procedimientos de detección para la IHQ de la proteína del RE y también la comparación de IHQ del RE con IHQ de Ki67.

5 La tinción de IHQ de la proteína del RE con reactivos de DAB iVIEW o reactivos ULTRAVIEW Red se sometió a prueba en muestras de tumores de mama (FIGS. 4A y B) y se compararon con la IHQ de HER2/ISH teñida con ULTRAVIEW Red (FIG. 4C). La tinción con ULTRAVIEW Red (FIG. 4C) se seleccionó para su inclusión en el ensayo (como se describe en el ejemplo 1). Se realizaron experimentos similares usando IHQ de la proteína Ki67 en lugar de IHQ del RE (FIGS. 5A-C). La FIG. 6 muestra una muestra teñida para el gen HER2, la proteína HER2 y la proteína Ki67. Un ejemplo de tinción del gen y la proteína HER2 con IHQ de Ki67 o del RE en una muestra positiva para HER2 se muestra en las FIGS. 7A-D.

Un ejemplo de tinción del gen y la proteína HER2 con IHQ de Ki67 o del RE en un caso ambiguo de HER2 se muestra en las FIGS. 8 y 9, respectivamente.

### 15 **Ejemplo 3**

#### **Ensayo cuádruple de gen-proteína para HER2 y el RE**

20 Este ejemplo describe un ensayo de gen-proteína múltiple para la detección de la proteína HER2, la proteína del RE, el número de copias del gen HER2 y el número de copias del cromosoma 17 en una muestra.

Se desarrolló un ensayo múltiple para la detección de la proteína HER2 y del RE, el número de copias del gen HER2 y el número de copias del gen del ADN centromérico del cromosoma 17 en una única muestra. La proteína HER2 se detectó en primer lugar mediante IHQ usando anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2/neu (4B5) PATHWAY (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección con DAB iVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A continuación, se detectó la proteína del RE mediante IHQ usando anticuerpo monoclonal de conejo del receptor antiestrogénico (SP1) CONFIRM (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección con Discovery Purple (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Finalmente se detectaron el ADN genómico de ácido nucleico de HER2 y el ADN centromérico del cromosoma 17 con dual ISH usando una sonda de HER2 marcada con DNP detectada con detección ULTRAVIEW SISH DNP (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y una sonda de centrómero del cromosoma 17 marcada con DIG detectada con detección ULTRAVIEW Red ISH DIG (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Todas las etapas se realizaron en un instrumento de tinción de IHQ/ISH automatizado BENCHMARK XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS) con NexES V10.6 como sigue:

- 35 (1) horneando: 60 °C durante 4 minutos, enjuagar;
- (2) la desparafinación se realizó para eliminar la parafina para la penetración del reactivo usando EZ Prep (n.º de catálogo de VMSI: 950-102): 2x8 minutos a 72 °C, enjuagar;
- 40 (3) el acondicionamiento celular se realizó usando CC1 usado (n.º de catálogo de VMSI: 950-124) 2x16 minutos y 1x8 minutos a 95 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- (4) tratar con inhibidor IVIEW (n.º de catálogo de VMSI: 253-2187) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- 45 (5) aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo anti-HER2/neu 4B5 PATHWAY (n.º de catálogo de VMSI 790-2991), incubado durante 32 minutos a 37 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- (6) detección con el sistema de detección con DAB IVIEW: bloqueador de biotina A (n.º de catálogo de VMSI 253-2030) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar, bloqueador de biotina B (n.º de catálogo de VMSI 253-2031) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar, Ig de biotina IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2188) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, SA-HRP IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2189) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, DAB IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2190) y peróxido de hidrógeno IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2191) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, y cobre IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2192) durante 4 minutos a 37 °C, enjuagar (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 55 (7) se aplicó tampón de reacción y la muestra se incubó a 95 °C durante 8 minutos, se incubó 4 minutos sin calentamiento, se enjuagó con tampón de reacción;
- 60 (8) aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo anti-RE (SP1) CONFIRM (n.º de catálogo de VMSI 790-4324), incubado durante 16 minutos a 37 °C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- (9) detección: Ig de biotina IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2188) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, SA-HRP IVIEW (n.º de catálogo de VMSI 253-2189) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar, Discovery Purple (n.º de catálogo de VMSI 700-229) y peróxido de hidrógeno durante 32 minutos a 37 °C, enjuagar (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 65

- (10) aplicar 900 µl de tampón de enjuague, 4 minutos a 37 °C, acondicionamiento celular: acondicionador celular 2 (n.º de catálogo de VMSI 950-123) durante 3 ciclos de 8 minutos a 90 °C, enjuagar;
- 5 (11) tratamiento con proteasa: ISH Protease 2 (n.º de catálogo de VMSI 780-4148) durante 8 minutos a 37 °C, enjuagar;
- (12) aclaración: solución HybClear (n.º de catálogo de VMSI 780-4572) durante 4 minutos a 52 °C;
- 10 (13) sonda: cóctel de sondas con DNP para HER2 y DIG para cr17 (n.º de catálogo de VMSI 780-4422) durante 4 minutos a 52 °C, 4 minutos a 80 °C y 6 horas a 44 °C, enjuagar;
- (14) lavado riguroso con tampón de enjuague 4x8 minutos a 72 °C, enjuagar;
- 15 (15) detección de HER2 con el sistema de detección ULTRAVIEW SISH DNP: anticuerpo anti-DNP/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4414) durante 20 minutos a 37 °C, enjuagar, DNP-HRP/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4413) durante 24 minutos a 37 °C, enjuagar, DNP-cromógeno A/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4410) durante 4 minutos a temperatura ambiente, enjuagar, DNP-cromógeno A/ISH argéntica durante 4 minutos a temperatura ambiente, DNP-cromógeno B/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4411) durante 4 minutos a temperatura ambiente, y DNP-cromógeno C/ISH argéntica (n.º de catálogo de VMSI 253-4412) durante 8 minutos a temperatura ambiente, enjuagar (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 20 (16) detección de cr17 con el sistema de detección ULTRAVIEW Red ISH DIG: anticuerpo anti-DIG de ratón ULTRAVIEW Red ISH DIG (n.º de catálogo de VMSI 253-4415) durante 20 minutos a 37 °C, enjuagar, AP ULTRAVIEW Red ISH DIG (n.º de catálogo de VMSI 253-4419) durante 32 minutos a 37 °C, enjuagar, potenciador de pH ULTRAVIEW Red ISH DIG (n.º de catálogo de VMSI 253-4418) durante 8 minutos a 37 °C, naftol ULTRAVIEW Red ISH DIG (n.º de catálogo de VMSI 253-4417) durante 4 minutos a 37 °C, Fast Red ULTRAVIEW Red ISH DIG (n.º de catálogo de VMSI 253-4416) durante 4 minutos, Fast Red ULTRAVIEW Red ISH DIG durante 12 minutos a 37 °C, enjuagar (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 30 (17) contratinción y postcontratinción: 8 minutos a 37 °C con hematoxilina II (n.º de catálogo de VMSI: 790-2208), enjuagar, postcontratinción 4 minutos a 37 °C con reactivo de tinción azul (n.º de catálogo de VMSI: 760-2037).
- 35 El protocolo de tinción da como resultado la tinción marrón de la proteína HER2, la tinción violeta de la proteína del RE, la tinción negra del ADN genómico de HER2 y la tinción roja del ADN centromérico del cromosoma 17. Una muestra representativa que tiene el gen HER2 amplificado, da positivo para la proteína HER2, y positivo para la proteína del RE se muestra en las FIGS. 10A y B. Una muestra que se considera negativa para HER2 (proteína y gen) y positiva para el RE se muestra en las FIGS. 11A y B.
- 40

#### **Ejemplo 4**

##### **Ensayo cuádruple de gen-proteína para HER2 y el RE**

- 45 Este ejemplo describe un ensayo de gen-proteína múltiple para la detección de proteína HER2, proteína del RE, número de copias del gen HER2 y número de copias del cromosoma 17 en una muestra usando sondas de oligonucleótidos monocatenarias para análisis del número de copias de HER2 y cromosoma 17. Véase la ser. de solicitud de EE. UU. n.º 61/943.196 para la divulgación relacionada con las sondas de oligonucleótidos. El uso de las sondas de oligonucleótidos monocatenarias disminuye el tiempo requerido para el ensayo ya que las sondas hibridan mucho más rápidamente que las sondas de ADN mencionadas anteriormente (cóctel de sondas con DNP para HER2 y con DIG para cr17 (n.º de catálogo de VMSI 780-4422)). En particular, el tiempo de hibridación se disminuyó de 6 horas a 1 hora. Además, se descubrió que la solución HybClear (n.º de catálogo de VMSI 780-4572) no era necesaria para las sondas de oligonucleótidos monocatenarias.
- 50
- 55 La sonda de HER2 de oligonucleótidos monocatenaria (sonda de oligonucleótidos de HER2) es una sonda genómica sin repeticiones marcada con dinitrofenilo (DNP) dirigida específicamente a la región del gen HER2. De forma similar a la sonda de ADN de DUAL ISH de HER2 INFORM, la sonda de oligonucleótidos de HER2 abarca > 327.000 nucleótidos (nt) (35.027.979-35.355.516) de ADN genómico del cromosoma 17 humano, que incluye la región diana de HER2 (UCSC Genome Browser on Human May 2004 (NCBI35/hg17)) Assembly). Las secuencias de oligonucleótidos de HER2 se diseñaron a partir de las secuencias en la sonda de ADN de DUAL ISH de HER2 INFORM. Cada uno de los oligonucleótidos de HER2 se diseñó con una longitud de 80-mero; por consiguiente, el nivel de rigurosidad para la unión no diana se elevó más de acuerdo con los criterios de diseño de la sonda de oligonucleótidos mencionada anteriormente. La especificidad de la sonda de oligonucleótidos de HER2 se validó experimentalmente en diseminaciones metafásicas en las condiciones de ensayo de ISH examinadas.
- 60
- 65 Se usaron búsquedas bioinformáticas para identificar secuencias de ácido nucleico específicas de HER2 alrededor



- 5 de la región diana de HER2. La secuencia de ácido nucleico diana genómico seleccionada se separa en segmentos consecutivos no superpuestos de 80 nt. Se sintetizaron mil ciento noventa y seis (1196) oligonucleótidos de ~80-mero portando cada uno 5 haptenos de DNP en una fosforamida abásica espaciada a 20 nt de distancia. Los oligonucleótidos se purificaron por afinidad y se analizaron mediante espectrometría de masas y electroforesis en gel. La sonda de oligonucleótidos de HER2 se completó en un tampón a base de formamida sin ADN de bloqueo humano. En el procedimiento de cribado inicial, se sometió a prueba funcionalmente el número de oligonucleótidos, el número y espaciamiento de los haptenos de DNP, en el tampón a base de formamida sin ADN de bloqueo humano para determinar la sensibilidad y especificidad al gen HER2.
- 10 Se preparó una sonda de cr17 de oligonucleótidos monocatenaria (sonda de oligonucleótidos de cr17) con un grupo de 14 oligonucleótidos con longitudes de 58 pb a 87 pb. Cada oligonucleótido se marcó con dos moléculas de hapteno de DIG en una cola sin unión que tiene la secuencia TATTTTATTTT en su extremo 5'. Estos oligonucleótidos se purificaron con PAGE y se analizaron con espectrometría de masas. La sonda de oligonucleótidos de cr17 se formuló en un tampón a base de formamida sin ADN de bloqueo humano. En modos de realización ilustrativos, el cr17 comprende una o más de las secuencias enumeradas en la tabla 2.
- 15

**Tabla 2: Secuencias del cromosoma 17**

Nombre oligonuc.	Secuencias	Longitud
CHR17_M1.1 SEQ ID. NO. 1	AATTCGTTGAAACGGGATAATTTTCAGCTGACTAAACAGAAGCAGTCTCAGAAT CTTCTTTGTGATGTTTGCATTCAA	79
CHR17_M2.1 SEQ ID. NO. 2	CTTCGTTCGAAACGGGTATATCTTACATgcCATCTAGACAGAAGCATcCTCAGA AgCncTCTGTGATGACTGCATT	79
CHR17_M2.2 SEQ ID. NO. 3	TGAACtCTCCTTTTGGAGCGCAGTTTTGAAACTCTCTTTCTgTGGcATCTGCAA GGGGACATGtAGACCTCTTTGAAG	79
CHR17_M3.1 SEQ ID. NO. 4	TTTCGTTGAAACGGAATCATCTTACATAAAAAcTACACAGAtGCATTCTCAGG AACTttTTGGTGATGTTTGTATT	79
CHR17_M5.1 SEQ ID. NO. 5	CCTATGGTAGTAAAGGGAAtAGCTTCAtAgAAAAcTAGACAGAAGCATTCTCAG AAAATACTTTGTGATGATTGAGTTTAA	83
CHR17_M5.2 SEQ ID. NO. 6	CACAGAGCTGAACATTCCTTTGGATGGAGCAGGTTTGAgACACtCTTTtGTAcA ATCTaCaAGTGGATATTTGGACCTCTCTGAGG	87
CHR17_M8.2 SEQ ID. NO. 7	GTTTTCaATTGCTTTTCATAGAGtAGtTctGAAACATGCTTTTCGTAGtGTCTaCAA GTGGACATTTGGAG	71
CHR17_M9.1 SEQ ID. NO. 8	CCTGTGGTGGAAAACGAATTATcGTCACgTAAAACTaGAGAGAAGCATTGTCA GAAA	58
CHR17_M9.2 SEQ ID. NO. 9	TGCATTCAACTCACAGAGTTGAAGGTTCTTTTCAAAGAGCAGTTTCCAAtCACT CTTTgTGTGG	65
CHR17_M11.2 SEQ ID. NO. 10	CATTCCCTTTgACAGAGCAgTTTGGAACTCTCtTTGTGTAGAATCTGCAAGTGG AGATATGGACCGCTTT	71
CHR17_M12.1 SEQ ID. NO. 11	CCTATGGTAGTAAAGGAAAtAGCTTCATATAAAAgCTAGACAGtAGCATTCaCAG AAAACCTCTTaGTGACGACTGAGTTT	80
CHR17_M13.1 SEQ ID. NO. 12	ATTTTCGTTGAAACGGGATAAACCGCACAGAActAAACAGAAGCATTCTCAGA ACCTTCTTCGTGATGTTTGCATTCAAC	80
CHR17_M16.1 SEQ ID. NO. 13	CGTAGTAAAGGAAATAACTTCTATAAAAAgAAGACAGAAGCTTTCTCAGAAAAT TCTtTGGGATGATTGAGTTGAACTC	80
CHR17_M16.2 SEQ ID. NO. 14	ACAGAGCTGAgCATTCTTgcGATGtAGcAGTTTaGAAACACACTTTCTGcAGAAT CTGCaAtTGcATATTTGGACCTT	79

- 20 Un aspecto de la presente invención es que a fin de equilibrar la señal entre las detecciones del cr17 y el gen HER2, se necesitan diferentes lavados rigurosos. En particular, es importante que cuando se lee un ensayo de gen-proteína, la señal del gen (por ejemplo, HER2) y la señal del centrómero (por ejemplo, cr17) tengan un tamaño equivalente, teniendo ambas señales discretas, redondas y fácilmente discernibles. Las señales grandes, deformes, dispares o débiles desconciertan la lectura del ensayo de gen-proteína. Este problema desconcierta además, por
- 25 niveles más altos de multiplexación (es decir, un cuádruple o más alto). Por consiguiente, las FIG. 12A-C muestran tres microfotografías de un caso de displasia de cuello uterino en las que 12A usa un lavado riguroso de 68 °C, 12B usa un lavado riguroso de 72 °C y 12C usa un lavado riguroso de 76 °C. Estas pruebas a diferentes rigurosidades mostraron que un lavado riguroso de 68 °C produjo la mejor señal para HER2 (detección en negro, SISH). Las FIGS. 13A-C muestran tres microfotografías de un tumor de xenoinjerto ZR-75-1 en las que 13A usa un lavado riguroso de
- 30 68 °C, 13B usa un lavado riguroso de 72 °C, y 13C usa un lavado riguroso de 76 °C. Se determinó que un lavado riguroso de 76 °C producía la mejor señal para el cr17 (detección en rojo). Como tal, se descubrió que el ensayo cuádruple de gen-proteína era más claro cuando se lavó el HER2 para obtener rigurosidad a 68 °C, se detectó el HER2, y se lavó el cr17 para obtener rigurosidad a 76 °C y luego se detectó ("enfoque de lavado riguroso doble").
- 35 Con referencia ahora a las FIG. 14A-B, se muestran microfotografías del ensayo de gen-proteína HER2 empleando este enfoque de lavado riguroso doble en el que la FIG. 14A muestra un tumor de xenoinjerto ZR-75-1 y la FIG. 14B

muestra un caso de displasia de cuello uterino. De forma similar, las FIGS. 15A-B muestran el ensayo de gen-proteína HER2 que emplea este enfoque de lavado riguroso doble en el que la FIG. 15A muestra un tumor de cáncer de mama con un objetivo 4X y la FIG. 15B muestra el mismo caso con un objetivo 100X. En la FIG. 15B, la proteína HER2 se detecta con DAB (marrón), el RE se detecta con rojo, el gen HER2 se detecta con SISH (negro) y el cr17 se detecta con azul. De forma similar, las FIGS. 16A-B muestran el ensayo de gen-proteína HER2 que emplea este enfoque de lavado riguroso doble en el que la FIG. 16A muestra un tumor de cáncer de mama con un objetivo 4X y la FIG. 16B muestra el mismo caso con un objetivo 100X. Los diversos marcadores se detectan como se describe para la figura 15. De particular importancia, la FIG. 16A muestra una heterogeneidad tumoral significativa con respecto a la expresión de HER2. En particular, la mitad izquierda del campo de visión presenta baja expresión de HER2, mientras que la mitad derecha expresa fuertemente HER2. La FIG. 16B muestra una vista a 100X de la interfaz entre estas porciones heterogéneas del tumor, por lo que es posible ver varias células con alta expresión de HER2 a la derecha y baja expresión a la izquierda. De particular interés es la observación de que las células a la izquierda de la FIG. 16B presenta amplificación del gen HER2, pero no la expresión de la proteína HER2 amplificada. Un aspecto de la presente divulgación es que la capacidad de leer la proteína HER2 multiplexada, la proteína del RE, el gen HER2, el gen del cr17, posibilita una comprensión de la heterogeneidad de un tumor hasta ahora imposible. Como tal, el ensayo descrito actualmente proporciona al anatomopatólogo una herramienta increíblemente valiosa para el diagnóstico.

### **Ejemplo 5**

#### **ESTUDIO DE HETEROGENEIDAD**

##### **Antecedentes:**

La elegibilidad de los tratamientos dirigidos a HER2 para enfermos con cáncer de mama se determina mediante la evaluación de la amplificación del gen HER2 y la sobreexpresión de la proteína HER2. El ensayo de gen-proteína (GPA, Ventana Medical Systems, Inc., EE. UU.) es un nuevo procedimiento para la evaluación simultánea de inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación *in situ* dual (DISH) de HER2 usando un único corte histológico. En el presente estudio, se investigó la relación entre los resultados de IHQ y DISH de HER2 evaluados mediante GPA. Además, se analizó la correlación entre el estado de HER2 y el pronóstico de enfermos con cáncer de mama invasivo.

##### **Enfermos y procedimientos:**

En el presente estudio, se examinaron los tejidos de carcinoma infiltrante de 280 enfermos consecutivos tratados en el Saitama Cancer Center en 2000-2001 (mediana de seguimiento: 130 meses). En enfermos con HER2 positivo, ningún enfermo recibió tratamiento adyuvante con trastuzumab. Sin embargo, un 76 % de los enfermos con recidiva positiva para HER2 recibieron tratamiento con trastuzumab después de la recidiva. El GPA se realizó en un corte de tumores primarios preparados de manera rutinaria y el estado del gen y la proteína HER se evaluaron por separado en el área completa de los cortes tumorales usando los criterios de la FDA como sigue; DISH (negativo: HER2/CEN17 < 2, positivo: HER2/CEN17 ≥ 2,0) e IHQ (calificación de 0 a 3+). En el grupo de enfermos con una calificación de IHQ de 2+, se decidió la positividad de HER2 final de acuerdo con los resultados de DISH usando los criterios de la directriz ASCO/CAP 2013. Se analizaron la supervivencia sin recidiva (SSR) y la supervivencia específica al cáncer (SEC) estratificadas por IHQ y DISH. Además, se clasificaron los patrones de heterogeneidad por presencia conjunta de los siguientes 4 tipos fenotípicos y genotípicos: A) IHQ 2+/DISH+; B) IHQ 2+/DISH-; C) IHQ 1+ o 0/DISH+; y D) IHQ 1+ y 0/DISH-. La presencia de heterogeneidad y pronóstico se analizó en el grupo IHQ 0 y 1+.

##### **Resultados:**

El grupo IHQ 3+ de HER2 (27,5 %) tuvo una supervivencia significativamente peor que el grupo IHQ 1+ y 0 de HER2 (SSR:  $p=0,0039$ ; SEC:  $p=0,0362$ ) y el grupo DISH+ de HER2 (27,5 %) tuvo una supervivencia significativamente peor que el grupo DISH- de HER2 (SSR:  $p=0,0056$ ; SEC:  $p=0,0497$ ). El grupo positivo para HER2 definido por los criterios ASCO/CAP tuvo una SSR significativamente peor que el grupo negativo para HER2 ( $p=0,0211$ ). El grupo IHQ 1+ y 0/DISH+ de HER2 tuvo una SSR significativamente peor que el grupo IHQ 1+ y 0/DISH- ( $p=0,0208$ ). En el grupo IHQ 1+ y 0/DISH- de HER2, los enfermos con heterogeneidad (33 casos) tuvieron una supervivencia significativamente peor que aquellos sin heterogeneidad (SSR:  $p=0,0176$ ; SEC:  $p=0,0199$ ). Con referencia ahora a las FIGS. 17A-B, el gráfico (17A) y la tabla (17B) muestran la supervivencia sin remisión (SSR) por grupo como se determina por el ensayo de gen-proteína. Con referencia ahora a las FIG. 18A y 18B, el gráfico y la tabla muestran la supervivencia específica al cáncer (SEC) por grupo como se determina por el ensayo de gen-proteína. Con referencia ahora a las FIG. 19A y 19B, se muestra la utilidad de evaluar la heterogeneidad en el contexto del ensayo de gen-proteína. La FIG. 20 muestra una subpoblación de los datos mostrados en la FIG. 19, en la que la población era cáncer de mama triple negativo (TNBC, para el RE, el RP y dentro del grupo F para el ensayo de gen-proteína). La heterogeneidad en este grupo (n=31, no heterogénea, n=8, heterogénea) fue más significativa ( $p=0,016$  HR: 5,85).

5 La tecnología del GPA de HER2 podría ser útil para evaluar la discrepancia y heterogeneidad de los resultados de  
IHQ y DISH de HER2 en niveles de células individuales simultáneamente y la presencia de heterogeneidad de  
células tumorales de HER2 podría ser un factor pronóstico potente en enfermos con cáncer de mama negativo para  
HER2. Se debe llevar a cabo investigación clínica adicional para lo relacionado con la relación entre la presencia de  
heterogeneidad intratumoral de HER2 y la eficacia de los tratamientos dirigidos a HER2. Con referencia ahora a las  
FIG. 21A-B, se muestra un tejido representativo teñido tanto con el gen HER2 como con la proteína HER2 (la FIG.  
21A mostrada con un objetivo 10x y la FIG. 21B, un objetivo 60x). Teniendo en cuenta este caso particular de cáncer  
de mama, puede explicar por qué una calificación de grupo F con heterogeneidad tuvo un mal pronóstico en función  
de los resultados del estudio clínico. Si bien algunas células tumorales tenían positividad para el gen y la proteína  
10 HER2, otras regiones mostraron la amplificación del gen HER2 sin la expresión de la proteína HER2. La  
heterogeneidad se debe principalmente a células de grupo D (negativo en IHQ y positivo en DISH para HER2) en  
casos de tumor de grupo F (negativo en IHQ y negativo en DISH para HER2). Se plantea la hipótesis de que la  
amplificación del gen HER2 se produce en primer lugar y la positividad de la proteína HER2 solo se puede observar  
15 más adelante. En la FIG. 21 A, la imagen muestra múltiples capas de células tumorales positivas en IHQ y DISH  
para HER2 y una única capa de células de células negativas en IHQ y positivas en DISH para HER2. El ensayo  
actual del gen y la proteína HER2 de mama sugiere que tanto los ensayos de IHQ como de ISH de HER2  
potenciarían la capacidad de diagnóstico para pronosticar y predecir los resultados de los casos de cáncer de mama.

20 En vista de los muchos modos de realización posibles a los que se pueden aplicar los principios de la divulgación, se  
debe reconocer que los modos de realización ilustrados son solamente ejemplos y no se deben tomar como  
limitantes del alcance de la invención.

25 Por el contrario, el alcance de la invención se define mediante las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, se  
reivindica la presente invención como todo lo que entra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ventana Medical Systems, Inc.

5 <120> SIGNIFICACIÓN DE LA HETEROGENEIDAD DE HER2 INTRATUMORAL EN EL CÁNCER DE MAMA Y USOS DE LA MISMA

<130> 32156

10 <150> US62/009057  
<151> 06-06-2014

<160> 14

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20

**<400> 1**

aattcgtttgg	aaacgggata	atctcagctg	actaaacaga	agcagtcctca	gaatcttctt	60
tgtgatgttt	gcattcaaa					79

<210> 2  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

25

**<400> 2**

cttcggttoga	aacgggtata	tcttcacatg	ccatctagac	agaagcatcc	tcagaagctt	60
ctctgtgatg	actgcattc					79

30 <210> 3  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

**<400> 3**

tgaactctcc	ttttgagagc	gcagttttga	aactctcttt	ctgtggcacc	tgcaagggga	60
catgtagacc	tctttgaag					79

35

<210> 4  
<211> 79  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

40

**<400> 4**

tttcggttggg	aacgggaatca	tcttcacata	aaaactaac	agatgcattc	tcaggaactt	60
tttggtgatg	tttgtattc					79

45 <210> 5  
<211> 83  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

ES 2 688 079 T3

	<400> 5		
	cctatggtag taaaggaat agcttcatag aaaaactaga cagaagcatt ctcagaaaat	60	
	actttgtgat gattgagttt aac	83	
	<210> 6		
	<211> 87		
5	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 6		
	cacagagctg aacattcctt tggatggagc aggtttgaga cactcttttt gtacaatcta	60	
	caagtggata tttggacctc tctgagg	87	
10	<210> 7		
	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 7		
	gtttcacatt gcttttcata gagtagttct gaaacatgct tttogtagtg totacaagtg	60	
15	gacatttgga g	71	
	<210> 8		
	<211> 58		
	<212> ADN		
20	<213> Homo sapiens		
	<400> 8		
	cctgtggtgg aaaacgaatt atcgtcacgt aaaaactaga gagaagcatt gtcagaaa	58	
	<210> 9		
25	<211> 65		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 9		
	tgcattcaac tcacagagtt gaaggttct tttcaaagag cagtttcaa tcactctttg	60	
	tgtgg	65	
30	<210> 10		
	<211> 71		
	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 10		
	cattcccttt gacagagcag tttggaaact ctctttgtgt agaacttcca agtggagata	60	
	tggaccgctt t	71	
	<210> 11		
	<211> 80		
40	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		

ES 2 688 079 T3

<400> 11  
 cctatggtag taaaggaaat agcttcatat aaaagctaga cagtagcatt cacagaaaac 60  
 tcttggtgac gactgagttt 80

<210> 12  
 <211> 80  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 12  
 atttcggttg aaacgggata aaccgcacag aactaacag aagcattctc agaaccttct 60  
 tegtgatggt tgcattcaac 80

10 <210> 13  
 <211> 80  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 cgtagtaaag gaaataactt cctataaaaa gaagacagaa gctttctcag aaaattcttt 60  
 15 gggatgattg agttgaactc 80

<210> 14  
 <211> 79  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo sapiens

<400> 14  
 acagagctga gcattccttg cgatgtagca gtttagaaaac acactttctg cagaatctgc 60  
 aattgcatat ttggacctt 79

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para predecir el grado de respuesta a un tratamiento dirigido a HER2 evaluando la heterogeneidad de HER2 en un tumor, comprendiendo el procedimiento:

- poner en contacto una muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína HER2 y detectar la proteína HER2 en la muestra,
- poner en contacto la muestra de tumor con una sonda de ácido nucleico que se una específicamente al ADN genómico de HER2 y detectar el estado de amplificación del gen HER2 en la muestra,
- calificar a la proteína HER2 (IHQ) y al gen HER2 (DISH), en la que la calificación se clasifica como:
  - grupo A para muestras que presentan IHQ 3+ y DISH+,
  - grupo B para muestras que presentan IHQ 3+ y DISH-,
  - grupo C para muestras que presentan IHQ 2+ y DISH+,
  - grupo D para muestras que presentan IHQ 2+ y DISH-,
  - grupo E para muestras que presentan IHQ 0, 1+ y DISH+, y
  - grupo F para muestras que presentan IHQ 0, 1+ y DISH-,
- predecir que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el tumor revela un primer foco que tiene una primera calificación que es del grupo F y un segundo foco que tiene una segunda calificación seleccionada del grupo A al grupo E.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además someter a ensayo una segunda muestra de tumor para determinar el receptor estrogénico (RE) y el receptor progesterónico (RP), en el que se predice que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC).

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además

- poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor estrogénico (RE) y detectar la proteína del RE en la muestra;
- poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor progesterónico (RP) y detectar la proteína del RP en la muestra,

en el que se predice que el tumor es sensible al tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC).

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el tratamiento dirigido a HER-2 se selecciona del grupo que consiste en trastuzumab, trastuzumab emtansina, pertuzumab, neratinib y lapatinib.

5. Un procedimiento *in vitro* de calificación de una muestra de tumor, comprendiendo el procedimiento:

- poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína HER2 y detectar la proteína HER2 en la muestra,
- poner en contacto la muestra de tumor con una sonda de ácido nucleico que se una específicamente al ADN genómico de HER2 y detectar el estado de amplificación del gen HER2 en la muestra,
- calificar a la proteína HER2 (IHQ) y al gen HER2 (DISH), en la que la calificación se clasifica como:
  - grupo A para muestras que presentan IHQ 3+ y DISH+,
  - grupo B para muestras que presentan IHQ 3+ y DISH-,
  - grupo C para muestras que presentan IHQ 2+ y DISH+,
  - grupo D para muestras que presentan IHQ 2+ y DISH-,

- grupo E para muestras que presentan IHQ 0, 1+ y DISH+, y
  - grupo F para muestras que presentan IHQ 0, 1+ y DISH-,
- 5
- calificar la muestra de tumor como heterogénea si el tumor revela un primer foco que tiene una primera calificación que es del grupo F y un segundo foco que tiene una segunda calificación seleccionada del grupo A al grupo E.
- 10
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además pronosticar un cociente de riesgos instantáneos mayor que 5 si la muestra de tumor se califica como heterogénea.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además someter a ensayo una segunda muestra de tumor para determinar el receptor estrogénico (RE) y el receptor progesterónico (RP), en el que se predice que el tumor es sensible a un tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC).
- 15
8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el procedimiento comprende además
- poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor estrogénico (RE) y detectar la proteína del RE en la muestra;
  - poner en contacto la muestra de tumor con un anticuerpo que se una específicamente a la proteína del receptor progesterónico (RP) y detectar la proteína del RP en la muestra,
- 20
- 25
- en el que se predice que el tumor es sensible a un tratamiento dirigido a HER2 si el RE y el RP dan negativo, de modo que se entiende que el tumor es cáncer de mama triple negativo (TNBC).
9. El procedimiento de la reivindicación 7 u 8, en el que el procedimiento comprende además pronosticar una calificación de supervivencia significativamente peor en comparación con una calificación de no heterogénea (SSR:  $p=0,0176$ ; SEC:  $p=0,0199$ ) si la muestra se califica como heterogénea.
- 30



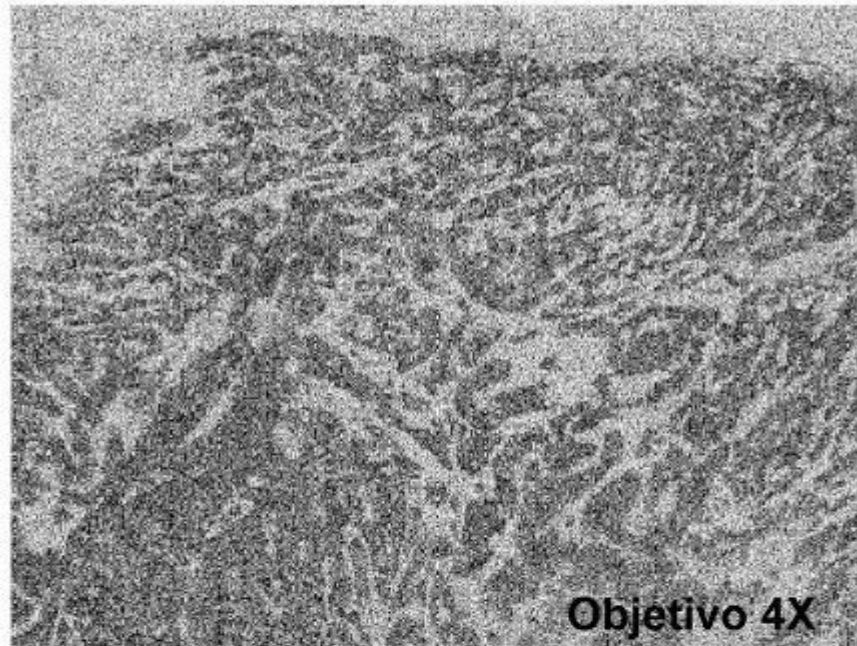


FIG. 1A

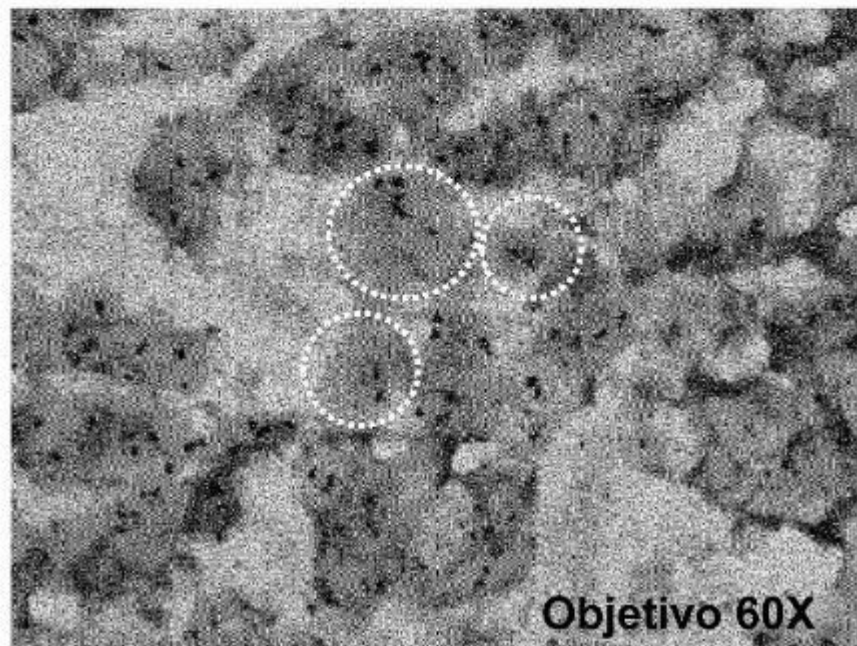


FIG. 1B

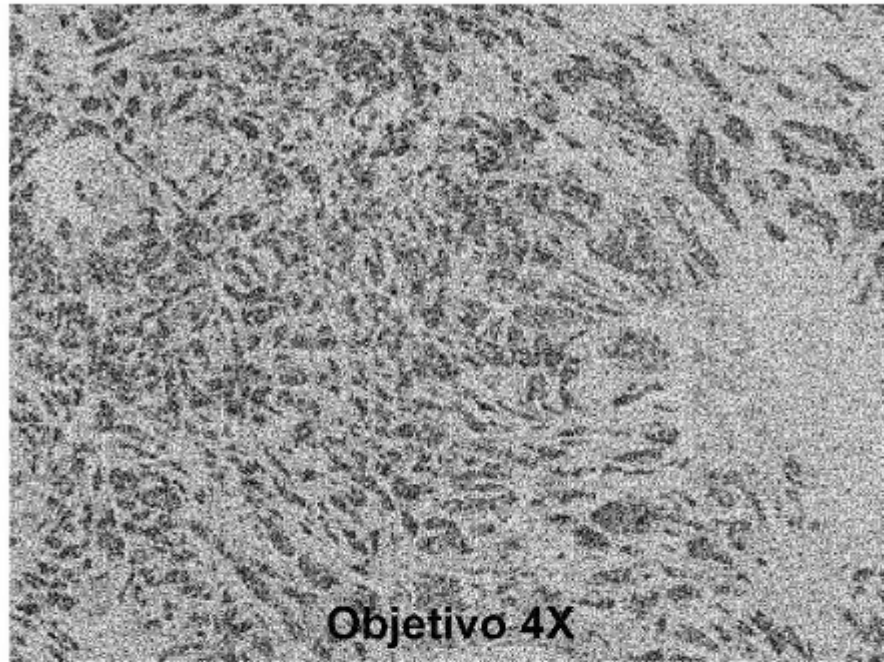


FIG. 2A

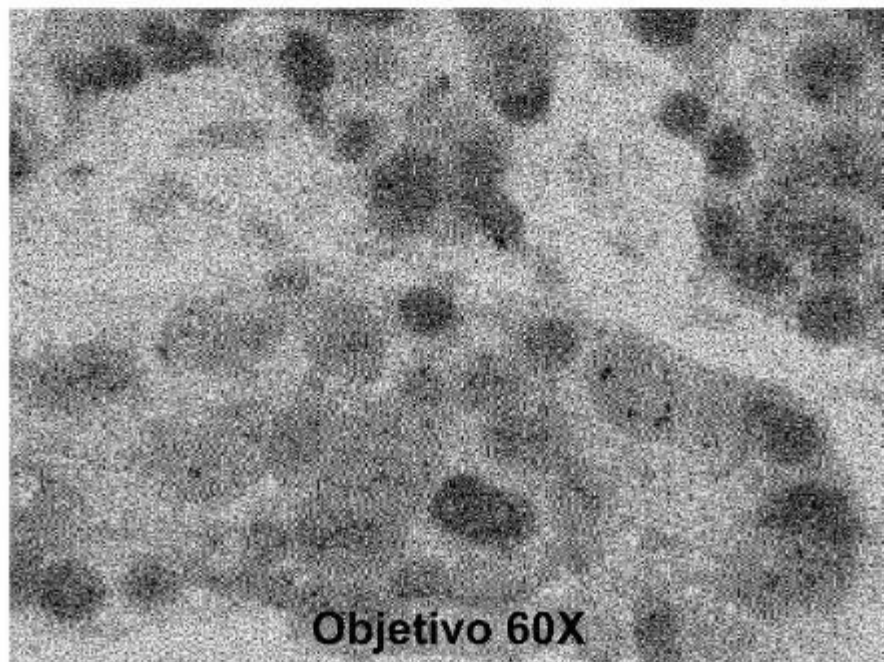


FIG. 2B

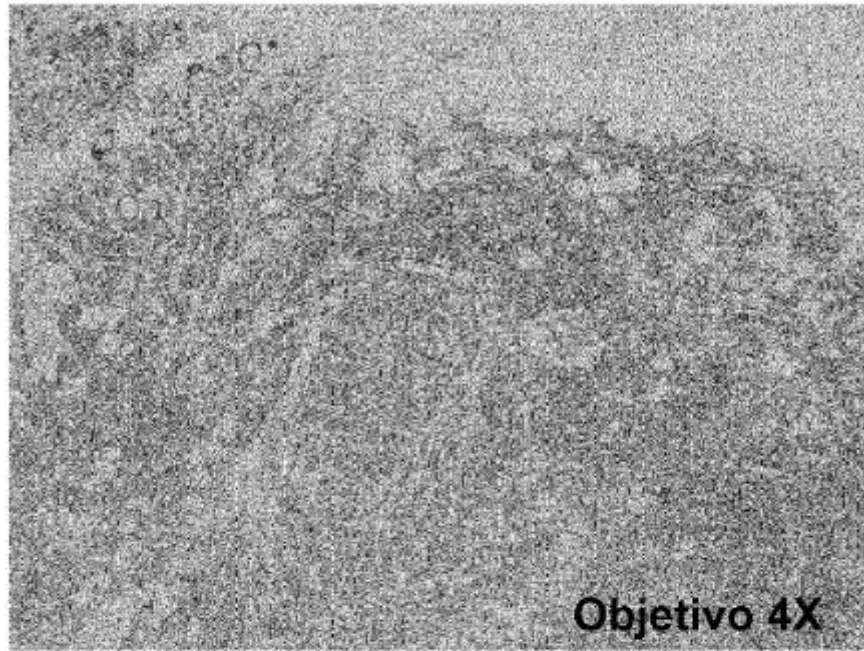


FIG. 3A

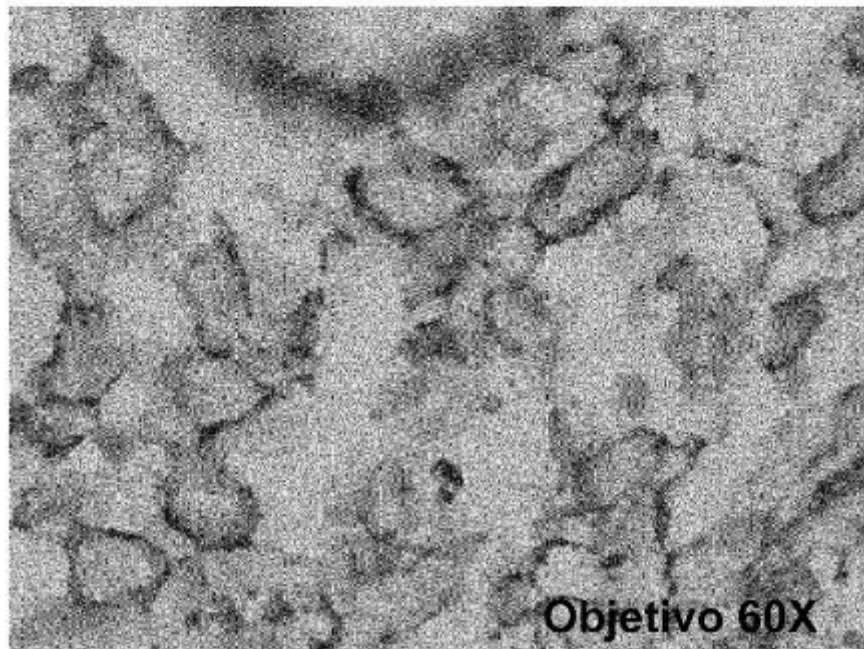


FIG. 3B

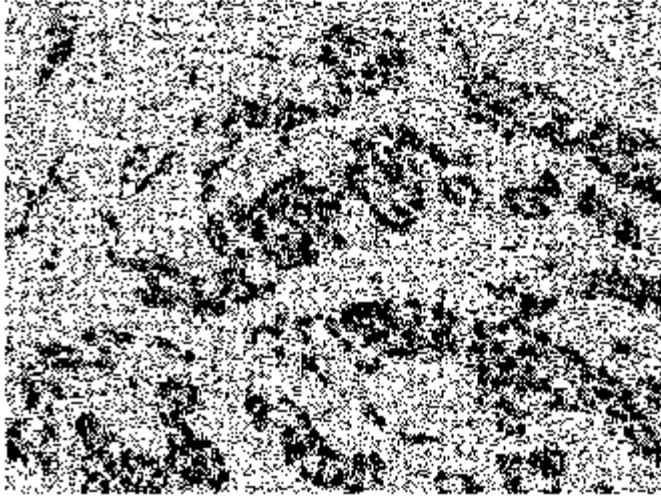


FIG. 4A

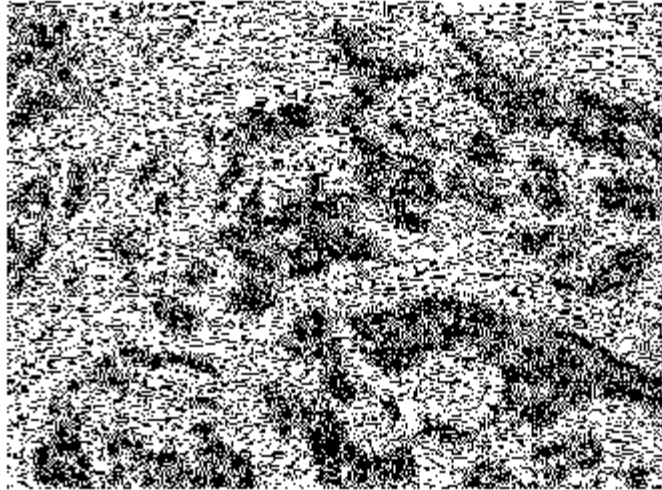


FIG. 4B

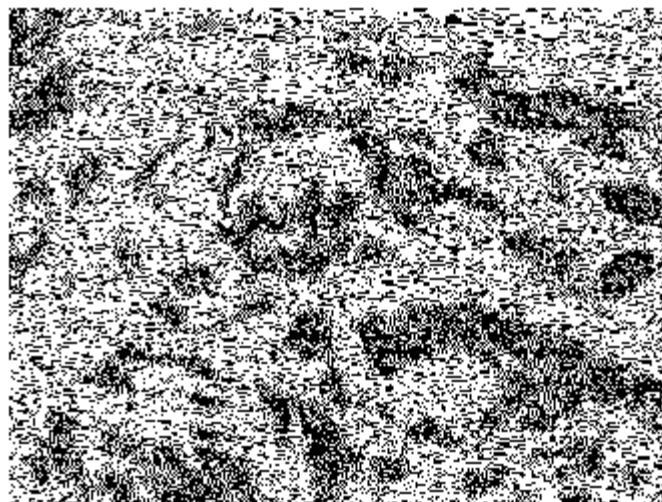


FIG. 4C

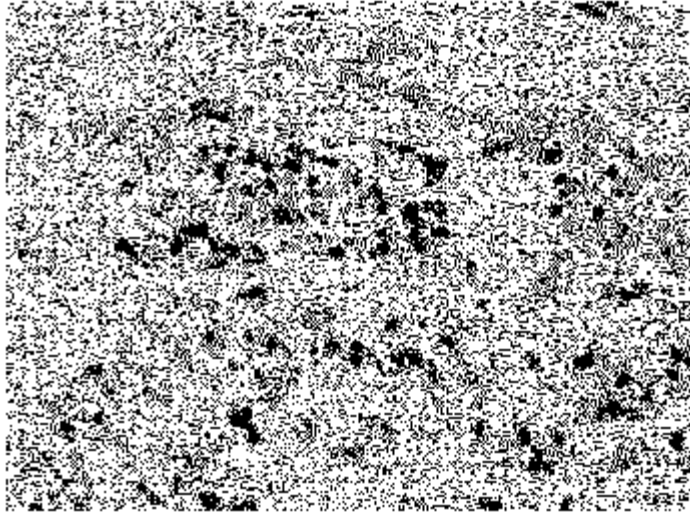


FIG. 5A

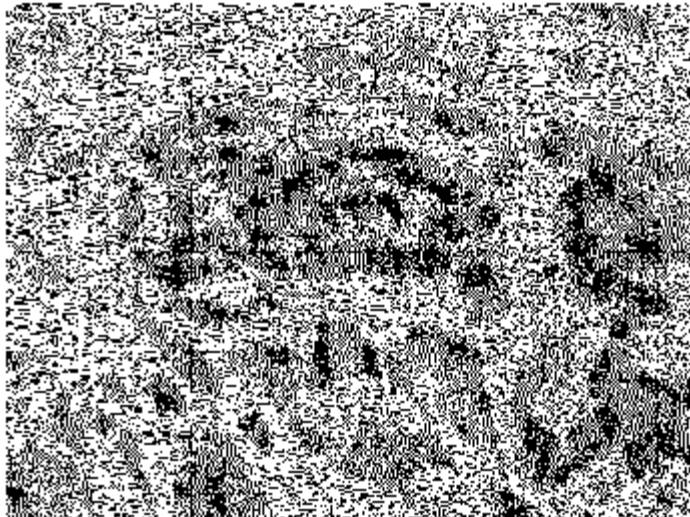


FIG. 5B

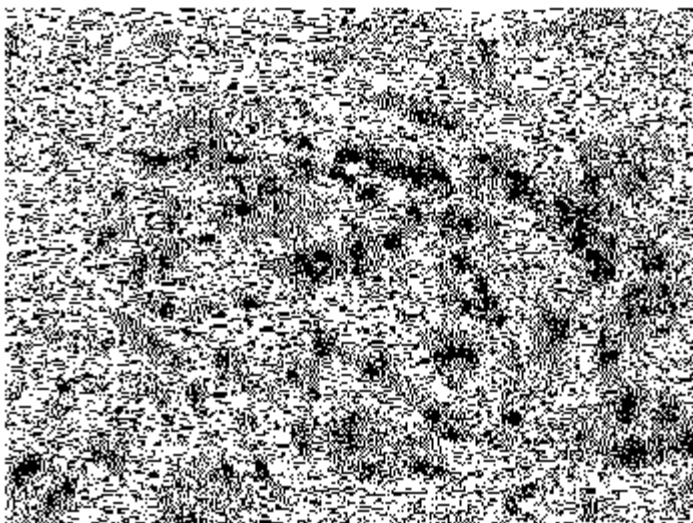


FIG. 5C

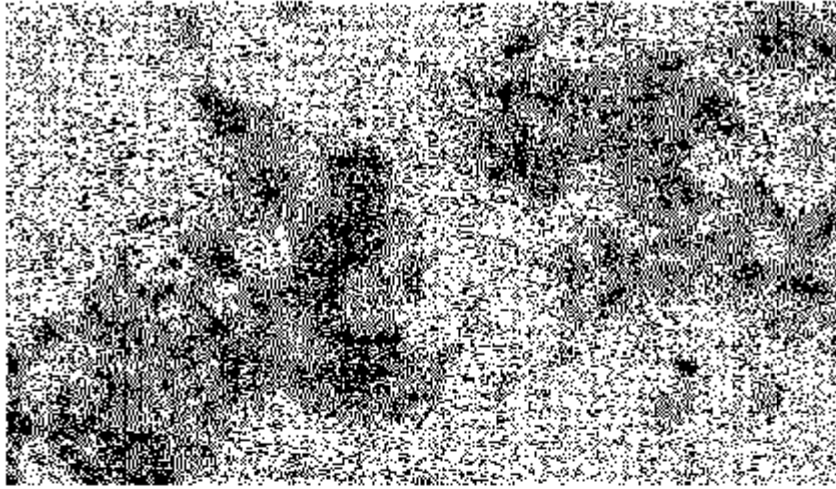


FIG. 6

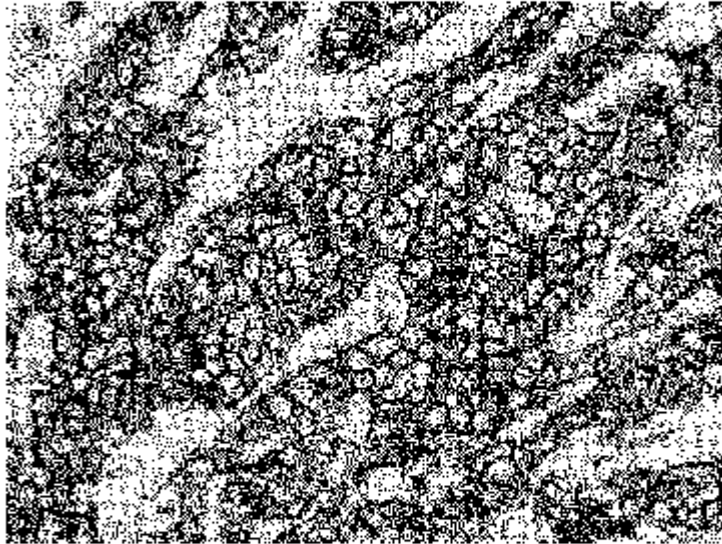


FIG. 7A



FIG. 7B



FIG. 7C

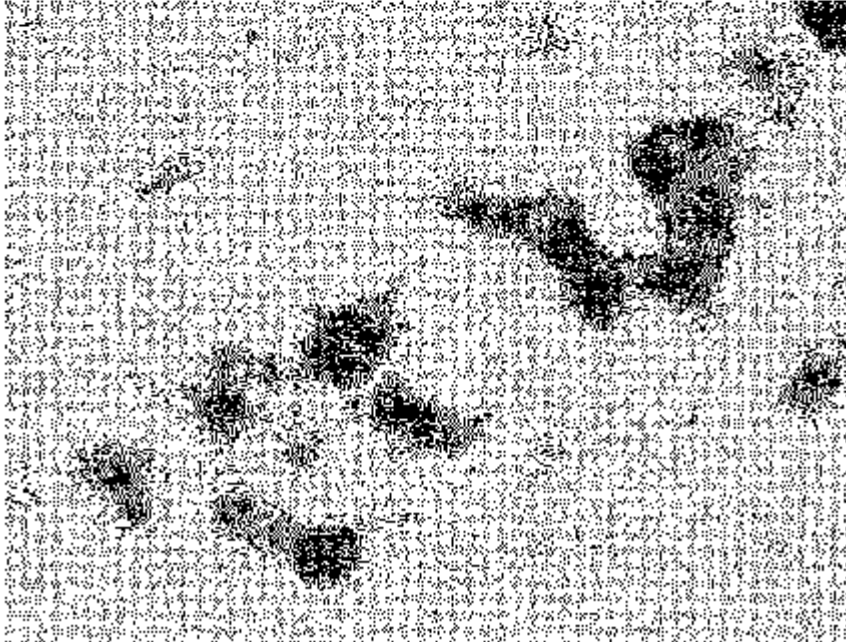


FIG. 7D

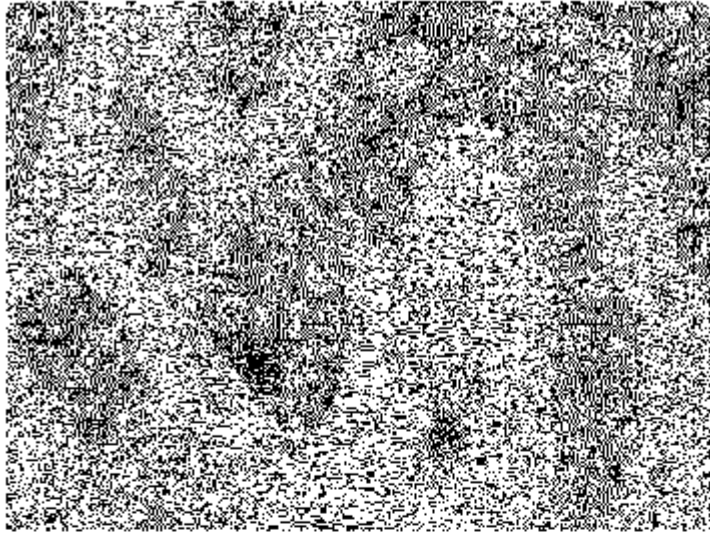


FIG. 8A

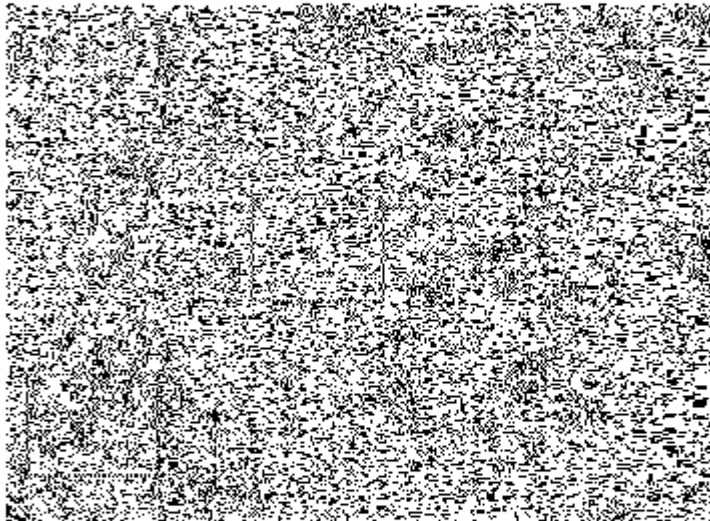


FIG. 8B

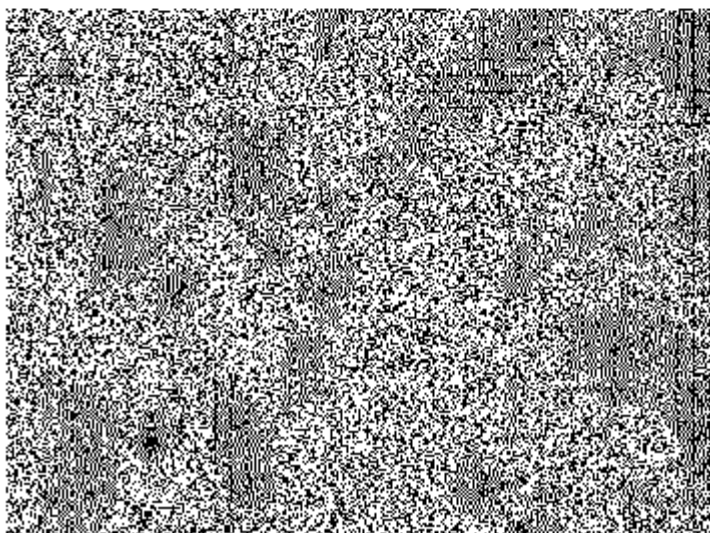


FIG. 8C



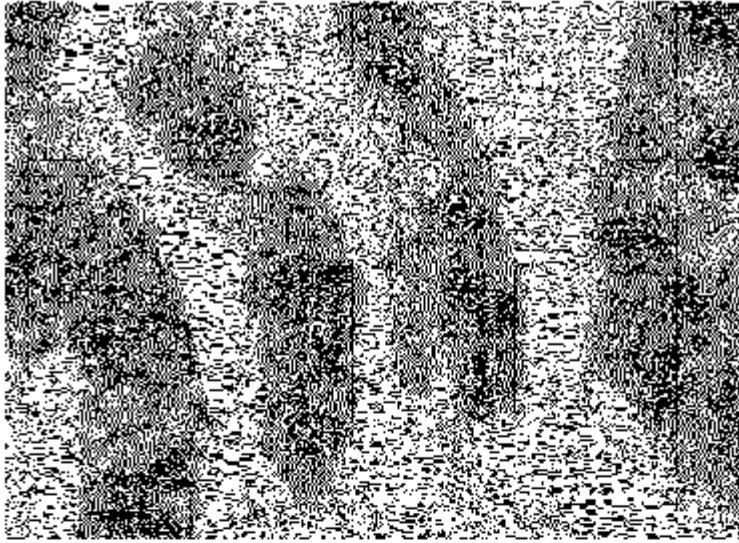


FIG. 9A

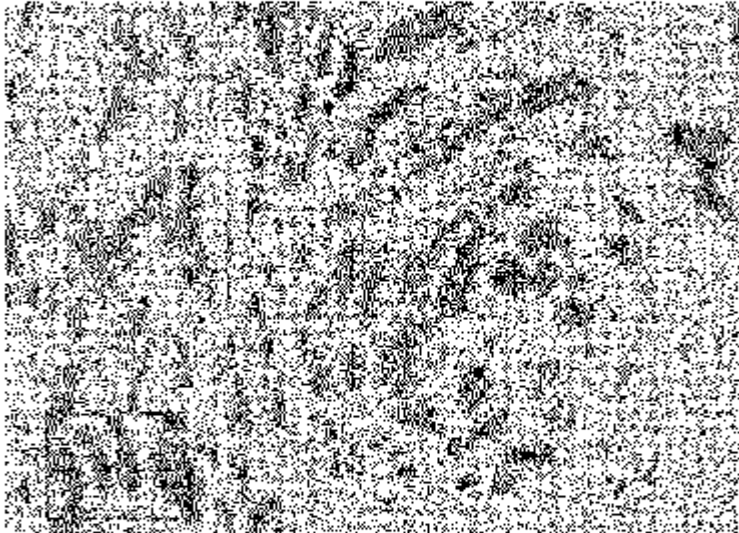


FIG. 9B

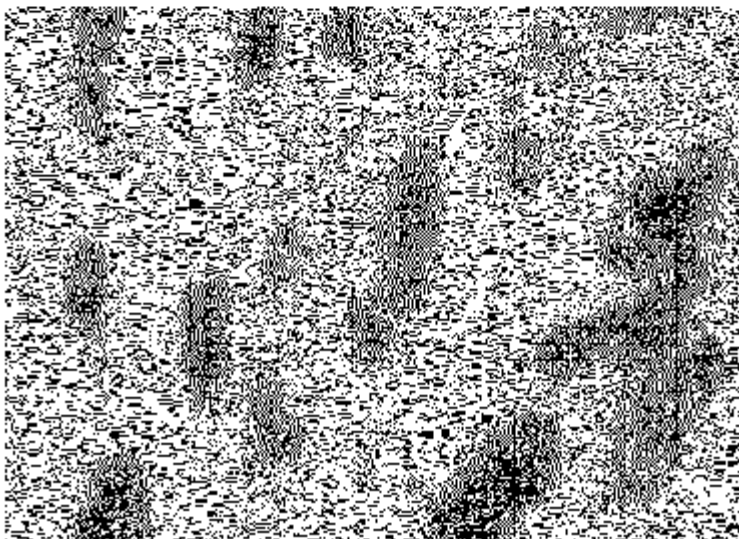


FIG. 9C

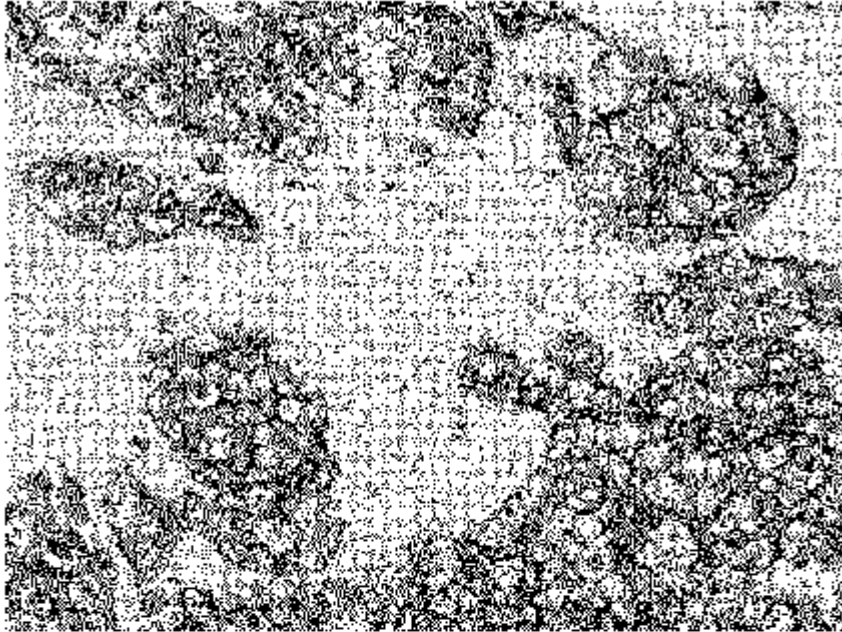


FIG. 10A

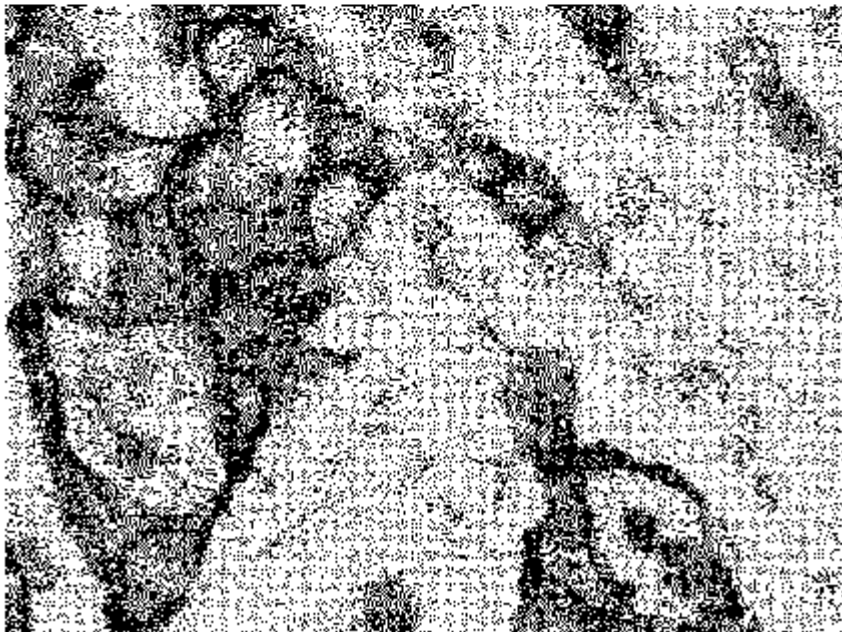


FIG. 10B

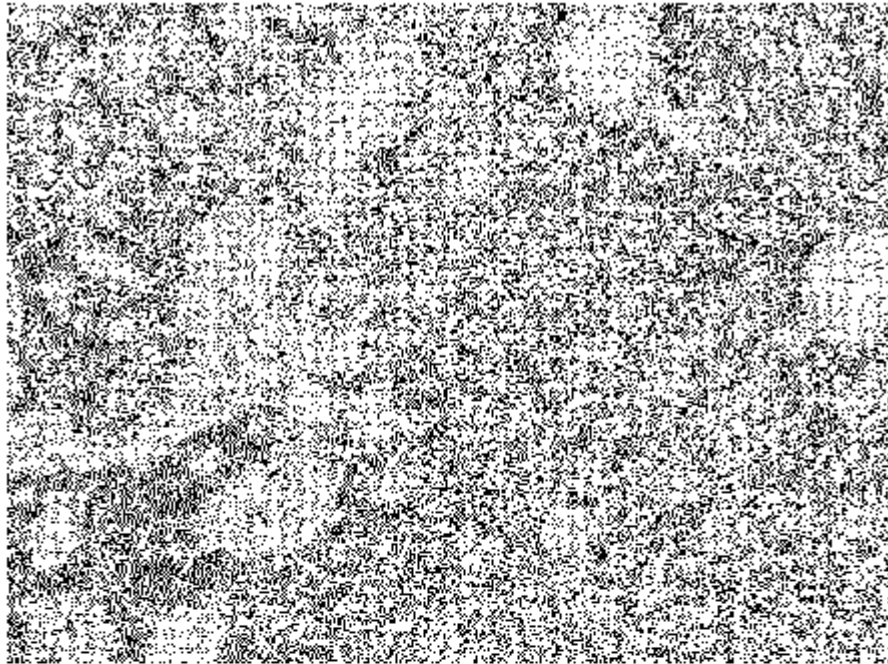


FIG. 11A



FIG. 11B

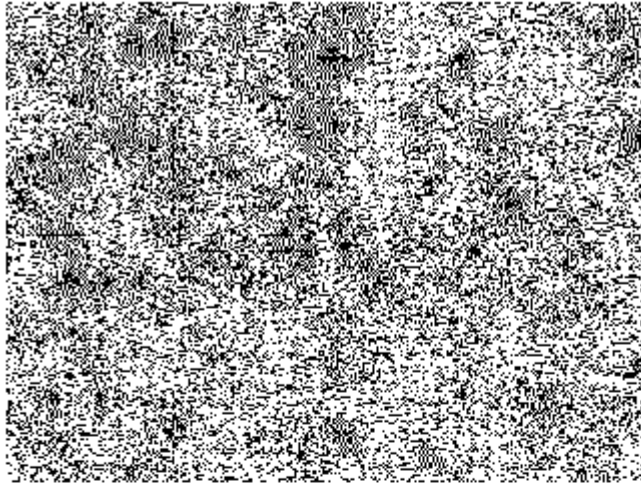


FIG. 12A

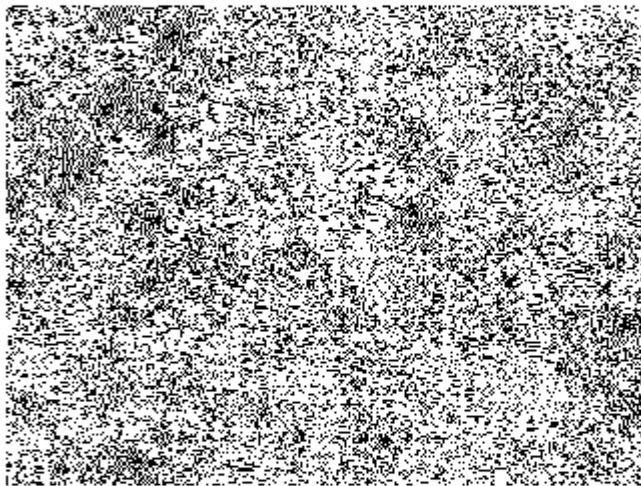


FIG. 12B

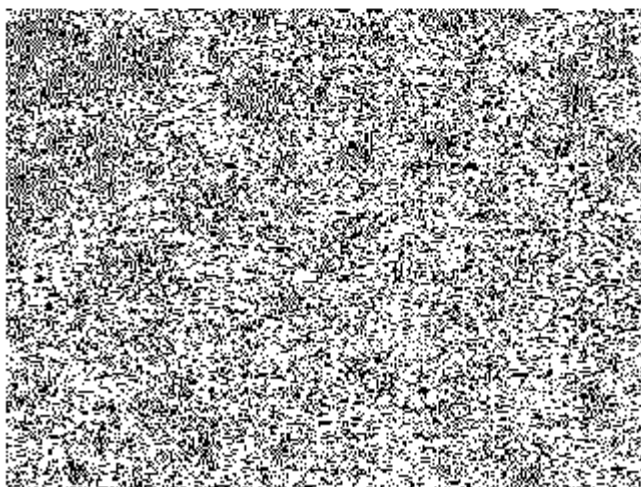


FIG. 12C

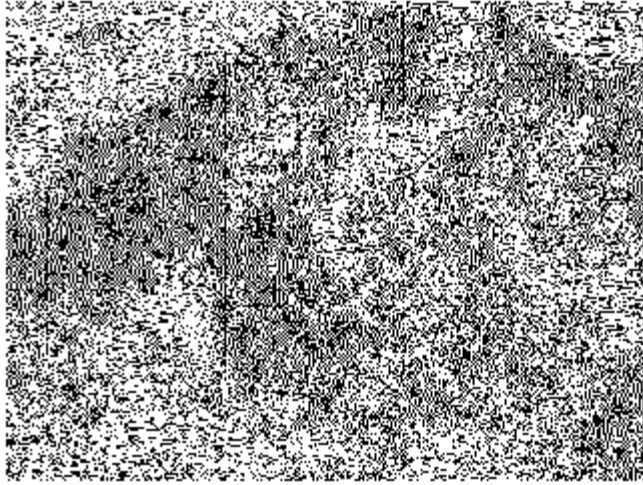


FIG. 13A

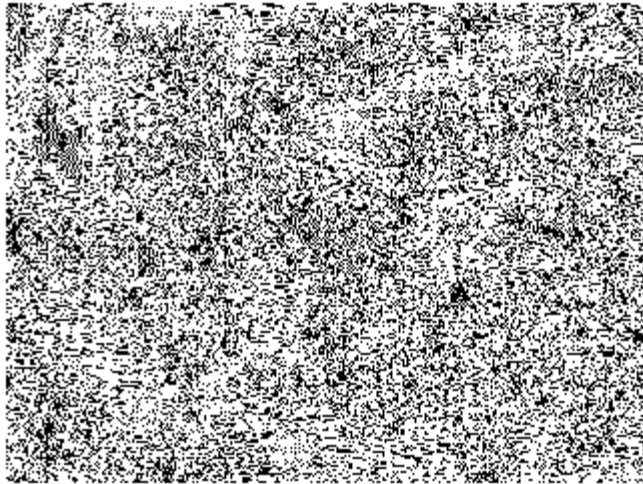


FIG. 13B

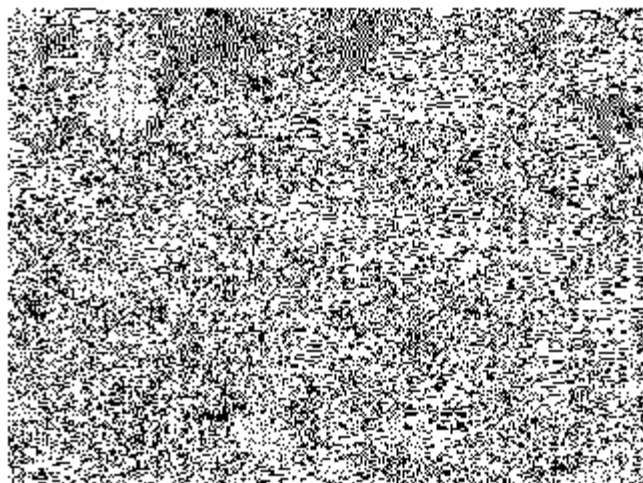


FIG. 13C

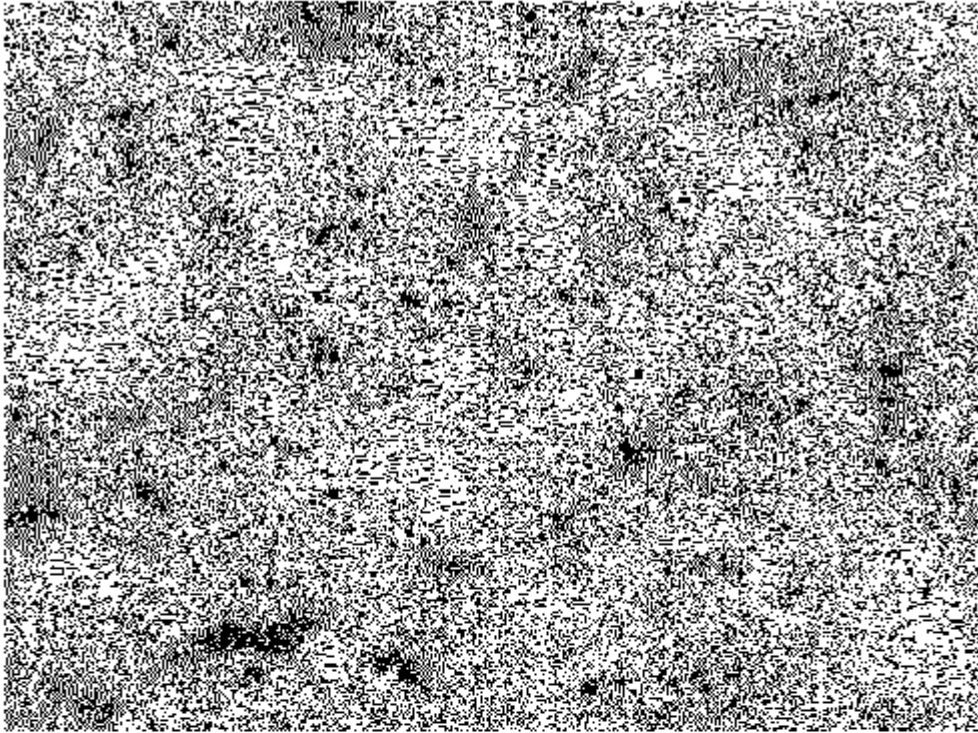


FIG. 14A

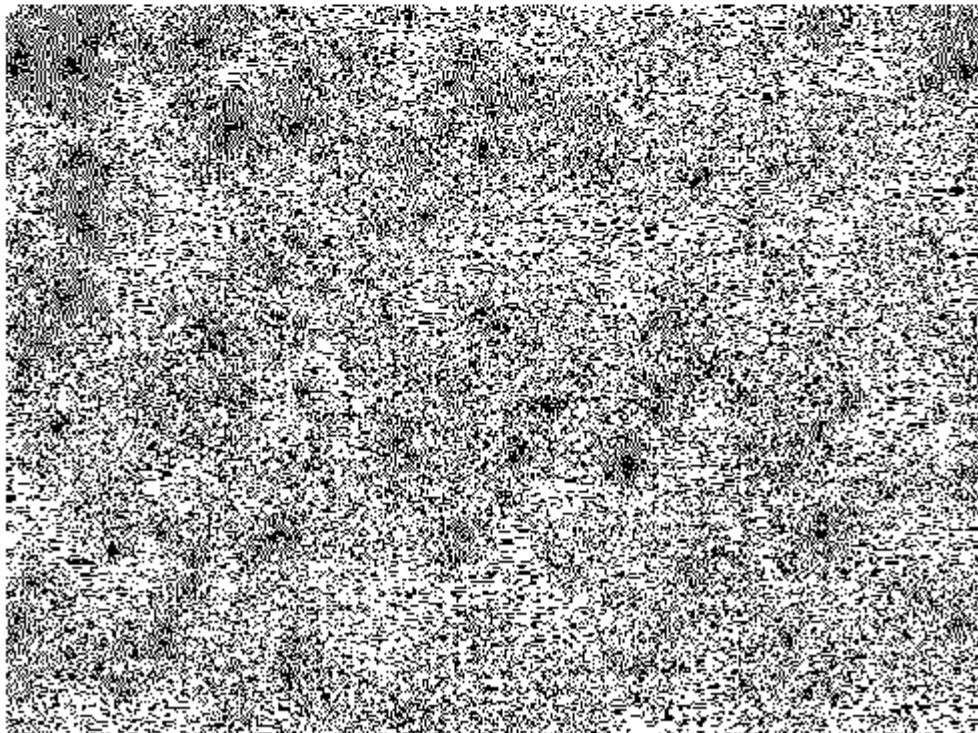


FIG. 14B

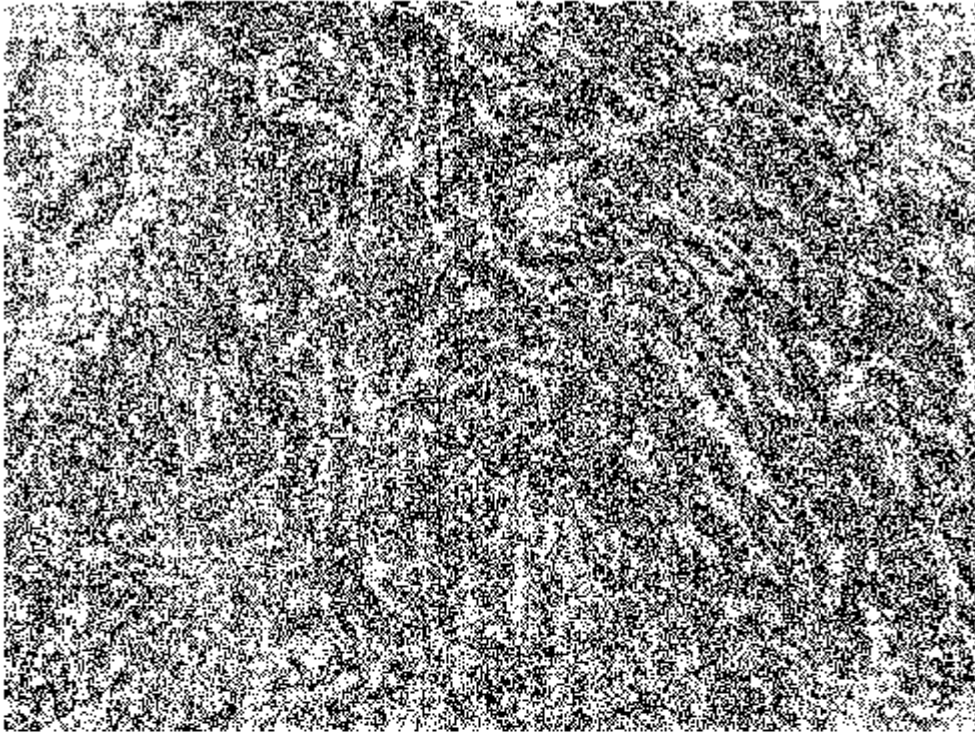


FIG. 15A

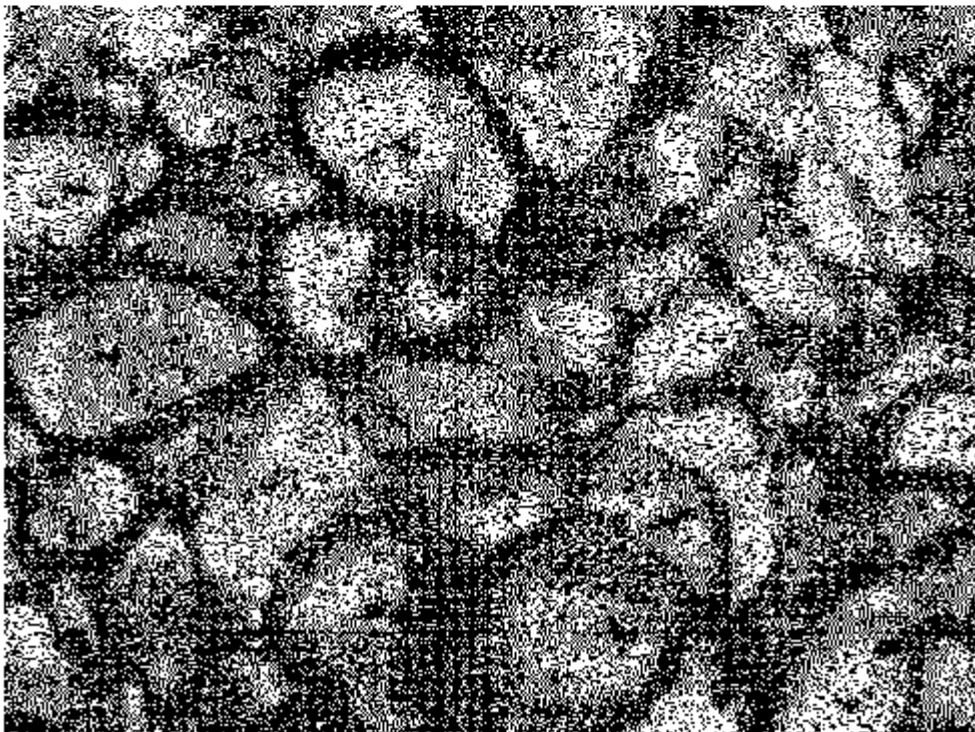


FIG. 15B

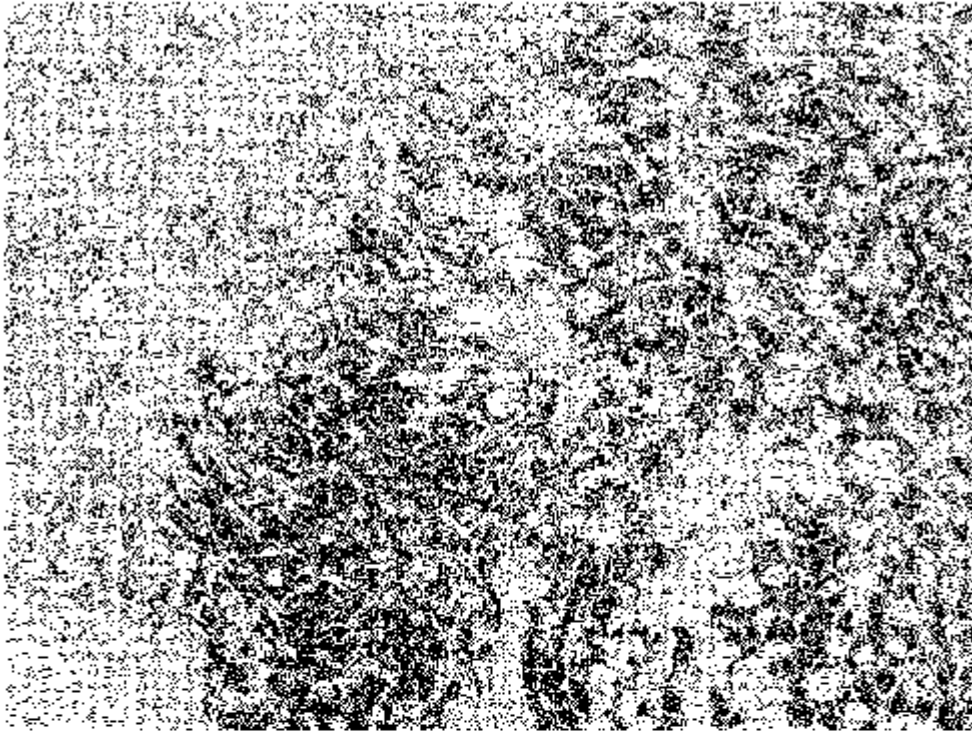


FIG. 16A

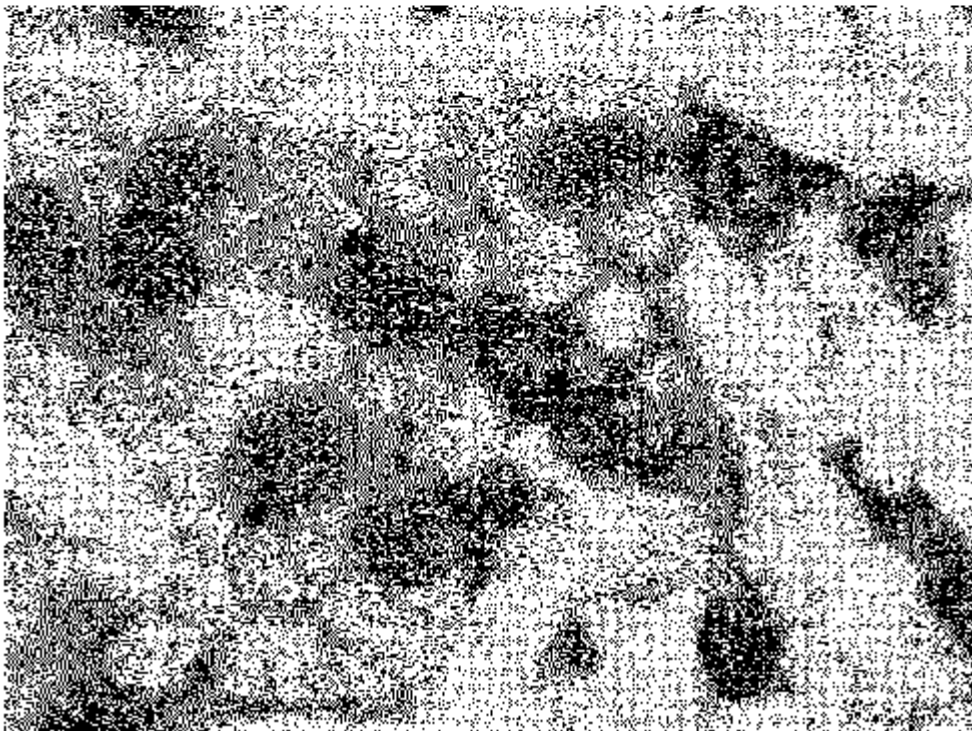


FIG. 16B



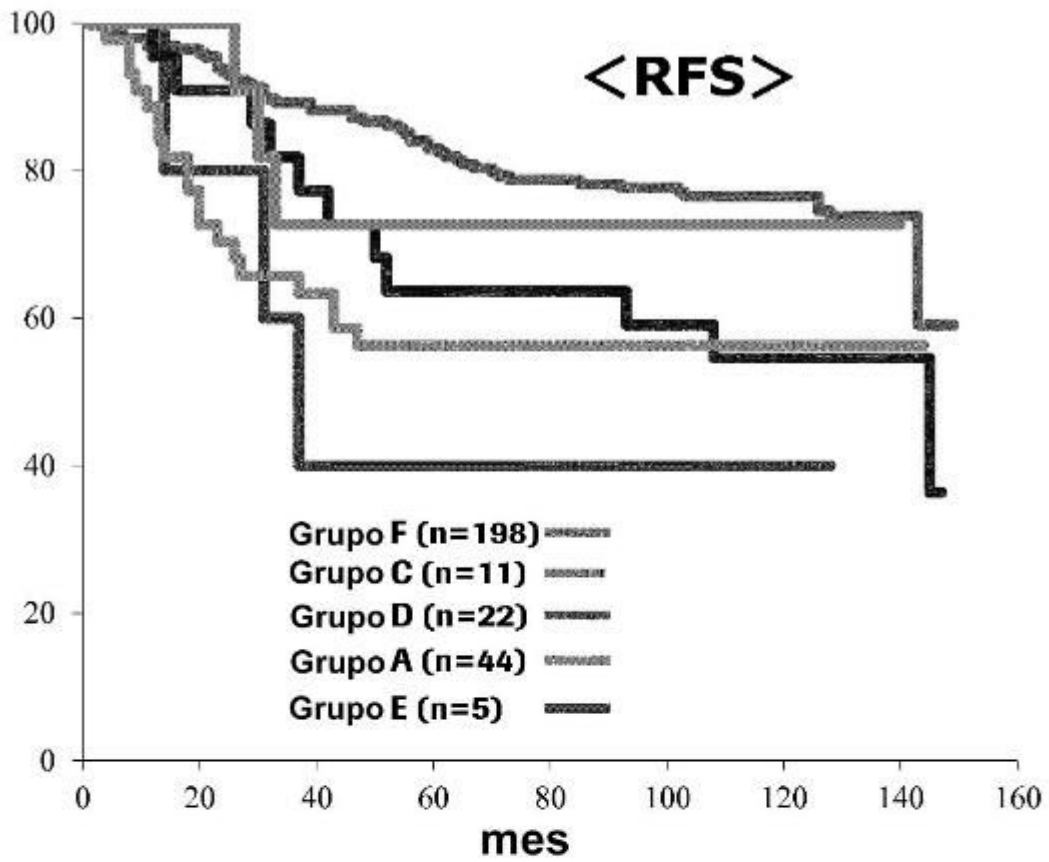


FIG. 17A

Grupo	A	C	D	E
C	HR: 1,18 p=0,2778			
D	HR: 0,10 p=0,7478	HR: 0,64 p=0,4251		
E	HR: 0,25 p=0,6148	HR: 1,40 p=0,2362	HR: 0,77 p=0,3806	
F	HR: 4,39 p=0,0025	HR: 0,05 p=0,8152	HR: 4,65 p=0,0310	HR: 5,34 p=0,0208

FIG. 17B

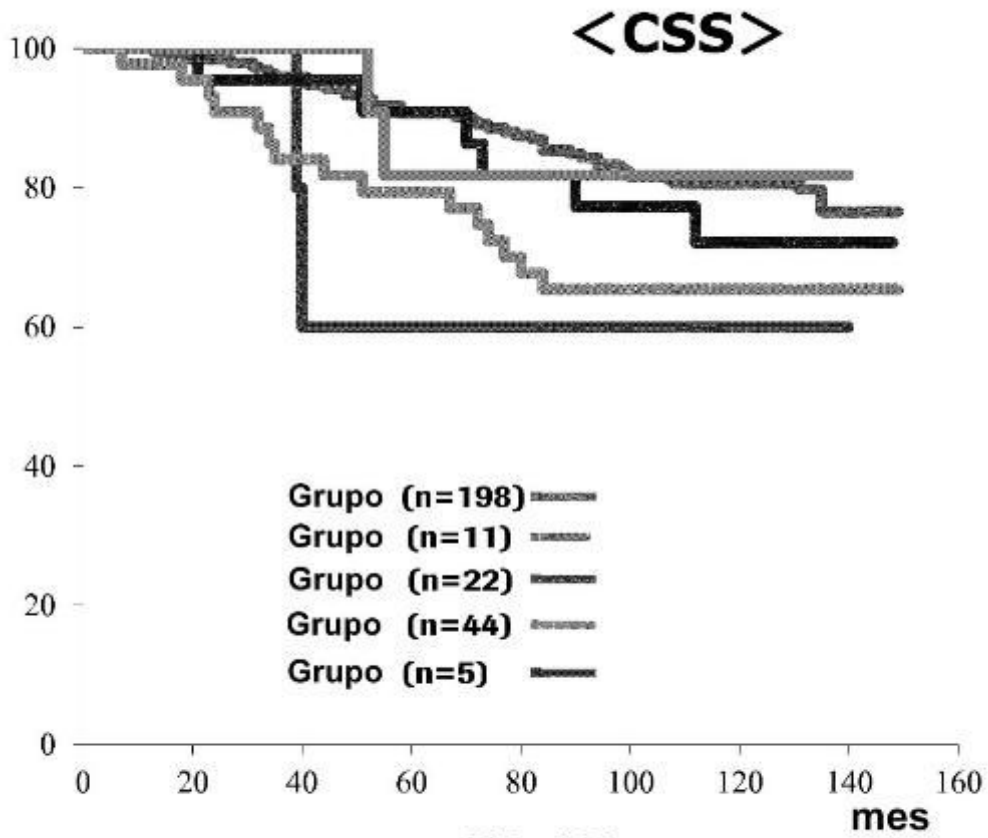


FIG. 18A

Grupo	A	C	D	E
C	HR: 1,06 p=0,3027			
D	HR: 0,51 p=0,4733	HR: 0,22 p=0,6388		
E	HR: 0,08 p=0,7794	HR: 1,26 p=0,2618	HR: 0,56 p=0,4560	
F	HR: 4,77 p=0,0290	HR: 0,01 p=0,3075	HR: 0,52 p=0,4717	HR: 1,83 p=0,1764

FIG. 18B

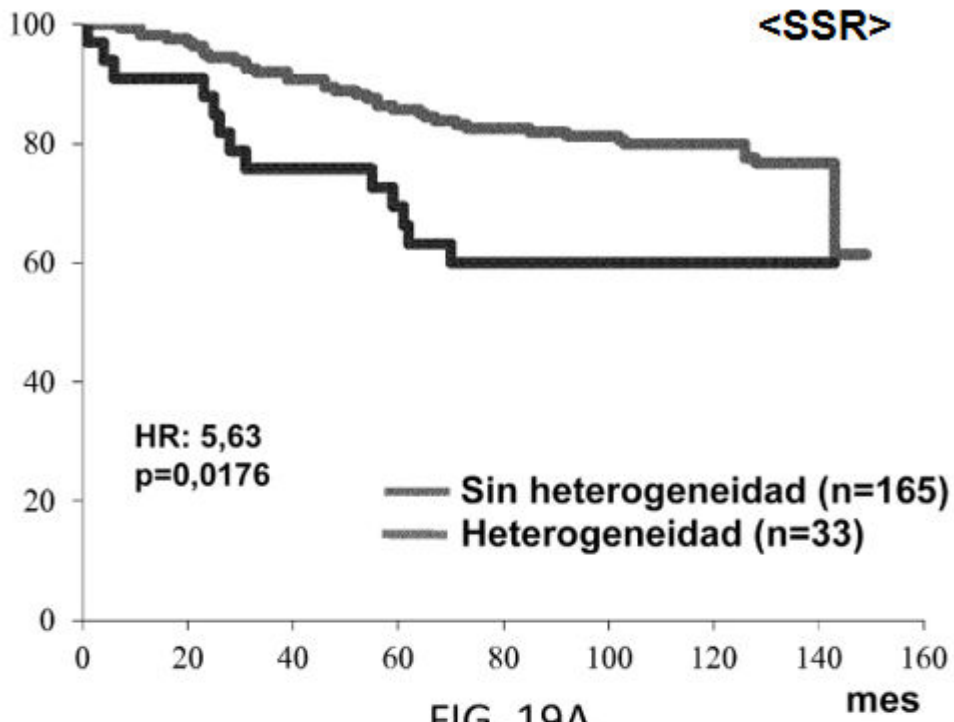


FIG. 19A

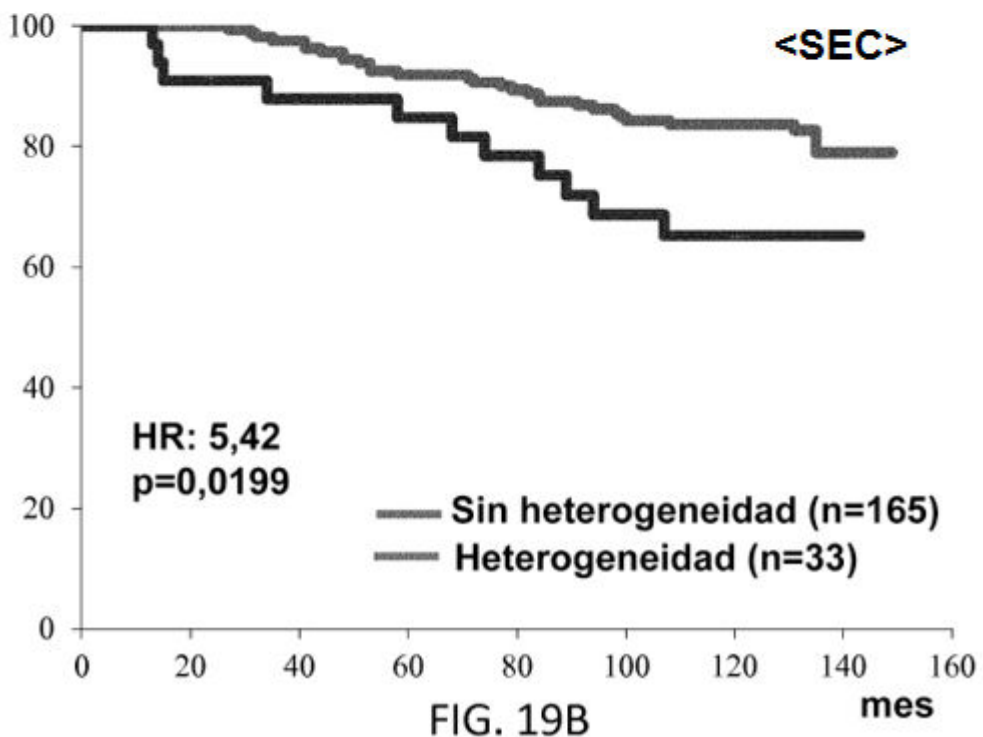
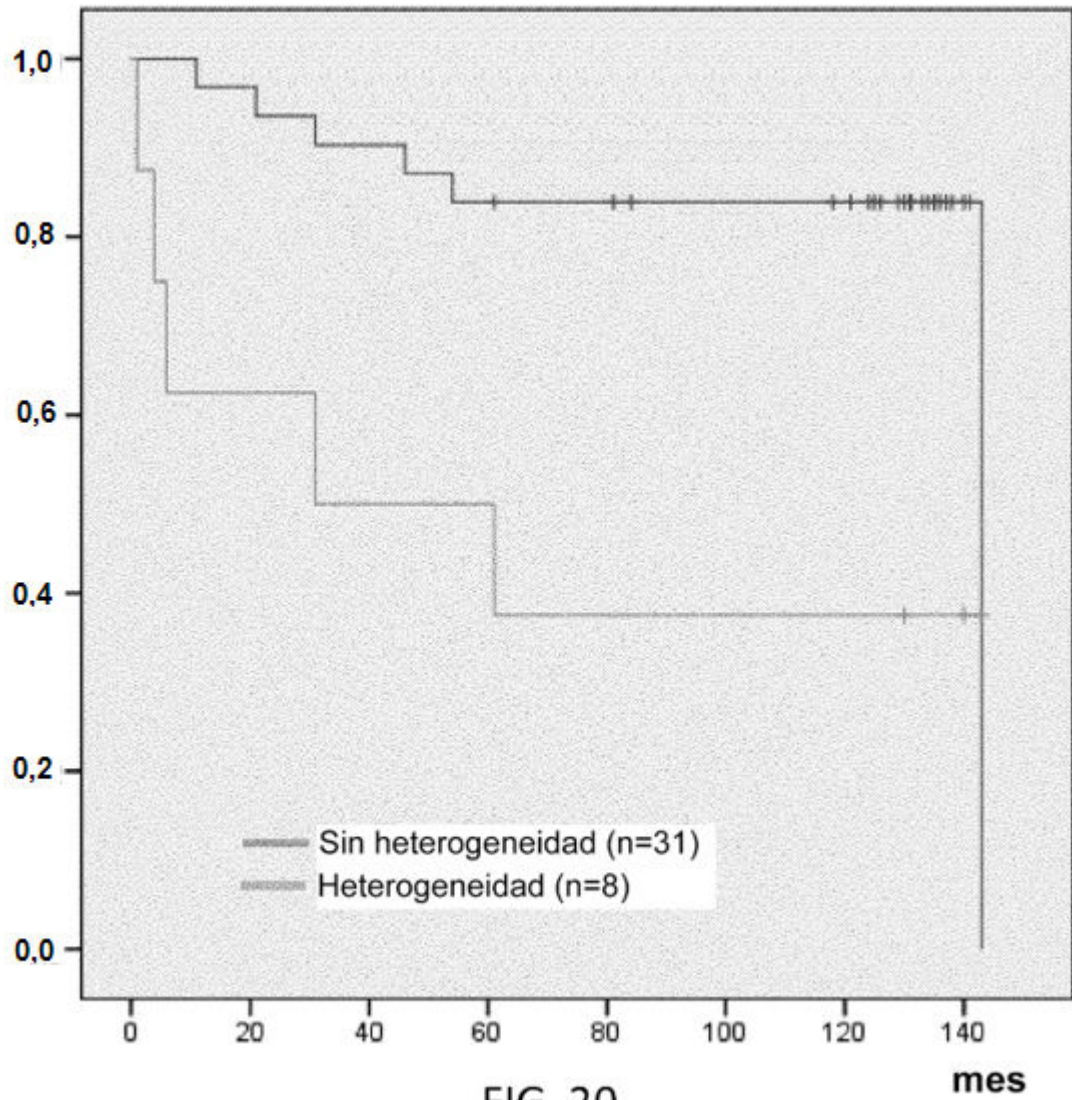


FIG. 19B



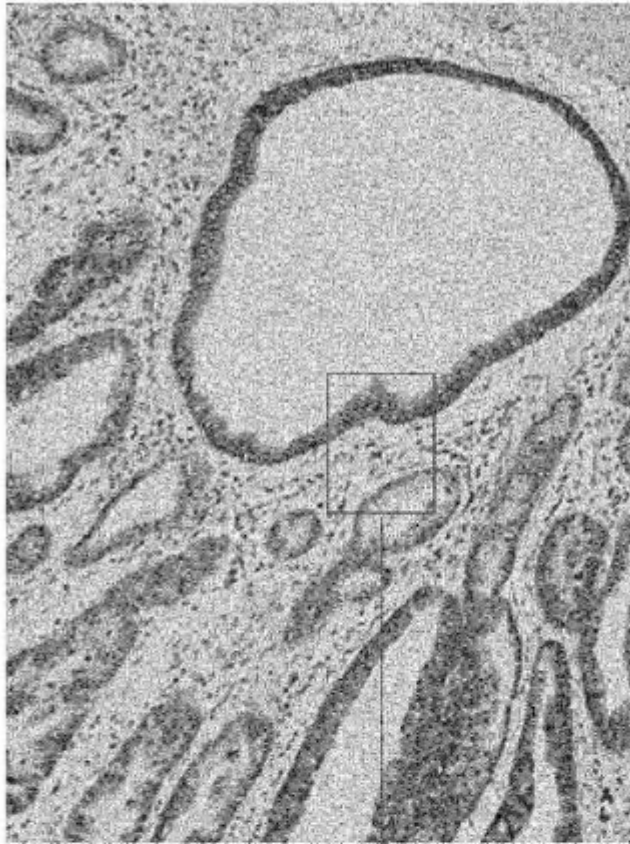


FIG. 21A

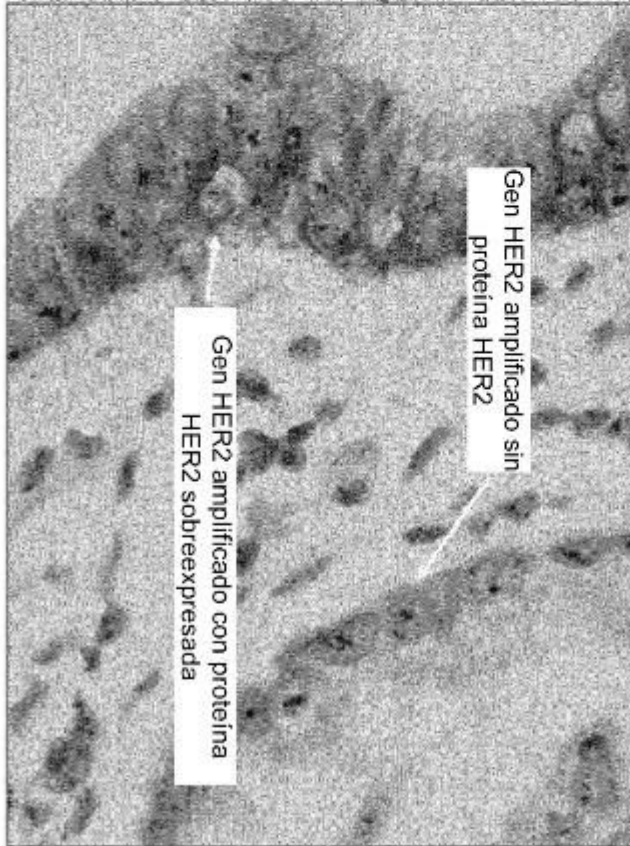


FIG. 21B