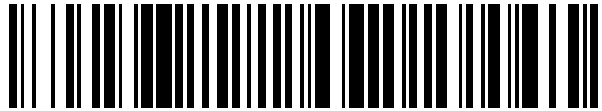


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2012** E 16189315 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** EP 3124975

54 Título: **Métodos para determinar la probabilidad de supervivencia y para predecir la probabilidad de metástasis en el cáncer**

30 Prioridad:

19.05.2011 US 201161488028 P

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

26.02.2019

73 Titular/es:

**LABORATORY CORPORATION OF AMERICA
HOLDINGS (100.0%)
358 South Main Street
Burlington, North Carolina 27215, US**

72 Inventor/es:

**BATES, MICHAEL;
HUANG, WEIDONG;
WEIDLER, JODI;
SPERINDE, JEFF y
HADDAD, MOJGAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 701 929 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para determinar la probabilidad de supervivencia y para predecir la probabilidad de metástasis en el cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención está relacionada en general con los métodos para cuantificar con precisión la expresión total de proteína HER2, o la expresión de la proteína HER2 y la expresión de la proteína p95, en pacientes con cáncer HER2-positivo, como es un cáncer de mama avanzado, y correlacionar la expresión de la proteína HER2, o la expresión de la proteína HER2 y la expresión de la proteína p95 con el riesgo de recidiva cerebral en tales pacientes.

Antecedentes de la invención

- 10 Las metástasis cerebrales que acompañan al cáncer de mama están asociadas a deficiencias notables en el pronóstico. Las metástasis cerebrales afectan de forma importante a la calidad de vida y son relativamente resistentes a las terapias sistémicas. El cáncer de mama es la segunda causa más frecuente de las metástasis cerebrales.

- 15 A pesar de que todavía no se conoce plenamente la causa biológica, los pacientes con cáncer de mama HER2-positivo tienen un riesgo particularmente elevado de sufrir metástasis cerebrales. Sin embargo, hasta la fecha no se han documentado características clínicas ni biológicas constantemente asociadas con la propensión a desarrollar una recidiva cerebral en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo avanzado. Tampoco se ha desarrollado ningún marcador molecular sólido para predecir la recidiva cerebral.

- 20 Las metodologías actuales para determinar el estado de HER2 incluyen la inmunohistoquímica (IHC) para detectar la sobreexpresión de la proteína de HER2, la hibridación in situ fluorescente (FISH), o la hibridación in situ cromogénica para detectar la amplificación del gen HER2. Sin embargo, todavía existe una importante polémica acerca de la precisión, fiabilidad y variabilidad entre observadores de estos métodos de ensayo. Por ejemplo, la valoración de la expresión de HER2 mediante IHC es inherentemente subjetiva y semicuantitativa (se puntúa como 0, 1+, 2+, 3+). La prueba FISH, en la que se hace un recuento del número de copias del gen HER2, es más analítica desde un punto de vista cuantitativo, pero numerosos estudios clínicos no han conseguido demostrar una relación entre el número de copias del gen HER2 y la respuesta al tratamiento clínico. Utilizando las técnicas disponibles actualmente, se calcula que aproximadamente el 20% de las pruebas de HER2 pueden ser imprecisas.

- 25 En estos momentos, el componente estándar de la terapia sistémica en los pacientes con cáncer de mama HER2-positivo es el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular del receptor de HER2. Sin embargo, debido al elevado peso molecular (aprox. 145 000 Da) y a sus propiedades físicas y químicas, el trastuzumab no cruza la barrera hematoencefálica y es poco efectivo para prevenir y tratar la metástasis cerebral. Por otra parte, un subgrupo de tumores con sobreexpresión de HER2 también presenta p95 HER2 (p95), una versión truncada N-terminal de HER2 que se ha despojado del ectodominio. Dado que el trastuzumab se une al ectodominio de HER2, no se puede unir a la proteína de HER2 truncada p95, por lo que el trastuzumab no es efectivo en
35 pacientes con elevados niveles de p95.

- Dado que el cáncer es una enfermedad muy compleja, muchas terapias dirigidas nuevas, a pesar de que resultan extremadamente efectivas en algunos pacientes individuales, tienen una efectividad limitada en la población general de pacientes para un cáncer concreto. Sin los conocimientos oportunos sobre el paciente, los proveedores sanitarios puede que no sean capaces de seleccionar una terapia dirigida efectiva para el paciente. Por ejemplo, algunos
40 pacientes con cáncer de mama avanzado pueden tener un riesgo más elevado de metástasis cerebral, pero el tratamiento que están recibiendo puede resultar inapropiado para prevenir o tratar la metástasis cerebral.

Gabos *et al.*, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, n.º 36, 2006, páginas 3658-5663, analizó el riesgo de metástasis cerebral en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo recién diagnosticado en comparación con pacientes HER2-negativos.

- 45 Duchnowska *et al.*, *European Journal of Cancer*, vol. 6, n.º 7, 2008, página 193, determinó que la aparición de una recidiva cerebral temprana en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo está asociada con la expresión de numerosos genes en el tejido tumoral.

Bodey *et al.*, *IN VIVO*, vol. 19, n.º 5, 2005, páginas 931-942, investigó la expresión de HER2 y otros miembros de la familia en los tumores cerebrales.

- 50 Loussouam *et al.*, *Human Pathology*, vol. 37, n.º 4, 2005, páginas 415 - 421, estudió la expresión de la proteína de HER2 y la amplificación del gen HER2 en meningiomas y evaluó su valor pronóstico.

Wickremesekera *et al.*, *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 17, n.º 9, 2010, páginas 1155-1158, asoció un potencial papel para HER2 en la tumorigénesis benigna del meningioma.

- 55 Saez *et al.*, *Clinical Cancer Research*, vol. 12, n.º 2, 2006, páginas 424 - 431, estudió el valor pronóstico de p95 en el cáncer de mama.

Scaltriti *et al.*, National Cancer Institute Journal, vol. 99, n.º. 8, 2007, páginas 628-638, investigó los tumores de mama que expresan p95 y su respuesta al trastuzumab.

Desmedt *et al.*, Diagnostic Molecular Pathology, vol. 18, n.º 1, 2009, páginas 22-29, investigó la medición de HER2 en pacientes con cáncer de mama metastásico.

- 5 Por tanto, se necesita un método para cuantificar con precisión la expresión total de HER2 o p95 y un método para correlacionar el nivel de HER2 o p95 con el riesgo de recidiva cerebral en pacientes con cáncer de mama avanzado. Se necesitan asimismo métodos para identificar estrategias de tratamiento terapéutico específicamente adaptadas a la subpoblación de pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo. También son necesarios métodos para seleccionar un plan de tratamiento para un individuo con un cáncer HER2-positivo y para controlar el progreso de un plan de tratamiento.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método (i) para identificar sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían ser examinados para descartar la metástasis cerebral; (ii) para identificar sujetos con un cáncer HER2-positivo que deberían recibir tratamiento con un agente que actúe sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer; (iii) para determinar un tiempo previsto hasta la metástasis cerebral (TTBM) en un sujeto con un cáncer HER2-positivo; (iv) para determinar la probabilidad relativa de que un sujeto con cáncer HER2-positivo corra el riesgo de desarrollar metástasis cerebral; y/o (v) para determinar si un sujeto con cáncer HER2-positivo se encuentra dentro de un subconjunto de sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían ser examinados para descartar la metástasis cerebral, que consiste en lo siguiente:

- 20 (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenido del cáncer del sujeto;
- (b) medir la cantidad de HER2 en la muestra biológica;
- (c) determinar si la cantidad de proteína HER2 en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, donde el límite ha sido determinado en base a la medición de la cantidad de proteína HER2 en muestras biológicas de una población sujeto, y el límite divide a las muestras de la población sujeto en dos subgrupos de pacientes distintos; y
- 25 (d) (i) indicar que el sujeto debería ser examinado para descartar la metástasis cerebral si la cantidad de proteína HER2 se encuentra por encima del límite de HER2;
- (ii) indicar que el sujeto debería recibir tratamiento con un agente que actúe sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer en caso de que la cantidad de proteína HER2 se encuentre por encima del límite de HER2;
- 30 (iii) indicar el TTBM previsto del sujeto en base a la incidencia de la metástasis cerebral a lo largo del tiempo en una población de referencia con unos niveles de proteína HER2 superiores o inferiores al límite de HER2;
- (iv) indicar que, si la cantidad de proteína HER2 en la muestra biológica es superior al límite de HER2, es más probable que el sujeto corra el riesgo de desarrollar metástasis cerebral; y/o
- 35 (v) indicar que el sujeto debería ser examinado para descartar la metástasis cerebral si la cantidad de proteína HER2 se encuentra por encima del límite de HER2. En algunas realizaciones de la invención, el cáncer del sujeto se ha caracterizado como HER2-positivo en base a los niveles elevados de expresión del gen HER2, del nivel de proteína HER2 o de la amplificación del gen HER2.
- En algunas realizaciones de la invención, el cáncer del sujeto comprende un cáncer de mama, preferiblemente un cáncer de mama primario.
- 40 En algunas realizaciones de la invención, el sujeto se ha sometido a tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 que no cruza la barrera hematoencefálica.
- En algunas realizaciones de la invención, el agente que actúa sobre HER2 es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente donde el anticuerpo monoclonal es trastuzumab.
- 45 En algunas realizaciones de la invención, el límite de HER2 comprende al menos uno de los elementos siguientes:
- (i) una cantidad media de proteína HER2 determinada en una población de referencia de sujetos con un cáncer de mama HER2-positivo; o
- (ii) una cantidad optimizada de HER2 determinada en una población de referencia de sujetos con un cáncer de mama HER2-positivo.
- 50 En algunas realizaciones, la invención comprende además medir la cantidad de proteína p95 en la muestra biológica; y determinar si la cantidad se sitúa por encima de un límite de p95.
- En algunas realizaciones de la invención, el límite de p95 comprende por lo menos uno de los elementos siguientes:
- (i) una cantidad media de p95 determinada en una población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo; o

(ii) una cantidad optimizada de p95 determinada en una población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo.

En algunas realizaciones de la invención, la población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo se ha sometido a tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 que no cruza la barrera hematoencefálica.

5 En algunas realizaciones de la invención dirigidas a métodos para identificar sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían recibir tratamiento con un agente que activa HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer, la segunda forma de tratamiento para el cáncer comprende un fármaco de moléculas pequeñas dirigidas a HER2, quimioterapia y/o radioterapia.

10 En algunas realizaciones de la invención dirigidas a métodos para la determinación del tiempo previsto hasta la aparición de metástasis cerebrales (TTBM) en un sujeto con un cáncer HER2-positivo, si la cantidad de HER2 de la muestra biológica se encuentra por encima del límite de HER2, las probabilidades del sujeto de estar libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 73% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 61% al cabo de aproximadamente dos años, y aproximadamente del 37% al cabo de aproximadamente tres años; o si la cantidad de HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2, las probabilidades de que el sujeto esté libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 89% tras aproximadamente un año, aproximadamente del 78% al cabo de aproximadamente de dos años, y aproximadamente del 69% al cabo de aproximadamente tres años.

15 En algunas realizaciones de la invención dirigidas a determinar un tiempo previsto hasta la metástasis cerebral (TTBM) en un sujeto con un cáncer HER2-positivo, si la cantidad de HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2 y la cantidad de proteína p95 se encuentra por encima del límite de p95, las probabilidades del sujeto de estar libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 80% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 66% en el plazo aproximado de dos años, y aproximadamente del 50% en el plazo aproximado de tres años; o si la cantidad de HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2, y la cantidad de p95 se encuentra por debajo del límite de p95, las probabilidades de que el sujeto esté libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 94% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 86% en el plazo aproximado de dos años, y aproximadamente del 80% en el plazo aproximado de tres años.

20 En algunas realizaciones de la invención dirigidas a métodos para determinar un tiempo previsto hasta la aparición de metástasis cerebrales (TTBM) en un sujeto con cáncer HER2-positivo, el sujeto tiene aproximadamente 2,6 veces más riesgo de metástasis cerebrales si la cantidad de HER2 en la muestra biológica está por encima del límite de HER2, en comparación con cuando la cantidad está por debajo del límite de HER2.

25 En algunas realizaciones de la invención dirigidas a métodos de determinación de un tiempo previsto hasta la aparición de metástasis cerebrales (TTBM) en un sujeto con un cáncer HER2-positivo, el sujeto tiene un riesgo 5,7 veces menor de metástasis cerebrales si el cáncer del sujeto es de Grado 1 o 2, y la cantidad de HER2 en la muestra biológica está por debajo del límite de HER2, en comparación con lo que sucede si el cáncer del sujeto es de Grado 3, o el cáncer del sujeto es de Grado 1 o 2 y la cantidad de HER2 en la muestra biológica está por encima del límite de HER2.

Breve descripción de las figuras

30 En las siguientes figuras se presentan ejemplos de realizaciones no limitantes de los métodos y sistemas de la invención.

35 La Figura 1 muestra dos ejemplos de formatos de ensayo basados en la tecnología VeraTag® de conformidad con realizaciones de la invención. El Panel A ilustra un formato de ensayo HerMark® estándar, que es un ensayo basado en la proximidad en el que el clivaje de la molécula reporter VTag® ocurre vía oxígeno singlete. El símbolo de las tijeras representa la fracción de clivaje unida al agente de clivaje, mientras que "hv" representa la energía luminosa. En el Panel B, el clivaje de la molécula reporter VTag® se efectúa a través de un agente reductor (por ejemplo, DTT). En ambos formatos de ensayo, las moléculas reporter VTag® liberadas son separadas e identificadas mediante electroforesis capilar. El eje X muestra el momento en el que la molécula reporter VTag® clivada se eluyó del capilar y la intensidad de la fluorescencia se indica en el eje Y. Los picos denotan la elución de las diferentes moléculas reporter VTag®.

40 La Figura 2 muestra ejemplos de formatos de ensayo basados en la tecnología VeraTag® de conformidad con realizaciones de la invención. El Panel A ilustra un formato de ensayo HerMARK® estándar, que permite la cuantificación de la cantidad total de proteína diana (por ejemplo, HER2) utilizando dos agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos) específicos para la proteína diana. El Panel B ilustra un formato de ensayo que permite la identificación de homodímeros utilizando un único anticuerpo que ha sido conjugado diferencialmente con una molécula reporter VTag® o un agente de clivaje. Ambos formatos de ensayo son ensayos basados en la proximidad, en los que el clivaje de la molécula reporter VTag® ocurre a través de la fotoinducción del agente de clivaje (es decir, oxígeno singlete) mediante la luz. "S" representa una molécula de estreptavidina unida a través de una molécula de biotina a uno de los anticuerpos. El Panel C muestra un ejemplo de molécula reporter VTag® (Proll) unida a un anticuerpo (por ejemplo, Ab8) a través de un enlazador y en forma liberada tras el clivaje.

La Figura 3 es un gráfico que ilustra la relación entre la proteína HER2 cuantitativa medida mediante H2T (RF/mm² de tumor) en un ensayo HERmark® y el número de copias del gen HER2 por centrómero 17 medido mediante HER2 FISH.

5 La Figura 4 muestra representaciones de la función de Kaplan-Meier que ilustran el tiempo hasta la aparición de metástasis cerebral (en meses) en base a diferentes categorías de marcadores de proteínas de acuerdo con realizaciones de la invención.

10 El Panel A muestra datos basados en niveles cuantitativos de HER2, donde se comparan los sujetos con un nivel de H2T superior (línea gris) e inferior (línea negra) a la media. El Panel B muestra datos basados en niveles cuantitativos de HER2 en sujetos con un nivel de HER2 superior (línea gris) e inferior (línea negra) al límite óptimo de H2T. El Panel C muestra datos basados en el análisis HER2 FISH, donde se comparan los sujetos con un nivel superior (línea negra) e inferior (línea gris) a la media. El Panel D muestra datos basados en niveles cuantitativos de p95, donde se comparan los sujetos con un nivel de p95 superior (línea gris) e inferior (línea negra) a un límite de p95 óptimo. El Panel E muestra datos basados en niveles cuantitativos de p95 dentro del grupo con bajos niveles de HER2 identificado en el Panel B, a fin de ilustrar la independencia de H2T y p95 como biomarcadores significativos.

15 La Figura 5 ilustra el efecto de los niveles cuantitativos de HER2 en vista del grado del tumor en el tiempo hasta la metástasis cerebral, de conformidad con realizaciones de la invención. El Panel A muestra un gráfico de Forest que ilustra el ratio de riesgo determinado en función de los niveles cuantitativos de HER2 y del grado del tumor. El Panel B es un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra el tiempo hasta la metástasis cerebral en meses cuando se comparan los niveles de HER2 en diferentes grados de tumor.

20 La Figura 6 ilustra el efecto de los niveles cuantitativos de HER2 en vista del grado del tumor en el tiempo hasta la metástasis cerebral, de conformidad con realizaciones de la invención. El Panel A muestra un gráfico de Forest que ilustra el ratio de riesgo determinado en función de los niveles cuantitativos continuos de HER2 (sin límite) y del grado del tumor. El Panel B es un gráfico de Forest que ilustra el ratio de riesgo en función de los niveles cuantitativos continuos de HER2 y del grado del tumor dentro del subconjunto de sujetos HER2 FISH positivo.

25 La Figure 7 es un diagrama que muestra el lugar dominante de metástasis determinado por un médico al comienzo del estudio y el nivel de H2T para cada uno de los lugares metastásicos dominantes.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y abreviaturas

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

30 A efectos del presente, el término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario, se refiere a un valor que no es un 10% superior ni inferior al valor modificado por el término. Por ejemplo, el término "aproximadamente 5 µg/kg" significa un intervalo de entre 4,5 µg/kg y 5,5 µg/kg. Asimismo, por ejemplo, "aproximadamente una hora" significa un intervalo de entre 48 y 72 minutos.

35 "Anticuerpo" significa una inmunoglobulina que se une de forma específica, y por tanto se define como complementaria a, una organización espacial y polar concreta de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante, y se puede preparar mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como inmunización de un huésped y recogida de suero (policlonal) o mediante la preparación de líneas de células híbridas continuas y la recogida de la proteína secretada (monoclonal), o bien clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de estas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de esta, y las inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de estas pueden incluir Fab, Fv, y F(ab')₂, Fab', y similares. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos monocatenarios o un fragmento de unión a antígeno de estos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o cualquier otro derivado de anticuerpo conocido por un experto en la técnica que conserve la actividad de unión específica para un lugar de unión concreto. Además, se pueden utilizar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando proceda, siempre que se mantenga la afinidad de unión para un lugar de unión concreto. Se pueden encontrar orientaciones para la producción y selección de anticuerpos y derivados de anticuerpos para su uso en inmunoensayos, incluyendo aquellos ensayos que emplean una etiqueta molecular liberable (como se describe más abajo) en textos y manuales disponibles, tales como Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Howard y Bethell, 2001, *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, CRC Press; Wild, ed., 1994, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press, Nueva York.

45 "Composición de unión a anticuerpo" significa una molécula o un complejo de moléculas que comprenden uno o más anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno que se unen a una molécula, y obtiene su especificidad de unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo. Las composiciones de unión a anticuerpo incluyen, entre otras, (i) pares de anticuerpos en los que un primer anticuerpo se une de forma específica a una molécula diana y un segundo anticuerpo que se une de forma específica a una región constante del primer anticuerpo; un anticuerpo biotinilado que se une de forma específica a una molécula diana y una proteína de estreptavidina, donde la proteína se obtiene con fracciones tales como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores o similares, a través de una

- fracción de biotina; (ii) anticuerpos específicos para una molécula diana y conjugados con un polímero, como dextrano, que a su vez se obtiene con fracciones como etiquetas moleculares y fotosensibilizadores, ya sea de forma directa a través de enlaces covalentes o indirecta a través de uniones de estreptavidina-biotina; (iii) anticuerpos específicos para una molécula diana y conjugados con un gránulo, o microgránulo, u otro soporte en lugares sólida, que a su vez se obtiene directa o indirectamente con fracciones como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores, o polímeros que contienen estos últimos.
- "Determinante antigénico" o "epítipo" significa un lugar sobre la superficie de una molécula, normalmente una proteína, a la que se une una única molécula del anticuerpo. Por lo general, una proteína dispone de varios o muchos determinantes antigénicos diferentes y reacciona con anticuerpos con especificidades diferentes. Un determinante antigénico preferible es un lugar de fosforilación de una proteína.
- "Compuesto de unión" se referirá a una composición de unión a anticuerpo, un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina, o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse de forma específica a una molécula o proteína diana o de formar un complejo estable con un analito de interés, como un complejo de proteínas. En un aspecto, un compuesto de unión, que se puede representar a través de la fórmula siguiente, comprende una o más etiquetas moleculares unidas a una fracción de unión.
- A efectos del presente, la "barrera hematoencefálica" se refiere a la separación entre la sangre circulante y el fluido cerebral extracelular (BECF) del sistema nervioso central (CNS). La barrera hematoencefálica es una barrera física y un sistema de mecanismos de transporte celular.
- Las células endoteliales limitan la difusión de objetos microscópicos (por ejemplo, bacterias) y moléculas grandes o hidrófilas hacia el fluido cerebroespinal, aunque permiten la difusión de pequeñas moléculas hidrófobas.
- "Fracción de unión" significa cualquier molécula a la que se pueden unir, de forma directa o indirecta, etiquetas moleculares y que es capaz de unirse de forma específica a un analito. Las fracciones de unión incluyen, entre otras, anticuerpos, composiciones de unión a anticuerpo, fragmentos de anticuerpos, péptidos y proteínas. Preferiblemente, las fracciones de unión son anticuerpos o composiciones de unión a anticuerpos.
- "Cáncer" o "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica de un organismo, como un mamífero, que se caracteriza típicamente por el crecimiento desregulado de células. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, a título meramente enunciativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más concretos de estos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón, comocáncer de pulmón microcítico o cáncer de pulmón no microcítico; cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- "Agente quimioterapéutico" significa una sustancia química, principalmente un agente citotóxico o citostático, que se puede utilizar para tratar una patología, particularmente el cáncer. Entre los agentes quimioterapéuticos se incluirán compuestos como el paclitaxel, tal y como se recoge en el presente.
- Un "enlace clivable", a efectos del presente, se refiere a un grupo de unión química que puede ser clivado en condiciones que no degradan la estructura ni afectan a las características de detección de una etiqueta molecular conectada a una fracción de unión con el enlace clivable.
- Una "fracción que induce el clivaje" o "agente de clivaje", a efectos del presente, es un grupo que produce una especie activa que es capaz de clivar un enlace clivable, por ejemplo, mediante oxidación. Preferiblemente, la especie activa es una especie química que muestra una actividad efímera, por lo que los efectos que inducen el clivaje se producen únicamente en las proximidades del lugar en el que se genera.
- A efectos del presente, una "sonda de clivaje" se refiere a un reactivo que comprende una fracción que índice el clivaje, conforme se define en el presente, y una composición de unión a anticuerpo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, o una proteína, como biotina o estreptavidina, un oligonucleótido, una lectina o cualquier otra entidad molecular capaz de unirse específicamente a una molécula o proteína diana o de formar un complejo estable con un analito de interés (por ejemplo, proteína o complejo proteico).
- A efectos del presente, "límite" se refiere a un punto determinado matemáticamente basado en la medición de la cantidad de HER2 o proteína p95 de muestras biológicas que puede dividir las muestras de una población de sujetos en dos subgrupos de pacientes distintos, como, por ejemplo, una media o un límite óptimo o un límite predeterminado. La cantidad se puede medir a través de cualquier método conocido en la técnica, como transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET), ensayo de unión por proximidad (PLA), anticuerpos específicos de dímero, o ensayo VeraTag®, o cualquier otro método que sea conocido por un experto en la técnica.
- "Ensayo VeraTag®" y "ensayo VERATAG®" se utilizan de forma intercambiable y se refieren a ensayos individuales y multiplexados y multietiqueta, materiales, métodos y técnicas para realizar y utilizar estos ensayos, incluyendo, entre otros, reactivos, procedimientos analíticos y software relacionados con estos ensayos. Estos ensayos se

divulgan en la presente solicitud y en la Patente USA n.º 7 105 308, así como en las Publicaciones de patente USANº 2009/0191559, 2010/0143927, 2010/0210034, y 2010/0233732.

A efectos del presente, molécula reporter "VeraTag" o "vTag," o "vTag^R," se utilizan para referirse a una etiqueta molecular unida a un anticuerpo utilizado en un ensayo VeraTag®.

5 A efectos del presente, "mayor o igual que" (*es decir*, \geq o \geq) puede en determinadas realizaciones alternativas significar mayor que ($>$). Asimismo, a efectos del presente "menor o igual que" (*es decir*, \leq o \leq) puede en determinadas realizaciones alternativas significar menor que ($<$).

"FEPE" se referirá a un grupo de células o cantidad de tejido que se fija, particularmente muestras convencionales introducidas en parafina y fijadas con formalina. Estas muestras se utilizan típicamente, entre otros, en ensayos para complejos receptores en forma de secciones finas, por ejemplo, de 3-10 μm de grosor, de tejido fijado montado en un portaobjetos o superficie equivalente. Estas muestras también se someten típicamente a un procedimiento de rehidratación convencional y, opcionalmente, a un procedimiento de recuperación de antígeno como preliminar o parte de las mediciones del ensayo.

15 "Ratio de riesgo" o "HR", a efectos del presente, se refiere a un tipo específico de riesgo relativo que se calcula utilizando una técnica estadística conocida como Análisis de Supervivencia (*es decir*, el análisis de uno o más grupos de sujetos que presentan diferentes tiempos hasta algún evento o resultado de interés). El análisis de supervivencia realiza un seguimiento del número de sujetos que no han experimentado el evento en un momento dado o durante un intervalo de tiempo determinado. A continuación, los datos se reflejan en un gráfico para la totalidad de la duración del estudio y los resultados se ilustran como una curva descendente. El "ratio de riesgo" es la proporción entre el riesgo previsto de un grupo frente al del otro grupo. A continuación, el ratio de riesgo se puede comparar con una medida independiente (por ejemplo, la cantidad de uno o más biomarcadores presentes en la muestra; el grado del tumor). Un ratio de riesgo mayor que uno indica que el evento de interés está ocurriendo a un ritmo más rápido para un primer grupo que para un segundo grupo. Un ratio de riesgo menor que uno indica que el evento de interés está ocurriendo a un ritmo más lento para un primer grupo que para un segundo grupo. Si el HR (Ratio de evento) no se puede distinguir de uno, entonces no existen diferencias estadísticas entre el riesgo asociado a las dos variables. Cabe señalar que estos ratios son comparaciones entre los dos grupos y no ofrecen indicación alguna del tiempo que tarda el sujeto medio de ninguno de los grupos. El ratio de riesgo se refiere al número de veces que se multiplica o divide el riesgo del evento de interés en el primer grupo en comparación con el segundo grupo.

30 "Her-2," "ErbB2," "c-Erb-B2," "HER2," "Her2," y "wew" se utilizan de forma intercambiable en el presente y se refieren a HER2 nativo, y variantes de este, tal y como se describe, por ejemplo, en Semba *et al.*, 1985, *P.N.A.S. USA* 82:6497-650 y Yamamoto *et al.*, 1986, *Nature* 319:230-234 y en el Número de acceso Genebank X03363. A menos que se indique lo contrario, los términos "HER2," "ErbB2," "c-Erb-B2," "HER2," y "Her2", cuando se utilizan en el presente, se refieren a la proteína humana. El gen que codifica Her2 se denomina en el presente "erbB2". A efectos del presente, H2T se referirá a la expresión total de HER2 determinada, por ejemplo, a través de un ensayo VeraTag®.

A efectos del presente, "agente que actúa sobre HER2" se refiere a un compuesto que puede inhibir la actividad biológica de HER2 o de una célula que expresa HER2 o de una célula cancerosa HER2-positiva. Estas actividades biológicas incluyen, entre otras, dimerización, autofosforilación, fosforilación de otro receptor, transducción de señal y similares. Las actividades biológicas pueden incluir, entre otros, la supervivencia celular y la proliferación celular, y la inhibición de tales actividades por parte de un agente que actúa sobre HER2 podría ser la muerte celular directa o indirecta (por ejemplo, ADCC), la alteración de complejos de proteína o la formación de complejos, la modulación del tráfico de proteínas, la inhibición de enzimas o la regulación a la baja de HER2. Las actividades biológicas también pueden incluir la respuesta del paciente que se recoge en la presente solicitud. Entre los ejemplos de agentes que actúan sobre HER2 se incluyen, por ejemplo, los anticuerpos pertuzumab, ertumaxomab, y trastuzumab, además de moléculas pequeñas como 17-AAG, IPI-504, neratinib, AZD8931, ARRY-380, PF299, afatinib, pelitinib, S- 222611, AEE-788 y lapatinib. Por lo general, los anticuerpos y las moléculas relacionadas son demasiado grandes para atravesar la barrera hematoencefálica.

50 "Homodímero de HER2" en relación con los receptores de membrana de HER2 de superficie celular significa un complejo de dos o más proteínas HER2 unidas a la membrana. Por lo general, los dímeros se componen de dos receptores en contacto entre sí. Los dímeros se pueden crear en una membrana de superficie celular a través de procesos pasivos, tales como interacciones de Van der Waal, y similares, o también se pueden crear dímeros a través de procesos activos, tales como dimerización inducida por ligandos, enlaces covalentes, interacción con componentes intracelulares o similares. Véase, *por ejemplo*, Schlessinger, 2000, *Cell* 103:211-225. A efectos del presente, se entiende que el término "dímero" se refiere al "dímero del receptor de la membrana de superficie celular", a menos que el contexto indique lo contrario. A efectos del presente, "H2D" se referirá al dímero cuantificado determinado, por ejemplo, a través de un ensayo VeraTag®.

60 Un cáncer, una célula cancerosa, un sujeto o paciente "HER2 positivo", a efectos del presente, se refiere a un cáncer, célula cancerosa, sujeto o paciente que presenta una puntuación al menos de 2 cuando se utiliza un HercepTest® (DakoCytomation California Inc., Carpintería, CA), o un cáncer, célula cancerosa, sujeto o paciente que ha sido identificado como tal mediante FISH, que tiene un número de copias del gen HER2 con centrómero 17

corregido superior a 2 (HER2 FISH/CEP17 >2; FISH-positivo). En determinadas realizaciones, la célula HER2-positiva presenta una puntuación de al menos 2+ o 3+ utilizando el ensayo de inmunohistoquímica HercepTest®.

“Alto” se refiere a una medida que es mayor de lo normal, mayor que un estándar (por ejemplo, una medida predeterminada o la medida de un subgrupo) o que es relativamente mayor que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, un nivel de HER2 alto se refiere a una medida de HER2 que es superior a una medida de HER2 normal. Una medida de HER2 normal se puede determinar de conformidad con cualquier método disponible para un experto en la técnica. Un nivel de HER2 alto también se puede referir a una medida que es igual o mayor que una medida predeterminada, como un límite predeterminado. Un nivel de HER2 alto también se puede referir a una medida de HER2 donde un subgrupo con un nivel de HER2 alto tiene unos niveles de HER2 relativamente mayores que otro subgrupo. Por ejemplo, según la presente invención, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos dividiendo las muestras en función de un punto matemáticamente determinado, tal como, entre otros, una media, creando así un subgrupo cuya medida es alta (es decir, mayor que la media) y otro subgrupo cuya medida es baja. HER2 se puede medir por cualquier método conocido por un experto en la técnica, como, entre otros, utilizando un ensayo VeraTag® o utilizando cualquier método de inmunohistoquímica (IHC) estándar como HercepTest®. Asimismo, por ejemplo, un nivel de HER2 alto se puede referir a una medida de HER2 que es mayor que una medida normal de HER2 en un conjunto concreto de muestras o pacientes HER2-positivos. Una medida de HER2 normal se puede determinar de conformidad con cualquier método disponible para un experto en la técnica. Asimismo, por ejemplo, un nivel de HER2 alto también se puede referir a una medida que es mayor que una medida predeterminada, como un límite predeterminado. Un nivel de HER2 alto también se puede referir a una medida de HER2 donde un subgrupo con un nivel de homodímero de HER2 alto tiene unos niveles de homodímeros de HER2 relativamente mayores que otro subgrupo. En algunas circunstancias, "alto" se refiere a una cantidad que es mayor que la medición media en un grupo de referencia.

A efectos del presente, "probable" se refiere a una mayor probabilidad de que se presente un artículo, objeto, cosa o evento.

“Prolongado”, a efectos del presente, se refiere a una medida temporal que es mayor de lo normal, mayor que un estándar, como una medida predeterminada, o la medida de un subgrupo que es relativamente más prolongada que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, con respecto a la longevidad de un paciente, una progresión en el tiempo prolongada se refiere a una progresión en el tiempo que es más prolongada que una progresión en el tiempo normal o más prolongada que el tiempo hasta la progresión en comparación con otro grupo. El hecho de si una progresión temporal es prolongada o no se puede determinar de conformidad con cualquier método disponible para un experto en la técnica. Prolongado podría incluir, por ejemplo, ausencia de progresión. En algunas circunstancias, "prolongado" se refiere a un tiempo que es superior al tiempo medio necesario para que ocurra un evento significativo en una enfermedad.

“Bajo” se refiere a una medida que es menor de lo normal, menor que un estándar (por ejemplo, una medida predeterminada o la medida de un subgrupo) o que es relativamente menor que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, un nivel de HER2 bajo se puede referir a una medida de HER2 que es menor que una medida normal de HER2 en un conjunto concreto de muestras de pacientes HER2-positivos. Una medida de HER2 normal se puede determinar de conformidad con cualquier método disponible para un experto en la técnica. Un nivel de HER2 bajo también puede significar una medida que es menor que una medida predeterminada, como un límite predeterminado. HER2 bajo también puede significar una medida donde un subgrupo con un nivel de HER2 bajo tiene un nivel relativamente menor que el de otro subgrupo. Por ejemplo, entre otros, según la presente especificación, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos dividiendo las muestras en función de un punto matemáticamente determinado, tal como, entre otros, una media, creando así un subgrupo cuya medida es baja (es decir, menor que la media) y otro subgrupo cuya medida es alta. Asimismo, por ejemplo, un nivel de HER2 bajo significa una medida de homodímeros de HER2 que es menor que una medida normal de HER2 en un conjunto concreto de muestras o pacientes HER2-positivos. Un nivel de HER2 bajo también puede significar una medida que es menor que una medida predeterminada, como un límite predeterminado. HER2 bajo también puede significar una medida donde un subgrupo con un nivel de HER2 bajo tiene un nivel relativamente menor que el de otro subgrupo.

Una "etiqueta molecular", a efectos del presente, se refiere a una molécula que se puede distinguir de otras moléculas en base a una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se van a separar, incluyendo, por ejemplo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, la solubilidad, la pKa, la hidrofobicidad, la carga, el ratio carga/masa, la polaridad o similares. En un aspecto, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se diferencian en la movilidad electroforética y las características de detección óptica y se pueden separar por electroforesis. En otro aspecto, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se pueden diferenciar por el peso molecular, la forma, la solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga o polaridad y se pueden separar por HPLC de lugares normal o lugares inversa, HPLC de intercambio de iones, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas, cromatografía de gases o una técnica similar. Tal y como se describe en el presente, una molécula reporter VeraTag® es un tipo de etiqueta molecular.

"Límite óptimo" o "límite optimizado", a efectos del presente, se refiere al valor de una medida predeterminada en sujetos que presentan determinados atributos que permiten la mejor discriminación entre dos categorías de un atributo. Por ejemplo, hallar un valor para un límite óptimo que permite discriminar mejor entre dos categorías (por ejemplo, alto nivel de expresión de H2T y bajo nivel de expresión de H2T) para determinar, por ejemplo, la

supervivencia global (OS). Los límites óptimos se utilizan para separar los sujetos con valores inferiores o superiores al límite óptimo, a fin de optimizar un modelo de predicción (por ejemplo, entre otros, para maximizar la especificidad del modelo, maximizar la sensibilidad del modelo, maximizar la diferencia en el resultado o minimizar el valor p del ratio de riesgo o una diferencia en la respuesta).

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

10 A efectos del presente, "p95" se refiere a una porción de HER2 C-terminal y N-terminalmente truncada. "p95" también se ha denominado "receptor de ErbB2 truncado", "p95^{ErbB2}", "p95HER2", y más generalmente "HER-2/neu NH₂-terminalmente truncado" y "fragmentos de HER2 C-terminales" para reflejar el hecho de que "p95" representa una familia de proteínas HER2 truncadas, pero no idénticas en tamaño a las originalmente identificadas por tener un peso molecular aparente de 95 kiloDaltons. Se cree que p95 se produce al menos a través de dos mecanismos distintos. p95 puede resultar por el clivaje proteolítico de HER2 en toda su longitud. p95 también puede ser el resultado de un inicio traslacional alternativo en sentido descendente desde la metionina primera canónica, incluyendo, por ejemplo, M611 y M687.

A efectos del presente, "fotosensibilizador" se refiere a una molécula que absorbe la luz y que cuando es activada por la luz convierte el oxígeno molecular en oxígeno singlete.

20 "RECIST" es un acrónimo que significa "Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos" y es un conjunto de normas publicadas que definen cuando los pacientes mejoran ("responden"), permanecen igual ("estables") o empeoran ("progresión") durante los tratamientos. Las respuestas definidas por los criterios RECIST han sido publicadas (véase, por ejemplo, Therasse, 2000, *J. Natl. Cancer Inst.* 92(3):205-216). Los criterios RECIST pueden incluir otras definiciones publicadas similares y conjuntos de normas. Un experto en la técnica entenderá las definiciones asociadas a los criterios RECIST, a efectos del presente, tales como respuesta parcial (PR), respuesta completa (CR), enfermedad estable (SD) y enfermedad progresiva (PD).

25 "Unidades de fluorescencia relativa" o "RFU" se utilizan de forma intercambiable y se referirán al componente tiempo de un pico de electroforesis capilar concreto utilizando unidades de fluorescencia arbitrarias en comparación con un estándar. Con respecto a los formatos de ensayo VeraTag®, la RFU es proporcional a la concentración de molécula reporter VeraTag® inyectada en la electroforesis capilar con cierta variabilidad esperada introducida, por ejemplo, por las diferencias en la inyección y el capilar. Por lo general, la lectura de los ensayos VeraTag® se proporciona en unidades de fluorescencia relativa por mm de tumor (RF/mm²).

30 "Área de pico relativa" o "RPA" se utilizan de forma intercambiable y se referirán al ratio entre una RFU de una molécula reporter VeraTag® concreta y una RFU de un estándar de fluorescencia interna conocido de concentración conocida y constante.

35 "Capacidad de respuesta", "responder" al tratamiento y otras formas de este verbo, a efectos del presente, se refieren a la reacción de un sujeto al tratamiento con un agente que actúa sobre HER2. Como ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente que actúa sobre Her2 si el crecimiento de un tumor en el sujeto se retarda aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 si un tumor en el sujeto se reduce aproximadamente en un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más, determinado mediante cualquier medida apropiada (por ejemplo, por masa o volumen). En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente que actúa sobre Her2, si el sujeto experimenta una esperanza de vida ampliada en aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más, con respecto a la esperanza de vida prevista en caso de que no se administrase ningún tratamiento. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 si el sujeto tiene una supervivencia libre de la enfermedad, una supervivencia global o un tiempo hasta la progresión incrementado. Se pueden utilizar diversos métodos para determinar si un paciente responde a un tratamiento, incluyendo los criterios RECIST anteriormente mencionados.

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

45 "Breve", a efectos del presente, se refiere a una medida temporal que es menor de lo normal, menor que un estándar, como una medida predeterminada, o la medida de un subgrupo que es relativamente más breve que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, con respecto a la longevidad de un paciente, una progresión en el tiempo breve se refiere a una progresión en el tiempo que es más breve que una progresión en el tiempo normal. Si una progresión en el tiempo es breve o no se puede determinar en función de cualquier método disponible para un

experto en la técnica. En algunas circunstancias, "breve" se refiere a un tiempo que es inferior al tiempo medio necesario para que ocurra un evento significativo en una enfermedad.

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

A efectos del presente, "fármaco de moléculas pequeñas" se refiere a un compuesto orgánico de bajo peso molecular que por definición no es un polímero. El término molécula pequeña, especialmente en el campo de la farmacología, se limita normalmente a una molécula que también se une con una afinidad elevada a un biopolímero como una proteína, un ácido nucleico o un polisacárido y además altera la actividad o función del biopolímero. El límite máximo de peso molecular para una molécula pequeña es aproximadamente de 1000 Daltons, lo que le permite difundirse rápidamente a través de las membranas celulares para que puedan alcanzar lugares de acción intracelulares.

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

A efectos del presente, "curso temporal" se referirá a la cantidad de tiempo entre un evento inicial y uno o más eventos posteriores. Por ejemplo, con respecto al cáncer de un sujeto, el curso temporal se puede referir a la enfermedad de un paciente y se puede medir valorando los eventos significativos en el transcurso de la enfermedad, donde el primer evento puede ser el diagnóstico y el evento posterior puede ser, por ejemplo, la progresión hasta una etapa posterior, la recidiva, la metástasis, la cirugía o la muerte.

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

El "tiempo hasta la metástasis cerebral" o "TTBM" se refiere a un tiempo medido desde el comienzo del tratamiento hasta la aparición de la metástasis cerebral o censura. La censura se puede producir por la conclusión de un estudio o por un cambio de tratamiento. El tiempo hasta la metástasis cerebral también se puede representar como una probabilidad de metástasis cerebral, por ejemplo, en un gráfico de Kaplan-Meier donde el tiempo hasta la metástasis cerebral puede representar las probabilidades de permanecer libre de metástasis cerebral durante un tiempo determinado, siendo ese tiempo el transcurrido entre el comienzo del tratamiento y la metástasis cerebral o censura. El TTBM es un tipo de TTP, dado que la metástasis cerebral puede ser un evento significativo en el curso temporal del cáncer de un sujeto.

"Tratar", "tratamiento" y otras formas de este término se refieren a la administración de un agente que actúa sobre Her y/o un agente quimioterapéutico y/u otro tratamiento para de cáncer dirigido a impedir el crecimiento de un cáncer, a causar la reducción de un cáncer en peso o volumen y/o a ampliar el tiempo de supervivencia previsto del sujeto y/o el tiempo hasta la progresión del tumor o similares.

"Poco probable" se refiere a una menor probabilidad de que un evento, elemento, objeto, cosa o persona ocurra con respecto a una referencia.

Descripción detallada de determinadas realizaciones de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos para medir la cantidad de expresión de HER2, o de expresión de HER2 y p95, en pacientes con cáncer HER2-positivo, como cáncer de mama avanzado, y correlacionar la expresión de HER2, o HER2 y p95 con (i) la identificación de sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían ser examinados para descartar la metástasis cerebral; (ii) la identificación de sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían recibir tratamiento con un agente que actúe sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento de cáncer; (iii) la determinación del tiempo previsto hasta la metástasis cerebral (TTBM) en un sujeto con cáncer HER2-positivo; (iv) la determinación de la probabilidad relativa de que un sujeto con cáncer HER2-positivo corra el riesgo de desarrollar metástasis cerebral; y/o (v) la determinación de si un sujeto con cáncer HER2-positivo se encuentra dentro de un subconjunto de sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían ser examinados para descartar una metástasis cerebral. Los métodos de la invención permiten la identificación de límites cuantitativos de HER2, o límites de HER2 y p95, para permitir la clasificación de sujetos en subgrupos de riesgo en base a la cantidad de proteína HER2, o en la cantidad de proteína HER2 y proteína p95, de las muestras biológicas del sujeto. Los métodos de la invención también permiten la medición cuantitativa de la proteína HER2, o la proteína HER2 y la proteína p95, para poder caracterizar el riesgo de un sujeto en relación con una población de sujetos en su conjunto.

En determinadas realizaciones, la invención utiliza datos clínicos en combinación con mediciones de biomarcadores para predecir el resultado del paciente. Los datos clínicos pueden incluir la supervivencia global, el tiempo hasta la metástasis cerebral y la progresión hasta la enfermedad metastásica. Por ejemplo, los datos clínicos pueden incluir la fecha de la muerte o la fecha de la última cita de seguimiento del paciente. También se pueden utilizar otros aspectos de los datos clínicos (por ejemplo, el tiempo hasta la metástasis, el tiempo hasta la remisión, el desarrollo de resistencia a un determinado agente terapéutico). En determinadas realizaciones, los datos clínicos pueden comprender la fecha de comienzo del tratamiento con un agente que actúa como anti-HER determinado o un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, la invención utiliza datos clínicos para determinar el transcurso de una acción terapéutica o tratamiento para un paciente, en particular un paciente con alto riesgo de recidiva/metástasis.

Una realización es un método para determinar la probabilidad relativa de que un sujeto con un cáncer HER2-positivo corra el riesgo de desarrollar metástasis cerebral, que consiste en (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenida del cáncer de un sujeto; (b) medir la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica; (c) determinar si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, o por encima de un límite de HER2 y un límite de p95, respectivamente; y (d) indicar que, si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica se encuentra por encima del límite de HER2, o por encima del límite de HER2 y del límite de p95, respectivamente, el sujeto tiene más probabilidades de correr el riesgo de desarrollar metástasis cerebral.

En una realización, la invención comprende un método para identificar sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían ser evaluados para descartar la metástasis cerebral, que consiste en lo siguiente: (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenida del cáncer de un sujeto; (b) medir la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica; (c) determinar si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, o por encima de un límite de HER2 y un límite de p95, respectivamente; y (d) indicar que el sujeto debería ser evaluado para descartar la metástasis cerebral, si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, se encuentra por encima del límite de HER2, o por encima del límite de HER2 y del límite de p95, respectivamente.

En otra realización, la invención comprende un método para identificar sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían recibir tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer, que consiste en lo siguiente: (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenida del cáncer de un sujeto; (b) medir la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica; (c) determinar si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, o por encima de un límite de HER2 y un límite de p95, respectivamente; y (d) indicar que el sujeto debería recibir tratamiento con un agente que actúe sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer, si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, se encuentra por encima del límite de HER2, o por encima del límite de HER2 y del límite de p95, respectivamente.

En otra realización, la invención comprende un método para determinar un tiempo previsto hasta la metástasis cerebral (TTBM) en un sujeto con cáncer HER2-positivo, que consiste en lo siguiente: (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenido del cáncer del sujeto; (b) medir la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica; (c) determinar si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, o por encima de un límite de HER2 y un límite de p95, respectivamente; y (d) indicar el TTBM previsto del sujeto en base a la incidencia de la metástasis cerebral con el paso del tiempo en una población de referencia con niveles de HER2, o niveles de HER2 y niveles de p95, superiores o inferiores al límite de HER2, o al límite de HER2 y p95, respectivamente.

En una realización, la invención comprende un método para determinar si un sujeto con un cáncer HER2-positivo se encuentra dentro de un subconjunto de sujetos con cáncer HER2-positivo que deberían ser evaluados para descartar la metástasis cerebral, que consiste en lo siguiente: (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenida del cáncer de un sujeto; (b) medir la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica; (c) determinar si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, o por encima de un límite de HER2 y un límite de p95, respectivamente; y (d) indicar que el sujeto debería ser evaluado para descartar la metástasis cerebral, si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, se encuentra por encima del límite de HER2, o por encima del límite de HER2 y del límite de p95, respectivamente.

Otra realización es un método para predecir el tiempo hasta la metástasis cerebral (TTBM) en un sujeto con un cáncer HER2-positivo, que consiste en (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenida del cáncer de un sujeto; (b) medir la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica; (c) determinar si la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, en la muestra del sujeto se encuentra por encima de un límite de HER2, o por encima de un límite de HER2 y un límite de p95, respectivamente; y (d) identificar el TTBM en base a la cantidad de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, de la muestra biológica. En algunas realizaciones, si la cantidad de proteína HER2 de la muestra biológica se encuentra por encima del límite de HER2, las probabilidades de que el sujeto esté libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 73% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 61% en el plazo aproximado de dos años, y aproximadamente del 37% en el plazo aproximado de tres años. En algunas realizaciones, si la cantidad de proteína HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2, las probabilidades de que el

sujeto esté libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 89% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 78% en el plazo aproximado de dos años, y aproximadamente del 69% en el plazo aproximado de tres años.

5 En determinadas realizaciones, la cantidad de HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2 y la cantidad de p95 se encuentra por encima del límite de p95, y las probabilidades de que el sujeto esté libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 80% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 66% en el plazo aproximado de dos años, y aproximadamente del 50% en el plazo aproximado de tres años. En determinadas realizaciones, si la cantidad de HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2 y la cantidad de p95 se encuentra por debajo del límite de p95, las probabilidades de que el sujeto esté libre de metástasis cerebral son aproximadamente del 94% en el plazo aproximado de un año, aproximadamente del 86% en el plazo aproximado de dos años, y aproximadamente del 80% en el plazo aproximado de tres años. En algunas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente 2,6 veces más riesgo de sufrir metástasis cerebral si la cantidad de proteína HER2 de la muestra biológica se encuentra por encima del límite de HER2, en comparación con una muestra en la que la cantidad se encuentra por debajo del límite de HER2. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente 2 veces más riesgo de sufrir metástasis cerebral si la cantidad de p95 de la muestra biológica se encuentra por encima del límite de p95, en comparación con una muestra en la que la cantidad se encuentra por debajo del límite de p95. En algunas realizaciones, el sujeto tiene aproximadamente 5,7 veces menos riesgo de sufrir metástasis cerebral si el cáncer del sujeto es de Grado 1 o 2 y la cantidad de proteína HER2 de la muestra biológica se encuentra por debajo del límite de HER2, en comparación con un caso en el que el cáncer del sujeto es de Grado 3 o en el que el cáncer del sujeto es de Grado 1 o 2 y la cantidad de proteína HER2 de la muestra biológica se encuentra por encima del límite de HER2.

Las realizaciones que se recogen a continuación son aspectos de cada uno de los métodos descritos en el presente.

25 En algunas realizaciones, el cáncer del sujeto se ha caracterizado como HER2-positivo en base a los niveles elevados de expresión del gen HER2, del nivel de proteína de HER2 o de la amplificación del gen HER2. En algunas realizaciones, el cáncer del sujeto comprende un cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer del sujeto comprende un cáncer de mama primario. En algunas realizaciones, la amplificación del gen HER2 se determina mediante hibridación in situ fluorescente (FISH). En determinadas realizaciones, los niveles de proteína HER2 se determinan por inmunoensayo. En determinadas realizaciones, los niveles de proteína HER2 se determinan por ensayo VeraTag®. En algunas realizaciones, la amplificación del gen HER2 se determina mediante cuantificación de los niveles de mRNA de HER2.

35 En determinadas realizaciones, el sujeto se ha sometido a tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 que no cruza la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones, el agente que actúa sobre HER2 es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es trastuzumab, pertuzumab, ertumaxomab, trastuzumab emtansine y/o MM-111. En algunas realizaciones, el agente que actúa sobre HER2 comprende anticuerpos monocatenarios, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fab) o una proteína genéticamente modificada que se puede unir a un antígeno (por ejemplo, Affybody™, Adnectin™, monobody, un fragmento de la región Fc modificado, una molécula de inmunoadhesina u otras moléculas similares).

40 En algunas realizaciones, la segunda forma de tratamiento del cáncer comprende un fármaco de moléculas pequeñas dirigidas a HER2, quimioterapia y/o radioterapia. En determinadas realizaciones, el fármaco de moléculas pequeñas dirigidas a HER2 comprende moléculas hidrófobas, tales como lapatinib, neratinib, AZD8931, ARRY-380, PF299, afatinib, pelitinib, S- 222611, o AEE-788. En algunas realizaciones, otros fármacos de moléculas pequeñas hidrófobas resultan adecuados. En algunas realizaciones, la segunda forma de tratamiento para el cáncer comprende un fármaco de moléculas pequeñas que se unen a una proteína que se une a HER2. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el fármaco de moléculas pequeñas comprende fármacos que se unen a HSP90, como, por ejemplo 17-AAG o IPI-504.

50 Los métodos de la invención permiten la identificación de los límites cuantitativos de HER2 y p95 para permitir la clasificación de sujetos en subgrupos de riesgo en base a la cantidad de proteína HER2, o en la cantidad de proteína HER2 y proteína p95, de las muestras biológicas del sujeto. Los métodos de la invención también permiten la medición cuantitativa de la proteína HER2, o la proteína HER2 y la proteína p95, para poder caracterizar el riesgo de un sujeto en relación con una población de sujetos en su conjunto.

55 Para cada uno de los métodos divulgados en el presente, el método puede comprender también el paso de determinar el límite de p95. En algunas realizaciones, el límite de HER2 y/o el límite de p95 se determinan utilizando un ensayo VeraTag®. En determinadas realizaciones, el límite de HER2 y/o el límite de p95 se determinan utilizando otros métodos de cuantificación conocidos en la técnica (por ejemplo, cuantificación del mRNA, inmunoensayos, etc., divulgados en el presente). En los aspectos de la invención, si el paso de medir la cantidad de proteína HER2 en la muestra biológica y el paso de determinar el límite de HER2 comprenden el uso de un ensayo VeraTag®, el límite de HER2 comprende una medida distinta y superior que la medida utilizada para caracterizar el cáncer del sujeto como HER2-positivo.

60 En algunas realizaciones, el límite de HER2 comprende al menos uno de los elementos siguientes: (i) una cantidad media de HER2 determinada en una población de referencia de sujetos con un cáncer de mama HER2-positivo; o (ii) una cantidad optimizada de HER2 determinada en una población de referencia de sujetos con un cáncer de mama

HER2-positivo. En algunas realizaciones, el límite de HER2 se determina mediante un ensayo VeraTag®. En determinadas realizaciones, la cantidad optimizada de HER2 (el límite optimizado) es de 50 RF/mm². En determinadas realizaciones, el límite de HER2 es de 58 RF/mm². En algunas realizaciones, el límite de p95 comprende al menos uno de los elementos siguientes: (i) una cantidad media de p95 determinada en una población de referencia de sujetos con un cáncer de mama HER2-positivo; o (ii) una cantidad optimizada de p95 determinada en una población de referencia de sujetos con un cáncer de mama HER2-positivo. En algunas realizaciones, el límite de p95 se determina mediante un ensayo VeraTag®. En determinadas realizaciones, la cantidad optimizada de p95 (el límite optimizado) es de 2,8 RF/mm². En algunas realizaciones, la población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo se ha sometido a tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 que no cruza la barrera hematoencefálica.

En determinadas realizaciones, las cantidades de proteína HER2 presentes se determinan poniendo en contacto una muestra biológica de un sujeto con cáncer con un compuesto de unión que tiene una etiqueta molecular asociada por un enlace clivable y una sonda de clivaje que tiene una fracción inductora del clivaje, y detectando si la etiqueta molecular y en ese caso qué etiqueta molecular se libera. Algunas realizaciones se pueden denominar ensayo HERmark® (véase, por ejemplo, la Fig. 1A y 2A). El ensayo HERmark® utiliza dos anticuerpos monoclonales específicos para diferentes epítomos únicos de la proteína HER2. Esto permite que ambos anticuerpos se unan al mismo receptor de HER2 en una proximidad cercana. La molécula reporter fluorescente VeraTag® ("Tag") se conjuga con un anticuerpo monoclonal específico para HER2. Un segundo anticuerpo monoclonal específico para HER2 se conjuga con biotina, que a continuación se une a una molécula fotosensibilizadora (PM). La fotoactivación de la muestra a una longitud de onda concreta activa la PM, generando oxígeno singlete. El oxígeno singlete puede clivar la reporter VeraTag® en una proximidad cercana. Véase, por ejemplo, la Fig. 2C. La reporter VeraTag® liberada es recogida y posteriormente se cuantifica utilizando la electroforesis capilar estándar. La cantidad de reporter VeraTag® clivada es proporcional a la concentración de HER2 en la muestra.

En determinadas realizaciones, el compuesto de unión y la sonda de clivaje se unen de forma específica a HER2. En determinadas realizaciones, la sonda de clivaje y la sonda de unión no se unen al mismo epítomo. Véanse, por ejemplo, las Fig. 1A y 2A. En algunas realizaciones, la sonda de clivaje y la sonda de unión se unen al mismo epítomo. Véase, por ejemplo, la Fig. 2B. En determinadas realizaciones, si el compuesto de unión se encuentra dentro de una proximidad efectiva de la fracción que induce el clivaje de la sonda de clivaje, la fracción que induce el clivaje cliva el enlace clivable de forma que se libera la etiqueta molecular. En algunas realizaciones, la cantidad de HER2 de la muestra se determina utilizando un primer compuesto de unión específico para HER2 y un segundo compuesto de unión específico para el primer compuesto de unión, donde el segundo compuesto de unión comprende una o más sondas moleculares unidas a este. En determinadas realizaciones, las sondas moleculares se unen a través de un enlace clivable. En determinadas realizaciones, el enlace clivable es clivado a través de un agente reductor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente reductor comprende ditiotreitól (DTT). Véase, por ejemplo, la Fig. 1B. Algunos ejemplos de detección de HER2 a través de un ensayo para la detección de HER2 total y/u homodímeros de HER2 se proporcionan en las Publicaciones de solicitud de Patente USA de propiedad común n.º 2009/0191559, 2010/0143927, 2010/0210034, y 2010/0233732.

En determinadas realizaciones, las cantidades de p95 en una muestra se determinan utilizando una sonda de proximidad que es capaz de unirse a p95 o a un analito que se une a p95 o a un complejo de p95, la sonda de proximidad tiene una proximidad efectiva, y tiene una o más sondas moleculares unidas, donde la unión de la sonda de proximidad y el compuesto de unión que se encuentra dentro de la proximidad efectiva produce una señal de las sondas moleculares que se correlaciona con la presencia y/o cantidad de p95 o complejo de p95. La sonda de proximidad y/o el compuesto de unión también pueden comprender un anticuerpo.

En algunas realizaciones, las cantidades de p95 de la muestra se determinan utilizando un primer compuesto de unión específico para p95 pero no para HER2 en toda su longitud y un segundo compuesto de unión específico para el primer compuesto de unión, donde el segundo compuesto de unión comprende una o más sondas moleculares unidas a este. En determinadas realizaciones, las sondas moleculares se unen a través de un enlace clivable. En determinadas realizaciones, el enlace clivable es clivado a través de un agente reductor. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente reductor comprende ditiotreitól (DTT). Véase, por ejemplo, la Fig. 1B. Algunos ejemplos de detección de p95 se proporcionan en las Publicaciones de solicitudes de patente USA de propiedad común n.º 2010/0143927 y 2010/0210034.

Los ensayos de proximidad resultan cada vez más útiles para entender el papel biológico de los complejos moleculares, así como para el estudio de biomarcadores. Por ejemplo, los compuestos de unión que se unen específicamente a una proteína diana se pueden unir con múltiples sistemas de detección diferentes para medir la presencia y/o cantidad de la proteína diana. Cualquier método conocido por un experto en la técnica que sirva para determinar una cantidad de una proteína diana puede ser utilizado de conformidad con la presente invención. Estos métodos incluyen, entre otros, la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET), complementación de fluorescencia biomolecular, ensayo de unión por proximidad (PLA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA) e inmunoensayos con anticuerpos específicos para una proteína diana, incluyendo, por ejemplo, ensayos VeraTag® o cualquier otro método conocido por un experto en la técnica.

La medición de HER2 y p95 utilizando etiquetas moleculares liberables ofrece múltiples ventajas, incluyendo la separación de las etiquetas moleculares liberadas de una mezcla de ensayo que proporciona un fondo notablemente reducido y una ventaja significativa en términos de sensibilidad y separación y detección que ofrece una capacidad de multiplexado conveniente para que múltiples componentes del complejo receptor se puedan medir de forma simultánea en el mismo ensayo. Los ensayos que utilizan estas etiquetas pueden tener diversas formas y se divulgan en las referencias siguientes: Patentes USA n.º 7 105 308; 6 627 400; 7 402 397; 7 402 398 y 7 402 399, así como en la Publicación de patente internacional n.º WO 2004/011900. Se pueden emplear diversas técnicas de separación que pueden distinguir moléculas en base a una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se van a separar, incluyendo, por ejemplo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, la solubilidad, la pKa, la hidrofobicidad, la carga, el ratio carga/masa o la polaridad. En una realización, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se diferencian en la movilidad electroforética y las características de detección óptica y se separan mediante electroforesis. En otra realización, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se pueden diferenciar por el peso molecular, la forma, la solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga o polaridad y se separan con HPLC de lugares normal o lugares inversa, HPLC de intercambio de iones, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas o cromatografía de gases.

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

Un agente que actúa sobre HER2 puede ser cualquier agente conocido por un experto en la técnica. En determinadas realizaciones, el agente que actúa sobre HER2 se selecciona del grupo compuesto por pertuzumab, trastuzumab, ertumaxomab, 17-AAG, IPI-504, neratinib, AZD8931, ARRY- 380, PF299, afatinib, pelitinib, S-222611 AEE-788 y lapatinib. En una realización preferible, el agente que actúa sobre HER2 es trastuzumab (Herceptin®). Véase, por ejemplo, Goldenberg, 1999, *Clin Ther.*21:309-18; and Shak, 1999, *Semin Oncol.*26:71-7. Asimismo, se pueden evaluar otros agentes que actúan sobre HER2 utilizando los métodos descritos en el presente.

Las muestras que contienen HER2 y/u homodímeros de HER2 adecuados para su uso como biomarcadores pueden proceder de diversas fuentes, incluyendo cultivos celulares, tejidos de animales o plantas, biopsias de pacientes o similares. Preferiblemente, las muestras son de pacientes humanos. Las muestras se preparan para los ensayos de la invención utilizando técnicas convencionales, que pueden depender de la fuente de la que se toma una muestra. Para las biopsias y muestras médicas, se ofrecen orientaciones en las referencias siguientes: *Theory and Practice of Histological Techniques*, 1977 (Bancroft JD & Stevens A, eds.), Churchill Livingstone, Edinburgo; Pearse, 1980, *Histochemistry. Theory and applied. 4th ed.*, Churchill Livingstone, Edimburgo.

En el ámbito del estado de la enfermedad cancerosa, los ejemplos de muestras de tejido del paciente que se pueden utilizar incluyen, entre otros, mama, próstata, ovario, colon, pulmón, endometrio, estómago, glándula salival o páncreas. La muestra de tejido se puede obtener mediante diversos procedimientos, incluyendo excisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, los ensayos de la invención se realizan con muestras de tejido que han sido fijadas e introducidas en parafina y se realiza el paso de desparafinado. Una muestra de tejido se puede fijar (es decir, preservar) utilizando una metodología convencional. Véase, por ejemplo., *Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology*, 1960, 3ª edición (Lee G. Luna, HT (ASCP) ed.), The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; *The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology*, 1994 (Ulreka V. Mikel, ed.), Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C. Un experto en la técnica apreciará que la elección del fijador se determina en función del propósito para el que el tejido se va a teñir histológicamente o analizar de otro modo. Un experto en la técnica apreciará también que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijador utilizado.

Por lo general, una muestra de tejido se fija primero y después se deshidrata a través de una serie ascendente de alcoholes, infiltrados, y se introduce en parafina u otro medio de seccionamiento para que la muestra de tejido pueda ser seccionada. Alternativamente, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido se puede introducir y procesar en parafina mediante una metodología convencional de conformidad con las técnicas convencionales descritas en las referencias anteriormente mencionadas. Entre los ejemplos de parafina que se pueden utilizar se incluyen Paraplast®, Broloid®, y Tissuemay®. Una vez que la muestra se ha introducido en parafina, puede ser seccionada con un micrótopo según las técnicas convencionales. Las secciones pueden tener un grosor de entre tres y doce micrones y preferiblemente de entre cinco y diez micrones. En un aspecto, una sección puede tener una superficie de entre 10 mm² y 1 cm². Una vez cortadas, las secciones se pueden unir a los portaobjetos con diversos métodos estándar. Los ejemplos de adhesivos para portaobjetos incluyen, entre otros, silano, gelatina y poli-L-lisina. Las secciones introducidas en parafina se pueden unir a portaobjetos con carga positiva y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

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

Las células de cultivos de tejido de mamíferos, o tejidos frescos o congelados, se pueden preparar utilizando técnicas de lisado celular convencionales (por ejemplo, 0,14 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-C1 (pH 8.6), 0,5% Nonidet P-40, e inhibidores de fosfatasa y/o proteasa, cuando corresponda). Para los tejidos de mamífero frescos, la preparación de las muestras puede incluir también un paso de separación tisular, como triturado, troceado, molido o ultrasonidos.

La medición de poblaciones de dímeros utilizando etiquetas moleculares liberables ofrece múltiples ventajas, incluyendo (1) la separación de las etiquetas moleculares liberadas de una mezcla de ensayo que proporciona un fondo notablemente reducido y una ventaja significativa en términos de sensibilidad; y (2) el uso de etiquetas moleculares específicamente diseñadas para facilitar la separación y detección que ofrece una capacidad de multiplexado útil para que múltiples componentes del complejo receptor se puedan medir de forma simultánea en el mismo ensayo. Los ensayos que utilizan estas etiquetas pueden tener diversas formas y se divulgan en las referencias siguientes: Patentes USA n.º 6 627 400, 6 673 550, 6 949 347, 7 105 308; Solicitud de patente USA publicada n.º 2009/0191559; y Publicación de patente internacional n.º WO 2004/011900. Por ejemplo, se pueden emplear diversas técnicas de separación que pueden distinguir moléculas en base a una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se van a separar, incluyendo, por ejemplo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, la solubilidad, la pKa, la hidrofobicidad, la carga, el ratio carga/masa o la polaridad. En un aspecto, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se diferencian en la movilidad electroforética y las características de detección óptica y se separan mediante electroforesis. En otro aspecto, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se pueden diferenciar por el peso molecular, la forma, la solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga o polaridad y se separan mediante HPLC de lugares normal o lugares inversa, HPLC de intercambio de iones, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas o cromatografía de gases.

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

Las mediciones realizadas directamente en muestras de tejido se pueden normalizar incluyendo mediciones sobre dianas celulares o tisulares que son representativas del número total de células de la muestra y/o de los números de subtipos concretos de células de la muestra. La medición adicional puede ser preferible, o incluso necesaria, debido a la heterogeneidad celular y tisular de las muestras de los pacientes, en particular de las muestras de tumor, que pueden comprender fracciones sustanciales de células normales.

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden proporcionar mezclas que contienen pluralidades de diferentes compuestos de unión, donde cada compuesto de unión diferente tiene una o más etiquetas moleculares unidas a través de enlaces clivables. La naturaleza del compuesto de unión, enlace clivable y etiqueta molecular puede variar en gran medida. Un compuesto de unión puede comprender una composición de unión a anticuerpo, un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina, o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse de forma específica a una molécula o proteína diana o de formar un complejo estable con un analito de interés, como un homodímero de HER2. En un aspecto, un compuesto de unión puede estar representado por la fórmula siguiente:

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

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

Preferiblemente B es una composición de unión a anticuerpo que se une de forma específica a una diana, como un determinante antigénico de HER2. Los anticuerpos específicos para los epítomos de HER2 se proporcionan en los ejemplos incluidos en el presente documento. Las composiciones de anticuerpos se producen fácilmente a partir de una amplia variedad de anticuerpos disponibles en el mercado, tanto monoclonales como policlonales. En concreto, algunos anticuerpos específicos para los receptores del factor de crecimiento epidérmico se divulgan en las Patentes USA n.º 5 677 171; 5 772 997; 5 968 511; 5 480 968; y 5 811 098. La Patente USA 5 599 681 divulga anticuerpos específicos para los lugares de fosforilación de proteínas. Distribuidores como Cell Signaling Technology (Beverly, MA), Biosource International (Camarillo, CA) y Upstate (Charlottesville, VA) también proporcionan anticuerpos monoclonales y policlonales.

El enlace clivable L puede ser prácticamente cualquier grupo de unión química que pueda ser clivado en condiciones que no degraden la estructura ni afecten a las características de detección de la etiqueta molecular liberada E. Cuando se utiliza una sonda de clivaje en un formato de ensayo homogéneo, el enlace clivable L es clivado mediante un agente de clivaje generado por la sonda de clivaje que actúa a una corta distancia, de forma que solamente se clivan los enlaces clivables que se encuentran en una proximidad inmediata a la sonda de clivaje. Típicamente, este agente debe ser activado introduciendo un cambio físico o químico en la mezcla de reacción, para que el agente produzca una especie activa efímera que se difunda hasta un enlace clivable para efectuar el clivaje. En un formato homogéneo, el agente de clivaje se une preferiblemente a una fracción de unión, como un anticuerpo, que dirige antes de la activación al agente de clivaje a un lugar concreto en la proximidad de un compuesto de unión con etiquetas moleculares liberables. En estas realizaciones, a efectos del presente un agente de clivaje se denomina "fracción que induce el clivaje". Un ejemplo de enlace clivable se ilustra en la Figura 2C.

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

En un aspecto, los sistemas de reactivos clivables disponibles en el mercado se pueden utilizar con la invención. Por ejemplo, se puede introducir un enlace de disulfuro entre una composición de unión a anticuerpo y una etiqueta molecular utilizando un agente heterofuncional como N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio) tolueno (SMPT) o similares, disponibles en distribuidores como Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Los enlaces de disulfuro introducidos por estos enlaces se pueden romper mediante tratamiento con un agente reductor, como ditiotreititol (DTT), ditioeritritol (DTE), 2-mercaptoetanol o borohidruro sódico. Las concentraciones típicas de agentes reductores para efectuar el clivaje de enlaces de disulfuro oscilan entre 10 y 100 mM. Se puede introducir un enlace sensible a la oxidación entre una composición de unión a anticuerpo y una etiqueta molecular utilizando el reactivo reticulado del éster NHS homobifuncional, disuccinimidil tartarato (DST) (comercializado por Pierce) que contiene diolescis centrales que son susceptibles de clivaje con periodato sódico (por ejemplo, 15 mM de periodato a pH fisiológico durante cuatro horas). Los enlaces que contienen componentes separadores esterificados pueden ser clivados con agentes nucleofílicos sólidos, como hidroxilamina, por ejemplo 0,1 N hidroxilamina, pH 8,5, durante 3-6 horas a 37 °C. Estos separadores se pueden introducir a través de un agente reticulado homobifuncional como etilenglicol bis(succinimidilsuccinata) (EGS) comercializado por Pierce (Rockford, IL). Se puede introducir un enlace sensible a las bases con un grupo sulfona. Los agentes reticulados homobifuncionales que se pueden utilizar para introducir grupos sulfona en un enlace clivable incluyen bis [2-(succinimidiloxycarbonilo)etil] sulfona (BSOCOES), y 4,4-difluoro-3,3-dinitrofenilsulfona (DFDNPS). Entre los ejemplos de condiciones básicas para el clivaje se incluyen 0,1 M de fosfato sódico, ajustado a un pH 11,6 mediante la adición de base Tris, que contiene 6 M de urea, 0,1% de SDS, y 2 mM de DTT, con incubación a 37 °C durante dos horas. Los enlaces fotoclivables también incluyen los divulgados en la Patente USA n.º 5 986 076.

Cuando L es sensible a la oxidación, L puede ser un tioéter o su análogo de selenio; o una olefina, que contiene dobles enlaces de carbono-carbono, donde el clivaje de un doble enlace de un grupo oxo libera la etiqueta molecular E. Algunos ejemplos de enlaces sensibles a la oxidación se divulgan en las Patentes USA n.º 5 622 929, 6 627 400 y 6 949 347.

La etiqueta molecular E de la presente invención puede comprender una etiqueta electrófora como la que se describe en las siguientes referencias cuando la separación de pluralidades de etiquetas moleculares se realiza mediante cromatografía de gases o espectrometría de masas: Véase, por ejemplo, Zhang *et al.*, 2002, *Bioconjugate Chem.* 13:1002-1012; Giese, 1983, *Anal. Chem.* 2:165-168; y las Patentes USA n.º 4 650 750; 5 360 819; 5 516 931; y 5 602 273.

La etiqueta molecular E es preferiblemente un compuesto orgánico soluble en agua que es estable con respecto a la especie activa, especialmente oxígeno singlete, y que incluye un grupo reportero o de detección. Por lo demás, E

puede presentar grandes variaciones de tamaño y estructura. En un aspecto, E tiene un peso molecular de entre 50 y unos 2500 daltons, y más preferiblemente de entre 50 y unos 1500 daltons. E puede comprender un grupo de detección para generar una señal electroquímica, fluorescente o cromogénica. En realizaciones que emplean la detección por masa, E puede no tener una fracción separada a efectos de detección. Preferiblemente, el grupo de detección genera una señal fluorescente. Un ejemplo de etiqueta molecular (Pro 11) se muestra en la Figura 2.

Las etiquetas moleculares de una pluralidad se seleccionan de forma que cada una disponga de una característica de separación única y/o una propiedad óptica única con respecto a los demás miembros de la misma pluralidad. En un aspecto, la característica de separación electroforética o cromatográfica es el tiempo de retención bajo un conjunto de condiciones de separación estándar convencionales en la técnica, tales como voltaje, presión de la columna, tipo de columna, lugares móvil o medio de separación. En otro aspecto, la propiedad óptica es una propiedad de fluorescencia, como espectro de emisión, duración de la fluorescencia o intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda o banda de longitudes de onda concreta. Preferiblemente, la propiedad de fluorescencia es la intensidad de la fluorescencia. Por ejemplo, cada etiqueta molecular de una pluralidad puede tener las mismas propiedades de emisión de fluorescencia, pero cada una diferirá de las demás en función de un tiempo de retención único. Por otra parte, una o dos o más de las etiquetas moleculares de una pluralidad pueden tener tiempos de migración o retención idénticos, pero tendrán propiedades fluorescentes únicas, por ejemplo, espectros de emisión espectralmente resolubles, de forma que todos los miembros de la pluralidad se puedan distinguir mediante la combinación de la medición de la fluorescencia y la separación molecular.

Preferiblemente, las etiquetas moleculares liberadas se detectan mediante separación electroforética y la fluorescencia de un grupo de detección. En estas realizaciones, las etiquetas moleculares que tienen unas propiedades de fluorescencia sustancialmente idénticas tienen diferentes movilidades electroforéticas de forma que se forman distintos picos en un electroferograma bajo condiciones de separación. Preferiblemente, las pluralidades de etiquetas moleculares de la invención se separan mediante un aparato convencional de electroforesis capilar, en presencia o ausencia de una matriz de cribado convencional. Durante o después de la separación electroforética, las etiquetas moleculares son detectadas o identificadas mediante la grabación de señales de fluorescencia y los tiempos de migración (o distancias de migración) de los compuestos separados o elaborando un gráfico de fluorescencia relativa y orden de migración de las etiquetas moleculares (por ejemplo, como un electroferograma). Preferiblemente, la presencia, la ausencia y/o las cantidades de etiquetas moleculares se miden utilizando uno o más de los estándares divulgados por la Solicitud de patente USA publicada n.º 2003/0170734.

También se pueden diseñar pluralidades de etiquetas moleculares para la separación mediante cromatografía, en base a una o más características físicas que incluyen el peso molecular, la forma, la solubilidad, la pKa, la hidrofobicidad, la carga, la polaridad o similares, por ejemplo, como se divulga en la Solicitud de patente USA publicada n.º 2003/0235832. Se selecciona una técnica de separación cromatográfica en base a parámetros como el tipo de columna, los puntos sólidos, los puntos móviles y similares, y a continuación se selecciona una pluralidad de etiquetas moleculares que pueden ser separadas para formar distintos picos o bandas en una única operación. Diversos factores determinan qué técnica de HPLC se selecciona para su uso en la invención, incluyendo el número de etiquetas moleculares a detectar (es decir, el tamaño de la pluralidad), las cantidades estimadas de cada etiqueta molecular que se generarán en los ensayos, la disponibilidad y facilidad para sintetizar las etiquetas moleculares que son candidatas para una serie que se utilizará en ensayos multiplexados, la modalidad de detección empleada y la disponibilidad, solidez, coste y facilidad de uso de los instrumentos de HPLC, columnas y solventes. Por lo general, se da prioridad a las columnas y técnicas que resultan adecuadas para analizar cantidades limitadas de una muestra y que proporcionan las mejores separaciones de resolución. Se puede encontrar orientación para realizar estas selecciones en la literatura, como, por ejemplo, Snyder *et al.*, 1988, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Nueva York; Millner, 1999, *High Resolution Chromatography: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York; Chi-San Wu, 1999, *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, Academic Press, San Diego; y Oliver, 1989, *HPLC of Macromolecules: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.

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

La fracción de detección D puede ser un colorante o una etiqueta fluorescente, un colorante o una etiqueta cromogénica o una etiqueta electroquímica. Preferiblemente, D es un colorante fluorescente. Entre los ejemplos de colorantes fluorescentes para su uso en la invención se incluyen colorantes de rodamina solubles en agua, fluoresceínas, 4,7-diclorofluoresceínas, colorantes de benzoxanteno y colorantes de transferencia de energía, tal y como se divulga en las siguientes referencias: *Handbook of Molecular Probes and Research Reagents*, 8ª ed., 2002, Molecular Probes, Eugene, OR; Patentes USA n.º 4 318 846, 4 997 928, 5 945 526, 6 096 723, 6 191 278, y 6 372 907, y Lee *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Research* 25:2816-2822. Preferiblemente D es una fluoresceína o un derivado de la fluoresceína.

Una vez que cada uno de los compuestos de unión se ha obtenido por separado mediante una etiqueta molecular diferente, se une con otros compuestos de unión para formar una pluralidad de compuestos de unión. Normalmente, cada tipo diferente de compuesto de unión se encuentra presente en una composición en la misma proporción; no obstante, las proporciones se pueden variar como una opción de diseño, de forma que uno o un subconjunto de

compuestos de unión concreto se encuentre presente en una proporción mayor o menor en función de lo recomendable que resulte o de los requisitos para una realización o ensayo concreto. Los factores que pueden afectar a estas opciones de diseño incluyen, entre otros, la afinidad del anticuerpo y la avidéz por una diana concreta, la prevalencia relativa de una diana, las características fluorescentes de una fracción de detección de una etiqueta molecular y similares.

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

Una consideración a la hora de diseñar ensayos que emplean una fracción que induce el clivaje y un enlace clivable es que estos no estén muy alejados entre sí cuando se unen a un complejo receptor que la especie activa ha generado, dado que la fracción que induce el clivaje no podrá clivar de forma eficiente el enlace clivable. En un aspecto, los enlaces clivables se encuentra preferiblemente a unos 1000 nm y preferiblemente a unos 20-200 nm de una fracción que induce el clivaje del enlace. Más preferiblemente en el caso de las fracciones que inducen el clivaje del fotosensibilizador que generan oxígeno singlete, los enlaces clivables se encuentran a unos 20-100 nm de un fotosensibilizador en un complejo receptor. El rango en el que una fracción que induce el clivaje puede clivar efectivamente un enlace clivable (es decir, clivar lo suficiente una etiqueta molecular para que genere una señal detectable) se denomina en el presente "proximidad efectiva". Un experto en la técnica reconocerá que la proximidad efectiva de un sensibilizador concreto podrá depender de los detalles de un diseño de ensayo concreto y se podrá determinar o modificar mediante experimentación rutinaria.

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

Los fotosensibilizadores se pueden unir directa o indirectamente, mediante enlaces covalentes o no covalentes, al agente de unión de un reactivo de clase específica. Las orientaciones para producir estas composiciones, particularmente para anticuerpos como agentes de unión se encuentran disponibles en la literatura, por ejemplo, en los campos de la terapia fotodinámica, inmunodiagnósticos y similares. Algunos ejemplos de orientaciones se pueden encontrar en Ullman *et al.*, 1994, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5426-5430; Strong *et al.*, 1994, *Ann. New York Acad. Sci.* 745: 297-320; Yarmush *et al.*, 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.* 10: 197-252; y las Patentes USANº 5 340 716, 5 516 636, 5 709 994, y 6 251 581.

Hay una gran variedad de fuentes de luz disponibles para fotoactivar los fotosensibilizadores a fin de que generen oxígeno singlete. Se pueden utilizar tanto fuentes policromáticas como monocromáticas siempre que la fuente sea lo suficientemente intensa como para producir suficiente oxígeno singlete en un plazo de tiempo práctico. La longitud de la radiación depende de la naturaleza del fotosensibilizador, la naturaleza del enlace clivable, la potencia de la fuente de radiación y su distancia de la muestra. En general, el periodo de radiación puede ser aproximadamente desde menos de un microsegundo hasta unos 10 minutos, normalmente en el rango aproximado de entre un milisegundo y 60 segundos. La intensidad y la duración de la radiación deberían ser suficientes para excitar al menos el 0,1% de las moléculas fotosensibilizadoras, normalmente al menos aproximadamente un 30% de las moléculas fotosensibilizadoras y preferiblemente, prácticamente todas las moléculas fotosensibilizadoras. Entre los ejemplos de fuentes de luz se incluyen láseres como, por ejemplo, láseres de helio-neón, láseres de argón, láseres YAG, láseres de He/Cd y láseres de rubí; fotodiodos, lámparas de mercurio, sodio y vapor de xenón; lámparas incandescentes, como lámparas de tungsteno y tungsteno/halógenas y lámparas de destellos. Un ejemplo de dispositivo de fotoactivación adecuado para su uso en los métodos de esta invención se divulga en la Publicación de patente internacional n.º WO 03/051669. En estas realizaciones, el dispositivo de fotoactivación es un conjunto de diodos emisores de luz (LED) montados en una carcasa que permite la iluminación simultánea de todas las paredes de una placa de 96 pocillos.

Entre los ejemplos de fotosensibilizadores que se pueden utilizar en la presente invención se encuentran aquellos que presentan las mencionadas propiedades y lo divulgado en las Patentes USA n.º 5 536 834, 5 763 602, 5 565 552, 5 709 994, 5 340 716, 5 516 636, 6 251 581, y 6 001 673; la Solicitud de patente europea publicada

n.º 0484027; Martin *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.*186:635- 645; and Yarmush *et al.*, 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.* 10:197-252. Como ocurre con los sensibilizadores, en determinadas realizaciones un fotosensibilizador puede estar asociado con un soporte en lugares sólida unido de forma covalente o no covalente a la superficie del soporte o incorporado en el cuerpo del soporte. En general, el fotosensibilizador está asociado con el soporte en una cantidad necesaria para conseguir la cantidad necesaria de oxígeno singlete. Generalmente, la cantidad de fotosensibilizador se determina empíricamente a través de métodos rutinarios.

En una realización, se incorpora un fotosensibilizador a una partícula de látex para formar gránulos fotosensibilizadores, por ejemplo, tal y como se divulga en las Patentes USA n.º 5 709 994 y 6 346 384; y en la Publicación de patente internacional n.º WO 01/84157. Alternativamente, se pueden preparar gránulos fotosensibilizadores uniendo covalentemente un fotosensibilizador, como rosa de bengala, a gránulos de látex de 0,5 micrones mediante grupos clorometilo en el látex para proporcionar un grupo de enlace éster, tal y como se describe en J. Amer. Chem. Soc., 97:3741 (1975). Esta reacción se puede realizar, por ejemplo, en una placa de microtitración convencional de 96 o 384 pocillos o similares, que tenga una membrana de filtro que forme una pared, por ejemplo, la parte inferior de los pocillos, y que permita que los reactivos sean retirados mediante la aplicación de vacío. Esto permite cambiar cómodamente los tampones, si el tampón necesario para la unión específica de compuestos de unión es diferente del tampón necesario para la generación de oxígeno singlete o la separación. Por ejemplo, en el caso de los compuestos de unión basados en anticuerpo, se requiere un tampón altamente salino. Si se emplea la separación electroforética de las etiquetas liberadas, entonces el mejor rendimiento se consigue cambiando el tampón por uno con una menor concentración de sal, adecuado para la electroforesis. Por ejemplo, una sonda de clivaje puede comprender un anticuerpo haptenado primario y una proteína de unión anti-hapteno secundaria derivatizada con múltiples moléculas fotosensibilizadoras. Un anticuerpo haptenado primario preferible es un anticuerpo biotinilado y las proteínas de unión anti-hapteno secundarias preferibles pueden ser un anticuerpo anti-biotina o estreptavidina. Otras combinaciones de estos reactivos primarios y secundarios son bien conocidas en la técnica. Algunos ejemplos de combinaciones de estos reactivos se ilustran en Haugland, 2002, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Reagents, Ninth Edition*, Molecular Probes, Eugene, OR. A continuación, se describe un ejemplo de combinación de estos reactivos. Los compuestos de unión que tienen etiquetas liberables ("mT₁" y "mT₂"), y el anticuerpo primario obtenido con biotina se unen de forma específica a diferentes epítopos del dímero receptor en la membrana. La proteína de unión específica de biotina, por ejemplo, estreptavidina, se une a biotina y atrae múltiples fotosensibilizadores a la proximidad efectiva de los compuestos de unión. La proteína de unión específica a biotina también puede ser un anticuerpo anti-biotina y los fotosensibilizadores se pueden unir a través de un grupo amina libre de la proteína a través de procesos químicos de acoplamiento convencionales, por ejemplo, Hermanson (*supra*). Un ejemplo de fotosensibilizador para tal uso es un éster NHS de azul de metileno preparado como se divulga en la Solicitud de patente europea publicada 0510688.

Para ejecutar los métodos de la invención, se realiza una combinación de los componentes del ensayo, incluyendo la muestra a ensayar, los compuestos de unión y opcionalmente la sonda de clivaje. Por lo general, los componentes del ensayo pueden combinarse en cualquier orden. Sin embargo, en determinadas aplicaciones el orden de adición puede ser relevante. Por ejemplo, es posible que se desee controlar la unión competitiva, como en un ensayo cuantitativo. O es posible que se desee controlar la estabilidad del complejo formado. En estas aplicaciones, las reacciones se deben realizar por puntos.

Por lo general, las cantidades de cada reactivo se pueden determinar empíricamente. La cantidad de muestra utilizada en un ensayo se determinará por el número previsto de complejos diana presentes y los medios de separación y detección utilizados para controlar la señal del ensayo. En general, las cantidades de los compuestos de unión y la sonda de clivaje se pueden proporcionar en exceso molar con respecto a la cantidad prevista de las moléculas diana de la muestra, por lo general a un exceso molar aproximado de al menos 1,5 y más preferiblemente 10 veces de exceso o más. En aplicaciones concretas, la concentración utilizada puede ser mayor o menor, dependiendo de la afinidad de los agentes de unión y del número previsto de moléculas diana presentes en una única célula. Cuando se determina el efecto de un compuesto químico sobre la formación de complejos de superficie celular oligoméricos, el compuesto se puede añadir a las células antes de, al mismo tiempo que o después de la adición de las sondas, en función del efecto que se desee controlar.

La mezcla del ensayo se puede combinar e incubar en condiciones que permiten la unión de las sondas a las moléculas de superficie celular, normalmente en un medio acuoso, generalmente a un pH fisiológico (comparable al pH al que se cultivan las células), mantenidas mediante un tampón a una concentración aproximada de entre 10 y 200 nM. Se pueden utilizar tampones convencionales, así como otros aditivos convencionales necesarios, tales como sales, medios de cultivo, estabilizantes, etc. Normalmente se utilizan temperaturas fisiológicas y constantes. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre unos 4° y 70°C, más habitualmente entre unos 15° y 45°C, y más habitualmente entre unos 25° y 37°C.

Tras producir la mezcla del ensayo y realizar la incubación para permitir que las sondas se unan a las moléculas de superficie molecular, la mezcla se puede tratar para activar el agente de clivaje que clive las etiquetas de los compuestos de unión que se encuentran en la proximidad efectiva del agente de clivaje, liberando la correspondiente etiqueta de la superficie celular en la solución. La naturaleza de este tratamiento dependerá del mecanismo de acción del agente de clivaje. Por ejemplo, cuando se emplea un fotosensibilizador como agente de clivaje, la activación del clivaje puede comprender la radiación de la mezcla a una longitud de onda de luz apropiada para el sensibilizador concreto utilizado.

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

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, si las condiciones de reacción del ensayo pueden interferir en la técnica de separación empleada, puede resultar necesario eliminar o sustituir el tampón de reacción del ensayo antes del clivaje y la separación de las etiquetas moleculares. Por ejemplo, las condiciones del ensayo pueden incluir concentraciones de sal (por ejemplo, necesarias para la unión específica) que degradan el rendimiento de la separación cuando las etiquetas moleculares se separan en función de la movilidad electroforética. Por tanto, estos tampones altamente salinos pueden ser retirados, por ejemplo, antes del clivaje de las etiquetas moleculares, y sustituidos por otro tampón adecuado para la separación electroforética por filtración, aspiración, dilución u otros medios.

En determinadas realizaciones, cuando un sujeto se ha sometido a un tratamiento con un agente que actúa sobre HER2, o es identificado como un sujeto con un cáncer HER2-positivo que debería recibir tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer, el tratamiento es la administración de una terapia de combinación que incluye un agente que actúa sobre HER2. En algunas realizaciones, el agente que actúa sobre HER2 puede ser trastuzumab. La terapia de combinación puede incluir trastuzumab en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos conocidos por los expertos en la técnica entre otros. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico tiene un mecanismo de acción diferente que el trastuzumab. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser un anti-metabolito (*por ejemplo*, 5-fluorouracil (5-FU), metotrexato (MTX), fludarabina, etc.), un agente antimicrotúbulo (*por ejemplo*, vincristina, vinblastina; taxanos como paclitaxel y docetaxel; etc.), un agente alquilante (*por ejemplo*, ciclofosfamida, melfalano, biscloroetilnitrosurea, etc.), agentes de platino (*por ejemplo*, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, JM-216, CI-973, etc.), antraciclinas (*por ejemplo*, doxorubicina, daunorubicina, etc.), agentes antibióticos (por ejemplo, mitomicina-C, actinomicina D, etc.), inhibidores de la topoisomerasa (*por ejemplo*, etoposido, camptotecinas, etc.) u otros agentes quimioterapéuticos conocidos por un experto en la técnica.

Entre los ejemplos concretos de agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar en las diversas realizaciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, formas de administración y kits de la invención, se incluye, entre otros, la citarabina, melfalano, topotecán, fludarabina, etoposido, idarubicina, daunorubicina, mitoxantrona, cisplatino paclitaxel, y ciclofosfamida.

Otros agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar incluyen abarelix, aldesleukina, alemtuzumab, alitretinoína, allopurinol, altretamina, amifostina, anastrozole, trióxido arsénico, asparaginasa, BCG viva, bevacezumab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfano, calusterona, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucil, cinacalcet, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, darbeopetina alfa, daunorubicina, denileukina difitox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, dromostanolona, solución B de Elliott, epirubicina, epoetina alfa, estramustina, etoposida, exemestano, filgrastima, floxuridina, fludarabina, fluorouracil, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, gefitinib, goserelina, hidroxiurea, ibritumomab tiuxetano, idarubicina, ifosfamida, imatinib, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, irinotecano, letrozol, leucovorina, levamisol, lomustina, mecloretamina, megestrol, melfalan, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metoxsaleno, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nandrolona, nofetumomab, oblimersen, oprelvekina, oxaliplatina, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastima, pemetrexed, pentostatina, pipobroman, plicamicina, polifeprosano, porfimer, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostima, streptozocina, talco, tamoxifeno, tarceva, temozolomida, teniposida, testolactona, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tosimumab, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, y zoledronato.

En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPE. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama en un punto temprano. En algunas realizaciones, cualquier cáncer que pueda ser sensible a un agente que actúa sobre HER2 puede ser controlado. El agente que actúa sobre HER2 puede ser cualquier agente que actúa sobre HER2. En determinadas realizaciones, el agente que actúa sobre HER2 es uno de los agentes descritos en el presente documento. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente que actúa sobre HER2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es paclitaxel.

Importancia de HER2 y p95 en el cáncer de mama

El cáncer de mama se encuentra entre las patologías malignas con un riesgo notablemente elevado de recidiva cerebral. Tsukada, Y. *et al.*, Central nervous system metastasis from breast carcinoma. Autopsy study. *Cancer* 52:2349-2354 (1983); Schouten, L.J. *et al.*, Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer* 94:2698-26705 (2002). Las metástasis cerebrales que acompañan a un cáncer de mama están asociadas con un mal pronóstico, afectan seriamente a la calidad de vida y son relativamente resistentes a las terapias sistémicas. Un riesgo particularmente elevado de recidiva cerebral está asociado con la sobreexpresión o amplificación del gen HER2. Hicks, D.G. *et al.*, Breast cancers with brain

metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol.* 30:1097-1104 (2006); Gabos, Z. *et al.* Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol.* 24:5658- 5663 (2006); Gonzalez-Angulo, A.M. *et al.*, Central nervous system metastases in patients with high-risk breast carcinoma after multimodality treatment. *Cancer.* 101:1760-1766 (2004).

Actualmente, el componente estándar de la terapia sistémica en pacientes con cáncer de mama HER2-positivo es el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular del receptor de HER2. A pesar de que normalmente el uso de trastuzumab se asocia con beneficios considerables de ausencia de progresión y supervivencia global, solo una fracción de los pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo responden a este agente y una proporción significativa de los que responden sufren una recaída en el plazo de un año. Slamon, D.J. *et al.*, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 344:783- 792 (2001); Burstein, H.J. *et al.*, Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study. *Cancer* 110:965-972 (2007); Marty, M. *et al.* Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 Study Group. *J Clin Oncol.* 23:4265-4274 (2005); Schaller, G. *et al.*, Phase II study of capecitabine plus trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2- 20 overexpressing metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines or taxanes. *J Clin Oncol.* 25:3246-3250 (2007); Robert, N. *et al.*, Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin compared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2- overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 24:2786-2792 (2006). Se ha demostrado que el aumento de los niveles totales de HER2 (H2T) está asociado con una mejor respuesta al trastuzumab y con un tiempo prolongado hasta la progresión en los pacientes con cáncer de mama avanzado. Lipton, A. *et al.* Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence in situ hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Cancer* 116:5168-78 (2010); Toi, M. *et al.*, Differential survival following trastuzumab treatment based on quantitative HER2 expression and HER2 homodimers in a clinic-based cohort of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer* 10:56 (2010).

Es importante señalar que debido al elevado peso molecular (145 000 Da) y a otras propiedades físicas y químicas, el trastuzumab no cruza la barrera hematoencefálica y es poco efectivo para prevenir y tratar las metástasis cerebrales. Pestalozzi, B.C. y Brignoli, S., Trastuzumab in CSF. *J. Clin. Oncol.* 18:2349-2351 (2000); Stemmiar, J. *et al.*, V. Brain metastases in HER2- overexpressing metastatic breast cancer: comparative analysis of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Oncol.* 24:1525 (2006).

Sin embargo, p95 es una forma truncada de HER2 que carece del lugar de unión del trastuzumab y, por tanto, se cree que confiere resistencia al tratamiento con trastuzumab. Sperinde, J. *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 16(16): 4226-4235 (2010). Los primeros datos sugerían que la presencia de p95 está correlacionada con el grado de implicación de nódulos linfáticos, evadiendo la cuestión de la causalidad: si los niveles de p95 eran el resultado o contribuían a un entorno favorable para la diseminación del tumor. See Molina *et al.*, *Clin. Can. Res.* 8:347-353 (2002). Utilizando la medición indirecta de la localización subcelular del dominio intracelular (ICD) de HER2, se ha demostrado que la distribución intracelular del ICD de HER2, que por separado se ha demostrado que mantiene una correlación con la expresión de p95, tendía (prueba de Fisher $p=0,057$) a una correlación con la reducción de la respuesta RECIST al tratamiento con trastuzumab. Scaltriti *et al.*, *J. Natl Cancer Inst.* 99:628-638 (2007). Utilizando la detección por anticuerpo directa de p95, se descubrió que la expresión de p95 estaba correlacionada con una menor supervivencia libre de progresión (HR=1,9; $p=0,017$) y supervivencia global (HR=2,2; $p=0,012$). Sperinde *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 16(16): 4226-4235 (2010).

Los estudios han demostrado que el 30-50% de los pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo desarrollarán una recidiva cerebral, con un riesgo anual de aproximadamente el 10%. Véase, por ejemplo, Bendell, J.C. *et al.*, Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer* 97:2972-2977 (2003); Shmueli, E. *et al.*, Central nervous system progression among patients with metastatic breast cancer responding to trastuzumab treatment. *Eur J Cancer* 40:379-382 (2004); Clayton, A.J. *et al.*, Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab with trastuzumab for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 91:639-643 (2004); Lai, R. *et al.*, The risk of central nervous system metastases after trastuzumab therapy in patients with breast carcinoma. *Cancer* 15:810-816 (2004); Lower, E.E. *et al.*, Increased rate of brain metastases with trastuzumab therapy not associated with impaired survival. *Clin Breast Cancer* 4:114-119 (2003); Burstein, H.J. *et al.*, Isolated central nervous system metastases in patients with HER2 overexpressing advanced breast cancer treated with first-line trastuzumab based therapy. *Ann Oncol.* 16:1772-1777 (2005); Stemmiar, H.J., *et al.*, V. Characteristics of patients with brain metastases receiving trastuzumab for HER2 overexpressing metastatic breast cancer. *Breast* 15:219-225 (2006); Gori, S. *et al.*, Central nervous system metastases in HER-2 positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab: incidence, survival, and risk factors. *Oncologist* 12:766-773 (2007); Duchnowska, R. *et al.*, Risk factors for brain relapse in HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 117:297-303 (2009).

Debido a los problemas de penetración de trastuzumab en la barrera hematoencefálica, las metástasis cerebrales a menudo ocurren en pacientes con una enfermedad sensible o estable en lugares metastásicos extracraneales. Nam, B.H. *et al.*, Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases. *Breast Cancer Res.* 10:R20 (2008); Eichler, A.F. *et al.*, Survival in patients with brain metastases from breast cancer: the importance of HER-2

status. *Cancer* 112:2359- 2367 2008). Por otra parte, debido al mejor control de la enfermedad metastásica extracraneal, se ha averiguado que la terapia con trastuzumab retrasa el desarrollo de recidiva cerebral. Dawood, S. *et al.*, Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. *Ann Oncol.* 19:1242-1248 (2008); Park, I.H. *et al.*, Trastuzumab treatment beyond brain progression in HER2-positive metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 20:56-62 (2009). Por otra parte, continuar el tratamiento con trastuzumab después de la progresión cerebral resulta en una supervivencia más larga. Church, D.N. *et al.*, Extended survival in women with brain metastases from HER2 overexpressing breast cancer. *Am J Clin Oncol.* 31:250-254 (2008); Metro, G. *et al.*, Clinical utility of continuing trastuzumab beyond brain progression in HER-2-positive metastatic breast cancer. *Oncologist* 12:1467-1469 (2007).

Diversos estudios retrospectivos han analizado las características clínicas y biológicas asociadas a la propensión a desarrollar una recidiva cerebral en los pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo. Entre los factores adversos documentados se incluían la presencia de enfermedad visceral, menor edad, estado premenopáusico, breve intervalo libre de enfermedad tras una terapia primaria y estado del receptor de la hormona negativo. Sin embargo, los resultados de estudios concretos han sido incoherentes y ninguno de estos factores ni su combinación podrían permitir seleccionar un conjunto de pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo que se podría beneficiar del control activo de la recidiva cerebral o de potenciales estrategias preventivas. Recientemente se ha averiguado que la expresión de varios genes está asociada con un mayor riesgo de recidiva cerebral en la población general de pacientes con cáncer de mama (Bos, P.D. *et al.*, Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459:1005-1009 (2009)) como en el subconjunto HER2-positivo (Duchnowska, R. *et al.*, Gene expression analysis for prediction of early brain metastasis in HER2-positive breastcancer patients. *J Clin Oncol.* 26(Suppl.):45s (2008)). Sin embargo, no se ha desarrollado ningún marcador molecular sólido para predecir la recidiva cerebral.

Utilizando los métodos reivindicados que se describen en el presente documento, se ha demostrado por primera vez que la valoración cuantitativa de la proteína HER2, o de la proteína HER2 y la proteína p95, en el tumor primario puede identificar a los pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo que presentan un riesgo particularmente elevado de desarrollar metástasis cerebral durante la terapia con trastuzumab, permitiendo la identificación de sujetos con unos niveles relativamente altos de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95. Utilizando los métodos reivindicados que se describen en el presente, se ha determinado que unos niveles relativamente elevados de proteína HER2, o de proteína HER2 y proteína p95, están asociados con un menor tiempo hasta la metástasis cerebral (TTBM). Cabe señalar, en el modelo multivariante, que la medición cuantitativa de HER1 y p95, el grado del tumor, y el tiempo hasta la progresión distante fueron los únicos indicadores de recidiva cerebral, y solamente H2T y el tiempo hasta la progresión distante fueron indicadores estadísticamente significativos de este evento en el subconjunto seleccionado más estrictamente de pacientes con cáncer HER2-positivo evaluados mediante FISH. Todos los demás factores moleculares y clínicos, como el ratio HER2/CEP11, la amplificación de HER2, el estado del receptor de hormona, el estado menopáusico y la edad, no mostraron una correlación estadísticamente significativa con el TTBM. Este efecto biológico diferencial de los niveles de H2T, o los niveles de H2T y los niveles de p95, se puede deber a la ineficacia de trastuzumab para prevenir y combatir la metástasis cerebral. Sin embargo, también es posible que un mejor control de la enfermedad extracraneal con este compuesto pueda simplemente prolongar el tiempo hasta la manifestación clínica de la recidiva cerebral (el efecto de "desenmascaramiento"). Esto último se ve respaldado por el análisis descrito en el presente, teniendo en cuenta que las progresiones en otros lugares como eventos concomitantes confirmaron una correlación significativa entre los niveles elevados de H2T (considerada la variable continua) y el TTBM.

EJEMPLOS

Cualesquiera ejemplos no incluidos en el ámbito de aplicación de las reivindicaciones se ofrecen exclusivamente con fines comparativos.

EJEMPLO 1 Análisis de muestras de sujetos

Grupo de estudio: El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Medicina de Gdan'sk, el centro de coordinación. Los pacientes fueron identificados a través de sistemas hospitalarios informatizados, listas de inclusión en protocolos o mediante búsqueda manual. Un grupo de estudio incluía una serie de pacientes con cáncer de mama avanzado, patológicamente confirmado y HER2-positivo (IHC 3+ o IHC 2+ y FISH positivo) de nueve instituciones polacas. Todos los pacientes recibieron al menos una dosis de trastuzumab con o sin quimioterapia (típicamente taxanos, vinorelbina o capecitabina) entre diciembre de 2000 y julio de 2010. La línea de terapia durante la que se administró por primera vez el trastuzumab no se registró, aunque el tiempo medio desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta el inicio del trastuzumab fue de 3,4 meses (rango, 0-49 meses). Este retraso se produjo por el hecho de que una proporción importante de pacientes recibió trastuzumab como terapia de segunda línea o de línea posterior en el entorno metastásico. Dado que el tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad metastásica y el inicio de trastuzumab no se correlacionó con el tiempo hasta la metástasis cerebral (TTBM) ($p=0,7$), este factor no se utilizó para la estratificación. La mayoría de los pacientes permanecieron con el tratamiento de trastuzumab hasta la progresión, tres pacientes terminaron la administración de trastuzumab antes como resultado de la aparición de toxicidad excesiva o por decisión personal, y 20 pacientes continuaron la terapia con trastuzumab después de la progresión.

Un total de 164 pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo fueron identificados inicialmente, 22 de los cuales fueron posteriormente eliminados del análisis debido a metástasis cerebrales preexistentes (n=6) o porque recibieron trastuzumab en el entorno adyuvante (n=16), dejando una cohorte de estudio de 142 pacientes (Tabla 1).

5 La siguiente información se extrajo de los historiales médicos: fecha de diagnóstico del cáncer de mama, terapia local y sistémica previa, fecha y tipo de la primera progresión (local, regional, distante), fecha de diagnóstico de la enfermedad metastásica, lugar dominante de la enfermedad metastásica, fechas en las que se administró trastuzumab, fecha de la primera progresión durante la terapia con trastuzumab y fecha de la muerte o última visita de seguimiento. Para los tumores que implicaban más de una categoría, el lugar dominante de enfermedad distante se clasificó por la categoría asociada con el peor pronóstico, con independencia del grado de implicación, en el
10 siguiente orden de gravedad creciente: tejidos blandos, huesos, vísceras. Debido a la naturaleza retrospectiva de este estudio, la determinación de las etapas se realizó utilizando la clasificación del American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control de 1997. La metástasis cerebral incluía lesiones parenquimales cerebrales radiológicamente confirmadas (tomografía computerizada o por resonancia magnética). No se realizó ninguna exploración para detectar lesiones cerebrales ocultas, por lo que todas las metástasis fueron sintomáticas o se detectaron accidentalmente. La información de seguimiento se extrajo de los historiales médicos y los registros tumorales. Los datos se recogieron y guardaron utilizando Microsoft Excel.

15 El tiempo de seguimiento medio fue de 68 meses (rango 7-144 meses) desde el diagnóstico inicial del cáncer de mama, 34 meses (rango 4-121 meses) desde la primera aparición de enfermedad metastásica y 29 meses (rango, 1-115 meses) desde el inicio de la terapia con trastuzumab. El tiempo medio desde el diagnóstico inicial hasta la primerarrecidiva distante fue de 22 meses (rango 0-103 meses) y el tiempo medio de terapia con trastuzumab fue de
20 10 meses (rango 1-115 meses).

Tabla 1. Características del sujeto

Característica	Categoría	Todos los sujetos (N=142)		Sin BM (N=93)		BM (N=49)	
		N	%	N	%	N	%
Estado menopáusico	postmenopáusico	78	55	52	56	26	53
	premenopáusico	64	45	41	44	23	47
Lugar metastásico dominante	vísceras	89	63	20	22	8	16
	tejido blando	28	20	20	22	4	8
	hueso	24	17	52	56	37	76
	desconocido	1	1	1	1	0	0
Tipo de metástasis	al diagnóstico recurrente	14	10	9	10	5	10
		18	18	84	90	44	90
ER	positivo	55	39	40	43	15	31
	negativo	87	61	53	57	34	69
PgR	positivo	43	30	29	31	14	29
	negativo	95	67	63	68	32	65
	desconocido	4	3	1	1	3	6
Grado	G3	85	60	49	53	36	73
	G1 + G2	57	40	44	47	13	27
Tipo de patología	ductal	127	89	84	90	43	88
	lobular	4	3	2	2	2	4
	otro	3	2	2	2	1	2
	desconocido	8	6	5	5	3	6
Proteína HER2 (HERmark H2T) ^a	positivo	109	77	62	67	47	96
	equivoco	7	5	7	8	0	0
	negativo	26	18	24	26	2	4
FISH/CEP 17	>2,0	117	82	73	78	44	90
	<2,0	21	15	18	19	3	6
	desconocido	4	3	2	2	2	4

Edad en la progresión (años)	media	53	54	50
	rango	25-79	25-79	33-72

Clasificación HER2+: El estado HER2-positivo se determinó utilizando inmunohistoquímica semicuantitativa (IHC) en las instituciones participantes en el estudio. La evaluación del número de copias del gen HER2 utilizando FISH se realizó centralmente en el Departamento de Biología y Genética de la Universidad de Medicina de Gdansk, Polonia. La amplificación del gen se definió como un ratio FISH (ratio HER2/sonda centromérica para el cromosoma 17 [CEP17]) mayor que 2,0. Los límites utilizados para categorizar a los sujetos como HER2 FISH positivo, HER2 FISH equivoco y HER2 FISH negativo fueron de 1,8 y 2,2, respectivamente. La expresión del receptor de estrógeno (ER) y del receptor de progesterona (PR) se determinó utilizando IHC, con un 10% de tinción nuclear considerado como resultado positivo.

Ensayos VeraTag®: Los niveles de proteína HER2 cuantitativos (unidades de fluorescencia relativa por mm de tumor (RF/mm tumor)) se midieron utilizando el ensayo HERmark® descrito por Lipton *et al.*, Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence *in situ* hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Cancer* 116:5168-78 (2010) y Larson, J.S. *et al.*, Analytical validation of a highly quantitative, sensitive, accurate, and reproducible assay (HERmark®) for the measurement of HER2 total protein and HER2 homodimers in FFPE breast cancer tumor specimens. *Patholog Res Int.* 2010:814176 (2010). Véase la Figura 1A. Los límites utilizados para categorizar a los sujetos como HER2 positivo, HER2 equivoco y HER2 negativo utilizando el ensayo HERmark® fueron de 10,5 y 17,8, respectivamente. Los niveles de proteína p95 cuantitativa (RF/mm²) se midieron utilizando el formato de ensayo VeraTag ilustrado en la Figura 1B, y tal y como se describe en Sperinde, J. *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 16(16): 4226-4235 (2010).

Determinación de la fase del tumor: Debido a la naturaleza retrospectiva de este estudio, la determinación de la fase del tumor se realizó utilizando la clasificación AJCC/UICC de 1997. Las lesiones metastásicas se agruparon en tres categorías: tejido blando, huesos y vísceras. Para los tumores que implicaban más de una categoría, el lugar dominante de enfermedad distante se clasificó por la categoría asociada con el peor pronóstico, con independencia del grado de implicación, en el siguiente orden de gravedad creciente: tejidos blandos, huesos, vísceras. No se realizó ninguna exploración para detectar lesiones cerebrales ocultas, por lo que todas las metástasis fueron sintomáticas o se detectaron accidentalmente.

Tiempo hasta la metástasis cerebral: El tiempo OS se calculó desde el inicio del tratamiento con trastuzumab hasta la muerte (por cualquier causa) o se interrumpió a la conclusión del seguimiento. Se utilizó el método de Kaplan-Meier para estimar la probabilidad de metástasis cerebral con el paso del tiempo. Los valores p se calcularon para el análisis de una única variable utilizando la prueba logran con estratificación cuando se indicó. Los modelos Cox se utilizaron para el análisis de múltiples variables, con estratificación cuando se indicó. Los modelos Cox se utilizaron asimismo para estimar el ratio de riesgo (HR) y su intervalo de confianza (CI). En los modelos Cox de múltiples variables y en el modelo Cox de una única variable que analizan esta variable concreta, el tiempo hasta la progresión no cerebral se utilizó como variable dependiente del tiempo para examinar el efecto de otros tipos de progresión sobre el riesgo de metástasis cerebral. Los análisis para controlar los distintos riesgos de muerte (sobre recidiva cerebral y recurrencia de la enfermedad en todos los demás lugares) se realizaron por el método de subdistribución de riesgos concurrentes descrito por Fine, J.P. y Gray, R.J., A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *JASA.* 94:496-509 (1999). Los valores p superiores a 0,05 se consideraron significativos. Los análisis estadísticos se especificaron previamente en la medida de lo posible en un plan de análisis estadístico y se realizaron de forma independiente por parte de equipos separados en Monogram Biosciences, Inc. (South Francisco, CA) e International Drug Development Institute (IDDI), Inc. (Louvain-la-Neuve, Belgium). Todas las discrepancias se resolvieron por el acuerdo entre el equipo clínico de Polonia y los equipos estadísticos de Monogram e IDDI.

Metástasis cerebral y niveles de HER2 elevados: En total, 49 de 142 pacientes (35%) desarrollaron recidiva cerebral sintomática. Entre estos 49 pacientes, el TTBM medio fue de 13 meses (95% de CI, 9-18 meses). Tras el comienzo del tratamiento con trastuzumab, la metástasis cerebral ocurrió en el momento de la primera progresión metastásica en 20 pacientes, incluyendo 17 pacientes que desarrollaron recidiva cerebral durante el tratamiento con trastuzumab. Los 29 pacientes restantes desarrollaron unarecidiva cerebral tras la interrupción del tratamiento con trastuzumab. El riesgo acumulado a un año, dos años y tres años de desarrollar unarecidiva cerebral fue del 19%, 30% y 46%, respectivamente (95% de CI, 12-25%, 22-39% y 34-58%, respectivamente). El tiempo medio desde la diseminación de la enfermedad hasta la recidiva cerebral fue de 38 meses (rango 1-50 meses). La supervivencia global media desde el diagnóstico inicial del cáncer de mama en la población total fue de 32 meses (rango 1-67 meses). El tiempo de OS medio desde el inicio de la terapia con trastuzumab en la población total fue de 32 meses (95% de CI, 28-43 meses), con OS medio de 28 meses (95% de CI, 16-32 meses) y 40 meses (95% de CI, 28-66 meses) en los subgrupos de pacientes que desarrollaron y no desarrollaron metástasis cerebral, respectivamente. Indicar la frase que se debe incluir.

La amplificación de HER2 se halló en 117 de los 138 casos analizables mediante FISH (85%). El nivel de proteína HER2 cuantitativo (H2T) determinado mediante ensayo VeraTag® demostró un 86% de concordancia ($\kappa = 0,55$) con el ratio HER2/CEP17 (considerando las categorías negativa, equivoca y positiva tanto para H2T como para FISH)

(véase la Figura 3; n=138). Por tanto, los dos ensayos clasificaron los tumores de forma similar por lo que respecta al estado de HER2.

EJEMPLO 2 Los niveles de HER2 se correlacionan con el TTBM

Se analizaron 12 correlaciones del TTBM para todos los sujetos y para aquellos sujetos considerados HER2-FISH positivos (Tablas 2 y 3, respectivamente), incluyendo (a) variables clínicas de uso común (edad, estado menopáusico, lugar dominante de la enfermedad metastásica, niveles de receptor de estrógeno [ER] y receptor de progesterona [PgR], grado del tumor, estado HER2 mediante medición HER2 FISH convencional); (b) tiempo hasta la progresión no cerebral; (c) la nueva medición del nivel de proteína HER2 continuo (H2T) considerado como una variable categórica utilizando un límite específico y también como una variable continua; y (d) la nueva medición del nivel de proteína p95 utilizando un límite predeterminado.

La medición de H2T superior (evaluada como una variable continua o una variable categórica utilizando límites definidos) mantenía una correlación significativa con un TTBM más corto en el conjunto de la población de pacientes HER-2 positivos (definido como HER2-positivo mediante IHC3+ o ratio FISH >2,0). Otras dos variables que mantenían una correlación similar con el TTBM son el grado del tumor y el tiempo desde el inicio de la terapia con trastuzumab hasta la primera progresión no cerebral. El ratio de riesgo (HR) entre grupos H2T positivos y H2T negativos anteriormente definidos (véase la notación de la Tabla 2) fue de 5,6 (p=0,007). Sin embargo, el grupo definido como H2T-negativo del grupo de estudio fue pequeño (n=26). El mejor valor del límite de discriminación de H2T hallado fue de 50 RF/mm², con HR = 2,6 (p=0,001). Cabe señalar que este valor estaba cercano a la media de H2T de 58 RF/mm². El H2T continuo también mantenía una correlación significativa con el TTBM (p=0,013), lo que indica un aumento proporcional del riesgo de metástasis cerebral en todo el rango de H2T. En contraste con esto, ni el límite de FISH/CEP17 = 2,0 ni el FISH/CEP17 mantenían correlación con el TTBM (p=0,28 y 0,15, respectivamente).

Como se ha señalado anteriormente, tanto H2T como el grado del tumor eran correlaciones de una única variable del TTBM. Para confirmar que H2T incidía en el TTBM con independencia del grado, los análisis se repitieron con el grado del tumor como factor de estratificación. Al estratificar el grado, el HR para H2T a un límite de 50 RF/mm seguía siendo significativo (HR=2,2; p=0,013), aunque la correlación de H2T continuo con el TTBM en el conjunto de la población era solo una tendencia (p=0,070).

Se realizó un análisis de los riesgos concurrentes para confirmar que la ocurrencia de la muerte no impedía la capacidad para medir de forma precisa la correlación de H2T con el TTBM. Controlando la muerte, H2T seguía manteniendo una correlación significativa del TTBM utilizando tanto el límite H2T = 50 RF/mm² (HR, 2,7; p = .0009) y un H2T continuo (HR, 2,7; p = .0066) con HR similares o ligeramente superiores a los calculados sin controlar la muerte (Tabla 2) (HR de 2,6 y 2,3, respectivamente). El H2T evaluado como una variable continua o como una variable categórica utilizando límites definidos no mantenía una correlación con OS en esta población de pacientes. Esta observación se puede deber al reducido tamaño del subgrupo HER2 negativo.

Los símbolos incluidos en las Tablas 2 y 3 que se recogen a continuación se refieren a lo siguiente:

- a. Prueba para determinar una diferencia significativa entre cualquiera de las tres categorías de vísceras, hueso y tejido blando.
- b. Tiempo hasta la progresión no cerebral empleado como una variable dependiente del tiempo para examinar el efecto de otras progresiones sobre el riesgo de metástasis cerebral.
- c. Los grados 1 y 2 se combinaron porque solamente había tres casos de grado 1.
- d. El estado HER2 positivo por VeraTag® se define como H2T > 17,8, y HER2 negativo por VeraTag® se define como H2T ≤ 10,5, con la categoría de equívoco entre estos dos límites. Anteriormente se descubrió que estos límites coinciden con el percentil 95 determinado por el laboratorio central de HER2-negativos y el percentil 5 de HER2-positivos. Véase Huang *et al.*, *Amer. J. Clin. Pathol.* 134:303-311 (2010).
- e. Número insuficiente de eventos para estimar el ratio de riesgo.

- Hubo cuatro casos con PgR desconocido, cuatro casos con FISH desconocido y siete casos en los que los puntos del FISH eran demasiado numerosos y agrupados para realizar un recuento fiable.

Variable	Categoría	Eventos/N (%)	No estratificado		Estratificado por grado	
			HR	valor p	HR	valor p
Edad	continuo	49/142 (35%)	0,99	0,6	0,99	0,7

ES 2 701 929 T3

Estado menopáusico (MP)	Post MP Pre MP	26/78 (33%) 23/64 (36%)	0,97	0,9	0,94	0,8
Lugar metastásico dominante	Múltiple ^a	49/141 (35%)	-	0,095 ^a	-	0,088 ^a
ER	positivo negativo	15/55 (27%) 34/87 (39%)	0,75	0,4	0,86	0,6
PgR	positivo negativo	14/43 (33%) 32/95 (34%)	1,1	0,7	1,3	0,4
Grado	G3 G1 + G2 ^C	36/85 (42%) 13/57 (23%)	2,4	0,007	-	-
Proteína HER2 (HERmark® H2T)	positivo ^d negativo ^d	47/109 (43%) 2/26 (8%)	5,6	0,007	4,4	0,029
FISH/CEP 17	>2,0 ≤2,0	44/117(38%) 3/21 (14%)	1,9	0,28	1,4	0,6
Log(H2T)	continuo	49/142 (35%)	2,3	0,013	1,9	0,070
Log(FISH/CEP17)	continuo	45/131 (34%)	1,7	0,25	1,4	0,5
Proteína HER2 (H2T)	H2T > 50 H2T ≤ 50	32/65 (49%) 17/77 (22%)	2,6	0,001	2,2	0,013
Proteína HER2 (H2T)	H2T > media (44) H2T ≤ media (44)	33/71 (46%) 16/71 (23%)	2,3	0,005	1,9	0,044
Tiempo hasta la progresión no	continuo	49/142 (35%)	2,5	0,006	2,4	0,010

Tabla 3. Análisis de una única variable del tiempo hasta la metástasis cerebral - HER2 FISH positivo

Variable	Categoría	Eventos/N (%)	No estratificado		Estratificado por grado	
			HR	valor p	HR	valor p
Edad	continuo	44/117(38%)	1,0	0,9	1,0	1,0
Estado menopáusico (MP)	Post MP Pre MP	23/63 (37%) 21/54 (39%)	0,94	0,8	0,93	0,8
Lugar metastásico dominante	Múltiple ^a	44/116(38%)	-	0,10 ^a	-	0,12 ^a
ER	positivo negativo	14/40 (35%) 30/77 (39%)	1,0	0,9	1,1	0,9
PgR	positivo negativo	13/35 (37%) 28/79 (35%)	1,4	0,4	1,5	0,22
Grado	G3 G1 + G2 ^C	33/73 (45%) 11/44 (25%)	2,2	0,022	-	-

Proteína HER2 (HERmark H2T)	positivo ^d negativo ^d	44/103 (43%) 0/11 (0%)	e	e	e	e
FISH/CEP 17	>2,0 ≤2,0	-	-	-	-	-
Log(H2T)	continuo	44/117(38%)	3,0	0,008	2,8	0,022
Log(FISH/CEP17)	continuo	42/110(38%)	1,4	0,6	1,2	0,7
Proteína HER2 (H2T)	H2T > 50 H2T ≤ 50	31/63 (49%) 13/54 (24%)	2,6	0,003	2,3	0,014
Proteína HER2 (H2T)	H2T ≥ media (58) H2T < media (58)	30/59 (51%) 14/58 (24%)	2,4	0,006	2,1	0,021
Proteína p95	p95 > 2,8 p95 ≤2,8	30/69 (43%) 14/48 (29%)	2,0	0,037	1,7	0,12
Tiempo hasta la progresión no cerebral ¹³	continuo	44/117(38%)	2,4	0,015	2,2	0,025

EJEMPLO 3 Los niveles de H2T y p95 están correlacionados con el TTBM en una población FISH positiva

5 A fin de evitar datos sesgados debido a falsos HER2 positivos mediante IHC, se realizó un análisis paralelo en un subconjunto de 117 sujetos cuyo estado HER2 FISH-positivo se determinó a nivel central (Tabla 3). En este grupo, H2T (valorado como una variable continua y utilizando límites definidos, con o sin estratificación por grado del tumor) mantenía una correlación significativa con el TTBM, mientras que la variable continua FISH/CEP17 no mantenía tal correlación ($p \geq 0,6$). Dentro de la población HER2 FISH-positiva, los pacientes con tumores en los que se determinaron unos niveles de proteína HER2 superiores a la media (H2T=58 RF/mm²) tenían más del doble de probabilidades de desarrollar metástasis cerebrales que aquellos con un nivel de proteína HER2 por debajo de la media sin (HR, 2,4; $p=0,006$) y con (HR, 2,1; $p=0,021$) estratificación de grado (véase la Figura 4A). Una diferencia ligeramente mayor se observó para el valor del límite de 50 RF/mm² sin (HR=2,6; $p=0,003$) y con (HR=2,3; $p=0,014$) estratificación de grado (véase la Figura 4B). En contraste, los pacientes cuyos tumores se determinó que presentaban una amplificación del gen HER2 superior o inferior a la media (HER2/CEP17 = 6.9) tenían una probabilidad similar de desarrollar metástasis cerebral sin (HR=1,3; $p=0,4$) y con (HR=1,3; $p=0,5$) estratificación de grado (véase la Figura 4C). También se observaron resultados similares con otros límites de FISH HER2/CEP17 (datos no mostrados).

Anteriormente se había demostrado que unos niveles elevados de expresión de p95 mantienen correlación con unos malos resultados en el cáncer de mama tratado con trastuzumab. Sperinde, J. *et al.*, *Clin. Cancer. Res.* 16(16): 4226-4235 (2010). Sperinde *et al.* utilizó un límite de p95 de 2,8 RF/mm² para un formato de ensayo VeraTag® como el que se muestra en la Figura 1B para estratificar sujetos en grupos con una expresión elevada de p95 y una expresión baja de p95. En la cohorte actual, se concluyó que la expresión de p95 por encima del límite de p95 de 2,8 RF/mm mantiene una correlación con un menor tiempo hasta la metástasis cerebral (Tabla 3 y Figura 4D). También se averiguó que el límite de 2,8 RF/mm es el límite óptimo para diferenciar un riesgo alto y un riesgo bajo de metástasis cerebral en este conjunto. Dentro de la población HER2 FISH-positiva, los pacientes con tumores en los que se determinaron unos niveles de proteína p95 superiores al límite (p95=2,8 RF/mm²) tenían más del doble de probabilidades de desarrollar metástasis cerebrales que aquellos con un nivel de proteína p95 por debajo del límite sin (HR, 2,0; $p=0,037$) y con (HR, 1,7; $p=0,12$) estratificación de grado (véase la Figura 4D). Este análisis se había realizado con anterioridad en este mismo conjunto de muestras de sujetos, antes de que se pudiese realizar la macrodissección para eliminar contaminantes no tumorales, y la correlación con el tiempo hasta la metástasis cerebral resultó coherente. Véase la Solicitud provisional USA n.º 61/488 028, Figura 2D.

A fin de determinar si el límite de H2T y el límite de p95 son variables independientes, el subconjunto de pacientes en los que se determinó un estado HER2 FISH-positivo y una expresión de H2T inferior al límite de 50 RF/mm se sometió también a una evaluación basada en los niveles de expresión de p95. Tal y como se muestra en la Figura 4E, los sujetos con unos niveles de p95 inferiores al límite de p95 tenían un TTBM más prolongado que aquellos con unos niveles de p95 superiores al límite de p95 (HR=2,5, $p=0,10$). Por tanto, el uso de p95 como variable permitió la identificación de pacientes adicionales con riesgo de metástasis cerebral en comparación con la medición de H2T solamente. Es probable que el reducido número de pacientes sometidos a evaluación haya afectado negativamente al valor p.

Se realizó un análisis de los riesgos concurrentes para confirmar que la ocurrencia de la muerte no impedía la capacidad para medir de forma precisa la correlación de H2T con el TTBM.

Controlando la muerte, H2T seguía manteniendo una correlación significativa del TTBM utilizando tanto el límite H2T = 50 RF/mm² (HR, 2,7; p = .0,0009) como un H2T continuo (HR, 2,7; p = 0.0066) con HR similares o ligeramente superiores a los calculados sin controlar la muerte (Tabla 2: HR=2,6 y HR=2,3, respectivamente). Adicionalmente, también se averiguó que el límite de p95 mantiene una correlación con el TTBM cuando se controla la muerte (HR=1,7, p=0,089).

EJEMPLO 4 Efecto del grado del tumor sobre la correlación de H2T con el tiempo hasta la metástasis cerebral

Dado que se averiguó que el grado del tumor mantiene una correlación significativa con el TTBM en el análisis de una única variable y que tenía ciertos efectos sobre los CI del HR para H2T cuando se utilizaba como factor de estratificación, examinamos por separado la correlación de H2T con el TTBM en subconjuntos de pacientes con tumores de grado 1-2 y 3. En la Figura 5A se muestra un gráfico de Forest con los ratios de riesgo para el límite de H2T=50 RF/mm² para cada uno de los subgrupos de grados. La correlación entre H2T y TTBM era más sólida en el subconjunto del grado 1-2, lo que es coherente con la interacción entre H2T y el grado del tumor (p=0,025). Los gráficos de Kaplan-Meier para los cuatro subgrupos definidos por el límite de H2T=50 RF/mm² y las dos categorías de grados se muestran en la Figura 5B. El TTBM para los cuatro subgrupos definidos por el límite de H2T de 50 RF/mm² y las dos categorías de grados (grados 1 y 2 combinados frente a grado 3) mostró resultados similares en tres de los grupos (H2T bajo-grado 3, H2T alto-grado 1-2, H2T alto-grado 3) en comparación con el otro subconjunto de H2T bajo-grado 1-2, que tenían unas probabilidades significativamente menores de desarrollar metástasis cerebral (prueba logrank p = 0,0012 para la comparación de los cuatro subgrupos; HR = 5,7; p = 0001 para [H2T>50 RF/mm² o grado 3] frente a [H2T< 50 RF/mm² y grado < 3]). Un modelo de Cox de una única variable estimó un HR de 0,17 para los pacientes de H2T bajo-grado 1-2, en comparación con los pacientes de los otros tres grupos (p = 0,0001). A pesar de que la comparación mediante prueba logrank de los cuatro subgrupos (con tres grados de libertad) también fue significativa (p=0,0012), este resultado se debería interpretar con precaución dadas las múltiples comparaciones posibles entre estos cuatro subconjuntos.

Para examinar si se trataba de un fenómeno general en el conjunto del rango de H2T, se realizó un análisis similar para examinar la correlación de la variable H2T continua con el TTBM dentro de los dos subgrupos de los grados 1+2 o el grado 3. Como se muestra en la Figura 6A, no se observó ninguna diferencia estadística en la correlación entre la variable H2T continua y el TTBM para los grupos de los diferentes grados (valor p de interacción = 0,6). Sin embargo, tal y como se muestra en la Figura 6B, se observó una tendencia hacia una correlación más fuerte entre la variable H2T continua y el TTBM en el subgrupo de pacientes de grado 1-2 que en el subgrupo de pacientes de grado 3 del subconjunto de pacientes confirmados centralmente como HER2-positivos mediante FISH (p de interacción = 0,10).

EJEMPLO 5 El impacto de la progresión distinta de la metástasis cerebral

Ya se ha demostrado con anterioridad que un tiempo más reducido hasta cualquier recidiva distante en los pacientes con cáncer de mama avanzado HER2-positivo estaba asociado con un mayor riesgo de desarrollar metástasis cerebral. De forma similar, utilizando los métodos de la presente invención, se averiguó que la progresión tratada como variable dependiente del tiempo mantiene una correlación significativa con el TTBM en un análisis de una única variable (Tablas 2 y 3). Para examinar también la correlación entre otros lugares de progresión/metástasis y el TTBM, se sometieron a ensayo modelos de múltiples variables para determinar la correlación independiente del TTBM con H2T, FISH/CEP17, receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PgR), grado del tumor y progresión distinta de metástasis cerebral como variable dependiente del tiempo. Los modelos de múltiples variables se ajustaron con el TTBM como resultado, H2T y el ratio *HER-2/CEP17* como variables de partida, y la progresión distinta de la metástasis cerebral como variable dependiente del tiempo. Los modelos se estratificaron por grado del tumor y estado de ER y PgR. H2T y FISH/CEP 17 se sometieron a ensayo como variables continuas en lugar de utilizando límites definidos para evitar un potencial sobreajuste asociado con límites concretos.

H2T y FISH se evaluaron también mediante análisis de múltiples variables y, como se muestra en la Tabla 4, se observó una vez más que el tiempo hasta la progresión no cerebral mantiene una correlación significativa con el TTBM cuando se controlan otras variables indicadas. En el subconjunto de pacientes HER2 FISH-positivos, se observó que un nivel de H2T continuo (HR = 3,3; p = 0,024) y el tiempo hasta la progresión no cerebral (HR = 2,9; p = 0,0056) mantienen una correlación independiente con el TTBM, mientras que esto no ocurre con HER2/CEP17. Con la estratificación de grados se obtuvieron unos resultados similares.

Variable	Todos los sujetos		HER2+ por FISH	
	HR	valor p	HR	valor p
Log(H2T)	2,3	0,071	3,3	0,024

Log(FISH/CEP17)	0,61	0,46	0,45	0,32
Tiempo hasta la progresión no cerebral ^a	3,0	0,0035	2,9	0,0056

5 H2T y otras variables clínicas recogidas en las Tablas 2 y 3 también se evaluaron mediante análisis de múltiples variables. H2T y FISH/CEP 17 se sometieron a ensayo como variables continuas en lugar de utilizando límites definidos para evitar sesgos asociados con límites concretos. Como se muestra en las Tablas 5 y 6, se observó una vez más una fuerte correlación entre el tiempo hasta la progresión no cerebral con el TTBM, cuando se controlaron otros factores. En el subconjunto HER2 FISH-positivo, se observó que la variable H2T continua (HR=3,2; p=0,021) y el tiempo hasta la progresión no cerebral (HR=3,0; p=0,0044) mantienen una correlación independiente con el TTBM. Con la estratificación de grados se obtuvieron unos resultados similares

Tabla 5. Análisis de múltiples variables del tiempo hasta la metástasis cerebral - Todos los sujetos

Variable	No estratificado		Estratificado por grado	
	HR	valor p	HR	valor p
ER	0,60	0,25	0,62	0,28
PgR	1,7	0,24	1,6	0,28
Grado	1,7	0,14	—	—
Log(H2T)	2,3	0,068	2,3	0,071
Log(FISH/CEP17)	0,75	0,67	0,75	0,65
Tiempo hasta la progresión no cerebral ^a	3,2	0,0019	3,2	0,0019

Tabla 6. Análisis de múltiples variables del tiempo hasta la metástasis cerebral - HER2 FISH positivo

Variable	No estratificado		Estratificado por grado	
	HR	valor p	HR	valor p
ER	0,7	0,44	0,74	0,51
PgR	1,7	0,25	1,6	0,28
Grado	1,7	0,17	—	—
Log(H2T)	3,2	0,021	3,3	0,021
Log(FISH/CEP17)	0,64	0,56	0,64	0,56
Tiempo hasta la progresión no cerebral ^a	3,0	0,0044	3,0	0,0042

10 **EJEMPLO 6 Nivel de proteína HER2 de acuerdo con el lugar metastásico dominante**

Después de observar que H2T mantenía una correlación con el TTBM, se realizó un nuevo análisis para determinar si la aparición de metástasis en otros lugares también mantenía una correlación con H2T. El seguimiento de lugar específico detallado no estaba disponible para otros lugares metastásicos, aunque el lugar dominante de la metástasis se conocía en 141 de los 142 pacientes. Tal y como se muestra en la Figura 7, las distribuciones de mediciones de H2T no fueron estadísticamente diferentes en base a el lugar metastásico dominante (tejido blando, hueso y víscera extracraneal) (p=0,9). Por otra parte, no se observó ninguna correlación entre el lugar metastásico dominante y el TTBM (p=0,1).

15

REIVINDICACIONES

1. Un método (i) para identificar sujetos con cáncer HER2-positivo que deben ser objeto de cribado respecto a metástasis cerebral; (ii) para identificar pacientes con cáncer HER2-positivo que deben recibir tratamiento con un agente que actúe sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer; (iii) para determinar el tiempo previsto hasta la aparición de metástasis cerebral (TTBM) en un sujeto con cáncer HER2-positivo; (iv) para determinar la probabilidad relativa de que un sujeto con un cáncer HER2-positivo tenga riesgo de desarrollar metástasis cerebral; y/o (v) para determinar si un sujeto con cáncer HER2-positivo forma parte de un subconjunto de sujetos con cáncer HER2-positivo que deben ser cribados respecto a metástasis cerebral, comprendiendo:
- 5 (a) proporcionar una muestra biológica de un tumor obtenido del cáncer del sujeto;
- 10 (b) medir la cantidad de HER2 en la muestra biológica;
- (c) determinar si la cantidad de proteína HER2 en la muestra del sujeto supera un límite de HER2, donde el límite ha sido determinado en base a la medición de la cantidad de proteína HER2 en muestras biológicas de una población de sujetos, y el límite divide a las muestras de la población de sujetos en dos subgrupos de pacientes distintos; y
- 15 (d) (i) indicar que el sujeto debe ser examinado respecto a metástasis cerebral si la cantidad de proteína HER2 supera el límite de HER2;
- (ii) indicar que el sujeto debe recibir tratamiento con un agente que actúe sobre HER2 y una segunda forma de tratamiento para el cáncer, si la cantidad de proteína HER2 supera el límite de HER2;
- (iii) señalar el TTMB previsto del sujeto basado en la incidencia de metástasis cerebral a lo largo del tiempo, en una población de referencia con niveles de proteína HER2 por encima o por debajo del límite de HER2;
- 20 (iv) indicar que, si la cantidad de proteína HER2 de la muestra biológica supera el límite de HER2, es más probable que el sujeto tenga riesgo de desarrollar metástasis cerebral; y/o
- (v) indicar que el sujeto debe ser examinado respecto a metástasis cerebral si la cantidad de proteína HER2 supera el límite de HER2.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, donde el cáncer del sujeto ha sido caracterizado como HER2-positivo en base a los elevados niveles de la expresión del gen HER2, el nivel de la proteína HER2, o la amplificación del gen HER2.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el cáncer del sujeto comprende cáncer de mama, de preferencia cáncer de mama primario.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el sujeto ha sido sometido a tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 que no cruza la barrera hematoencefálica.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, donde el agente que actúa sobre HER2 es un anticuerpo monoclonal, preferiblemente donde el anticuerpo monoclonal es trastuzumab.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el límite de HER2 comprende por lo menos uno de:
- (i) una cantidad mediana de HER2 determinada en una población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo, o
- 35 (ii) una cantidad optimizada de HER2, determinada en una población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo además medir la cantidad de proteína p95 en la muestra biológica; y determinar si la cantidad supera el límite de p95.
8. El método de la reivindicación 7, donde el límite de p95 comprende por lo menos uno de:
- 40 i) una cantidad media de p95 determinada en una población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo; o
- ii) una cantidad optimizada de p95 determinada en una población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo.
9. El método de las reivindicaciones 6 o 8, donde la población de referencia de sujetos con cáncer de mama HER2-positivo ha sido sometida a tratamiento con un agente que actúa sobre HER2 que no cruza la barrera hematoencefálica.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, parte (ii), donde la segunda forma de tratamiento para el cáncer comprende un fármaco de molécula pequeña dirigido a HER2, quimioterapia y/o radioterapia.
11. El método de la reivindicación 1, parte (iii), o las reivindicaciones 2 a 9, si depende de la reivindicación 1, parte (iii), donde si la cantidad de HER2 en la muestra biológica supera el límite de HER2 la probabilidad del sujeto de estar libre de metástasis cerebral es de aproximadamente el 73 % a aproximadamente 1 año, aproximadamente del 61 % a aproximadamente 2 años, y de aproximadamente el 37 % a aproximadamente 3 años; o donde si la cantidad de HER2 en la muestra biológica es inferior al límite de HER2, la probabilidad del sujeto de estar libre de metástasis
- 50

cerebral es de aproximadamente el 89 % a aproximadamente 1 año, de aproximadamente el 78 % a aproximadamente 2 años, y de aproximadamente el 69 % a aproximadamente 3 años.

5 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, si depende de la reivindicación 1, parte (iii), donde si la cantidad de HER2 en la muestra biológica es inferior al límite de HER2, y la cantidad de p95 es superior al límite de p95, la probabilidad del sujeto de estar libre de metástasis cerebral es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente 1 año, de aproximadamente el 66 % a aproximadamente 2 años, y de aproximadamente el 50 % a aproximadamente 3 años; o donde si la cantidad de HER2 en la muestra biológica es inferior al límite de HER2, y la cantidad de p95 es inferior al límite de p95, la probabilidad del sujeto de estar libre de metástasis cerebral es de aproximadamente el 94 % a aproximadamente 1 año, de aproximadamente el 86 % a aproximadamente 2 años, y de aproximadamente el 80 % a aproximadamente 3 años.

10 13. El método de la reivindicación 1, parte (iii) o las reivindicaciones 2 a 9, si depende de la reivindicación 1, parte (iii), donde el sujeto tiene un riesgo 2,6 veces mayor de metástasis cerebral si la cantidad de HER2 en la muestra biológica es superior al límite de HER2, comparado con cuando la cantidad es inferior al límite de HER2.

15 14. El método de la reivindicación 1, parte (iii) o las reivindicaciones 2 a 9, si depende de la reivindicación 1, parte (iii), donde el sujeto tiene aproximadamente un riesgo 5,7 veces menor de metástasis cerebral si el cáncer del sujeto es de Grado 1 o 2 y la cantidad de HER2 en la muestra biológica es inferior al límite de HER2, comparado con cuando el cáncer del sujeto es de Grado 3, o si el cáncer del sujeto es de Grado 1 o 2, y la cantidad del HER2 en la muestra biológica es superior al límite de HER2.

20

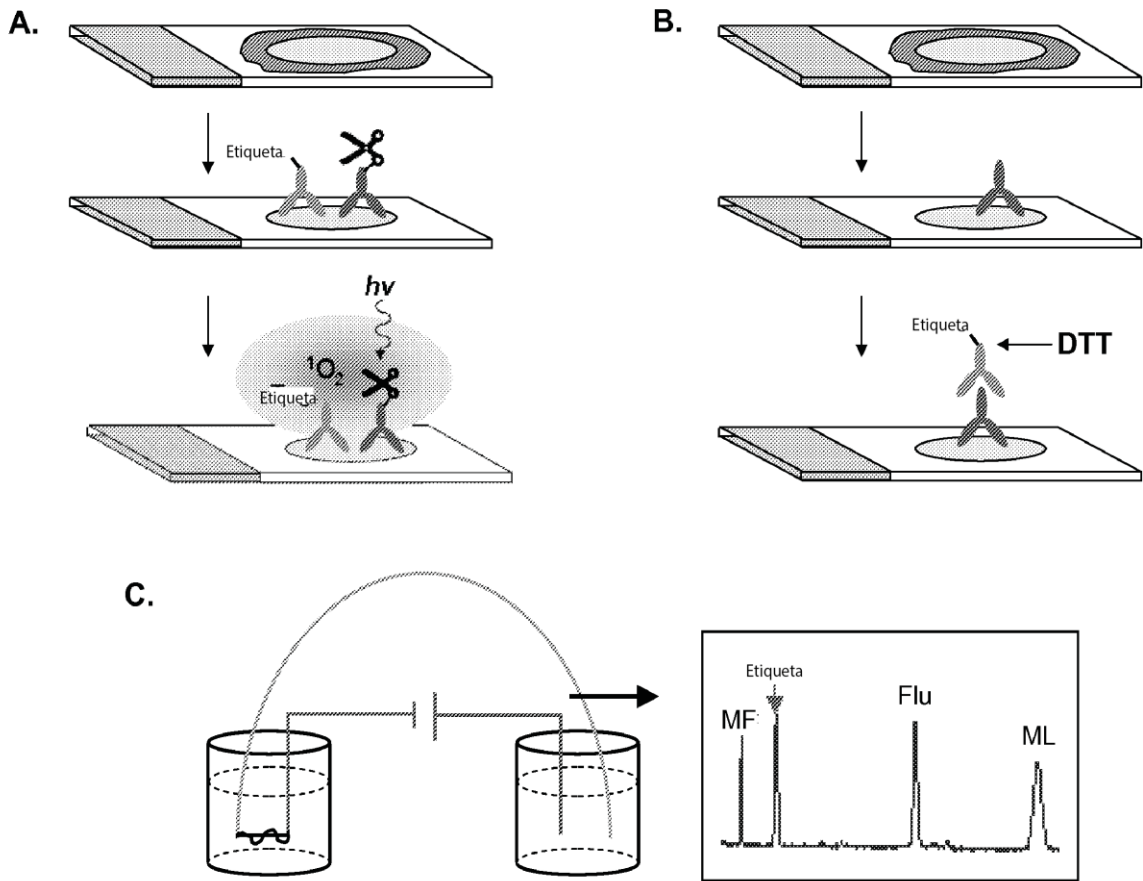
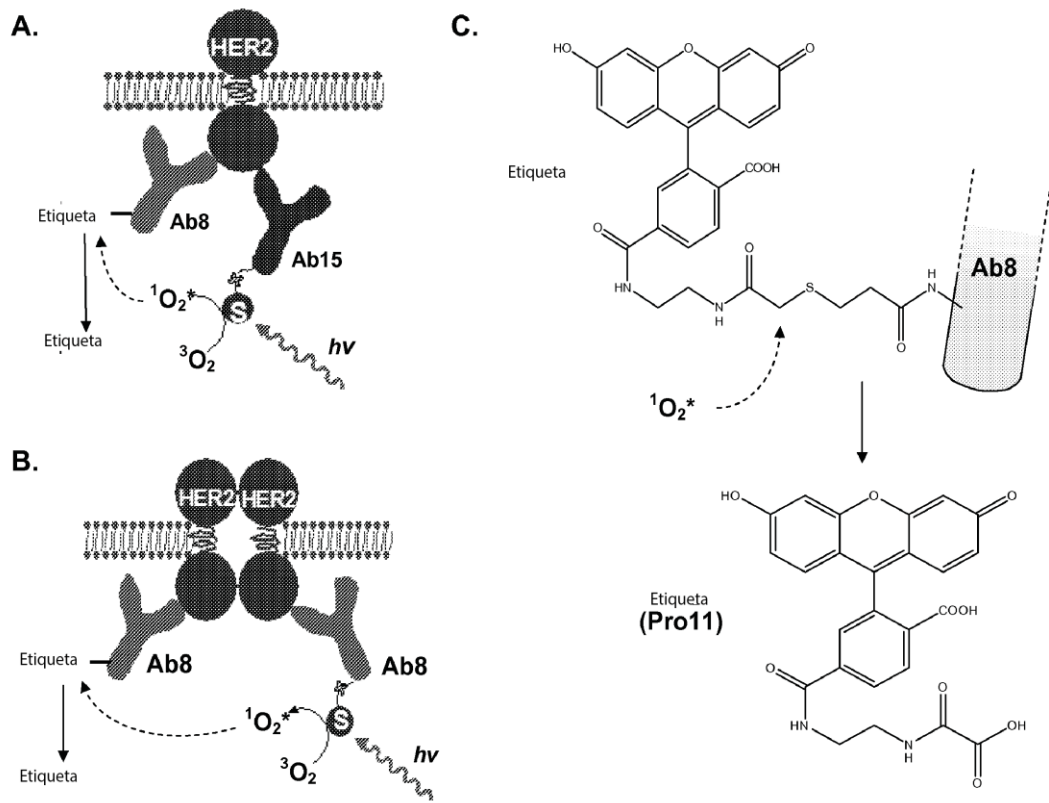


FIG 1



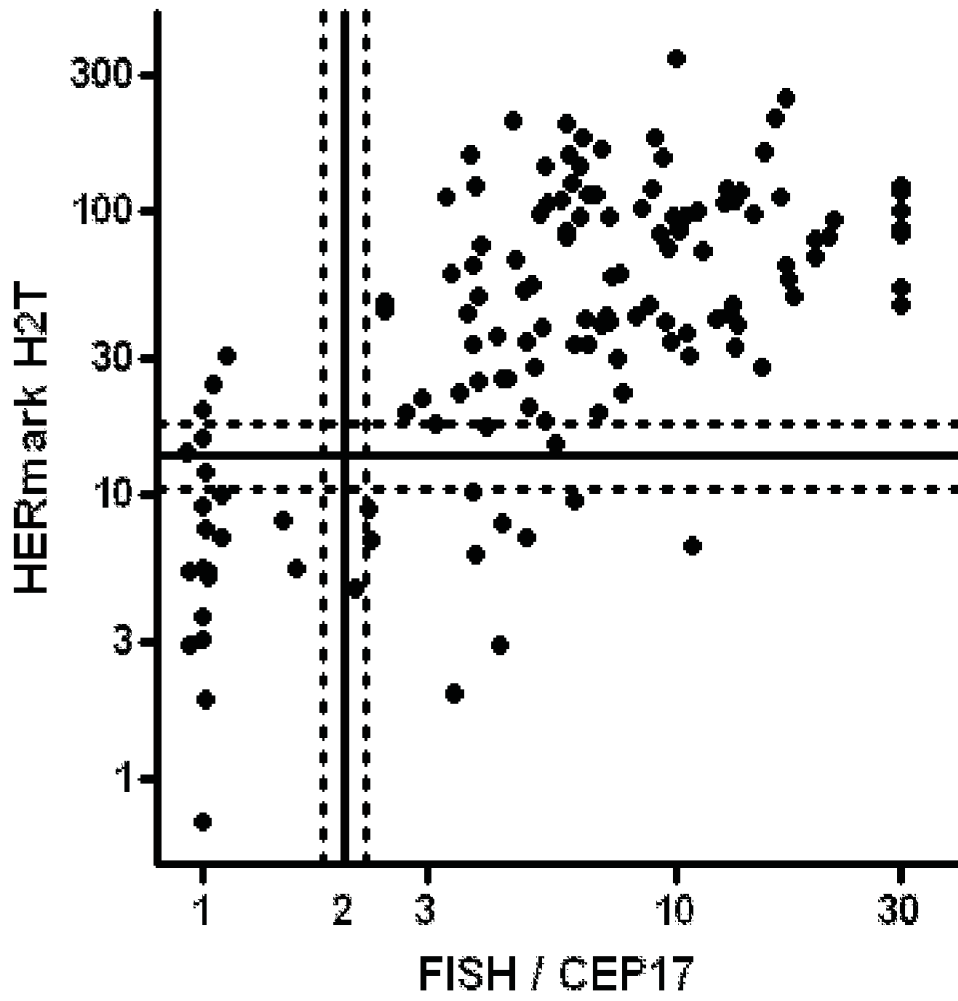


FIG 3

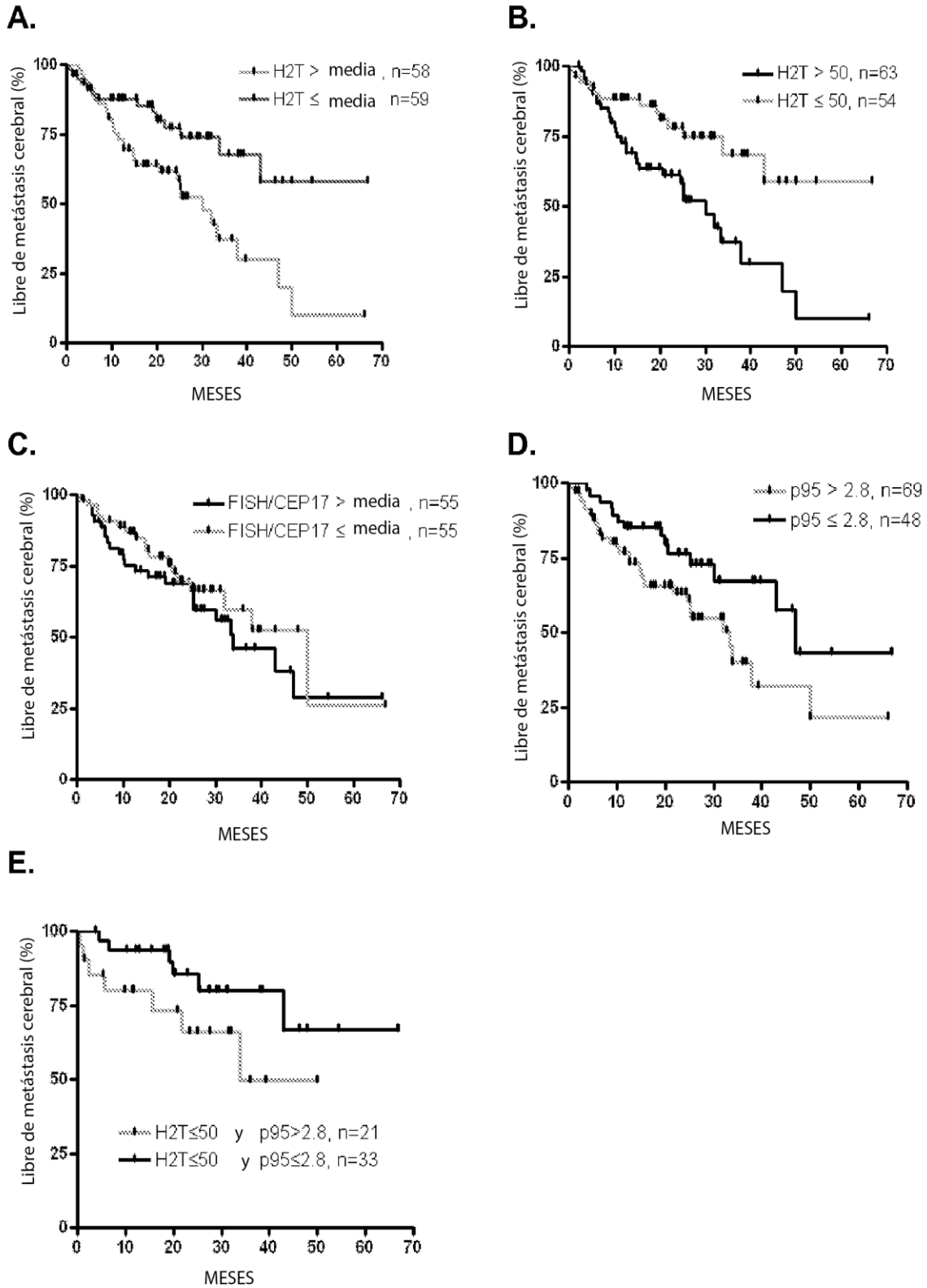
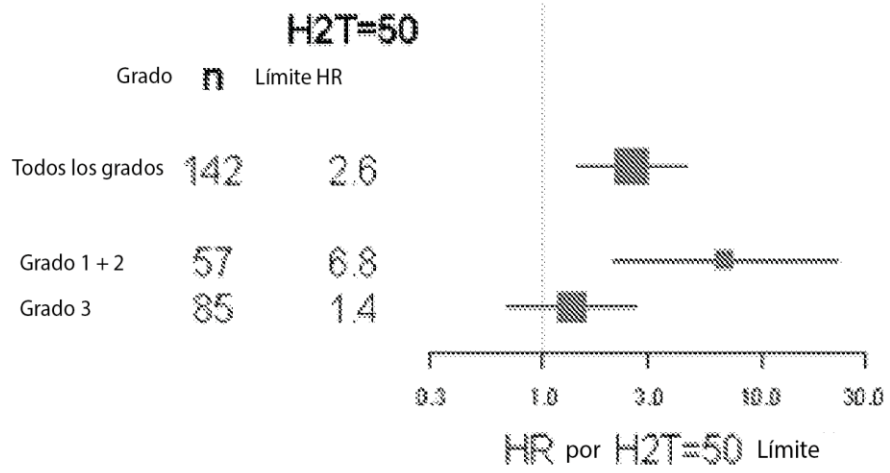


FIG 4

A.



B.

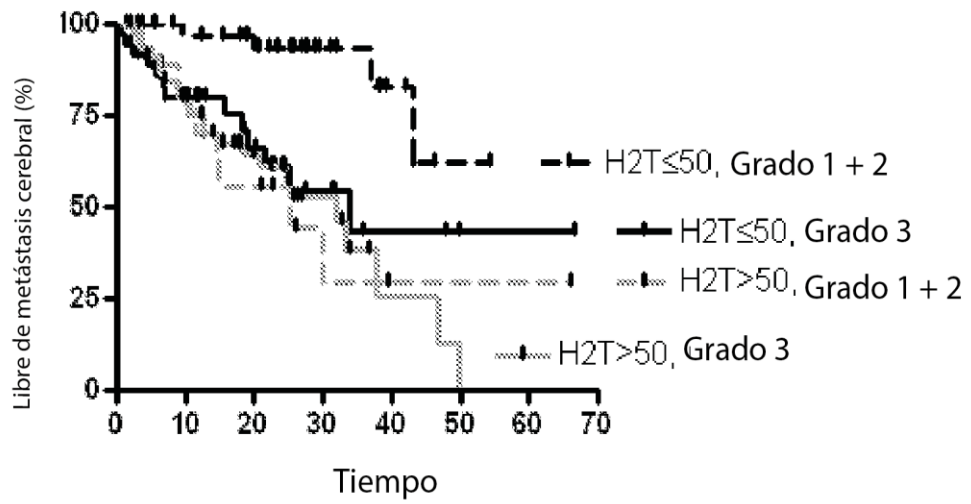
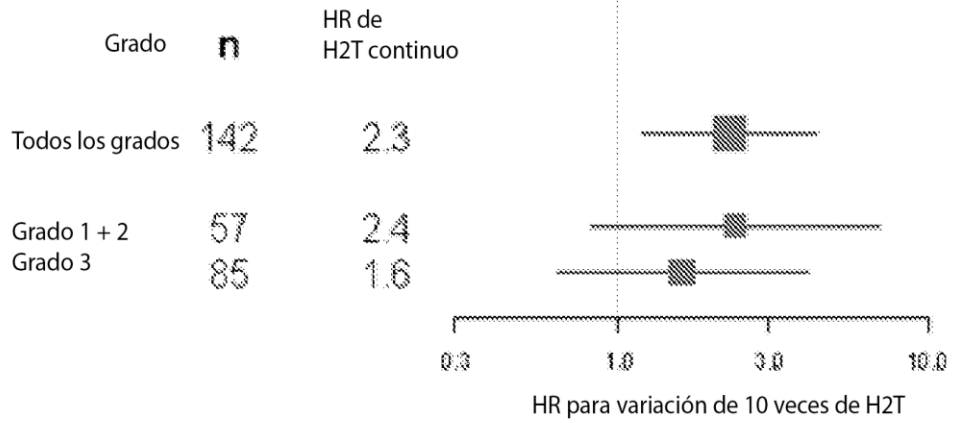


FIG 5

A.



B.

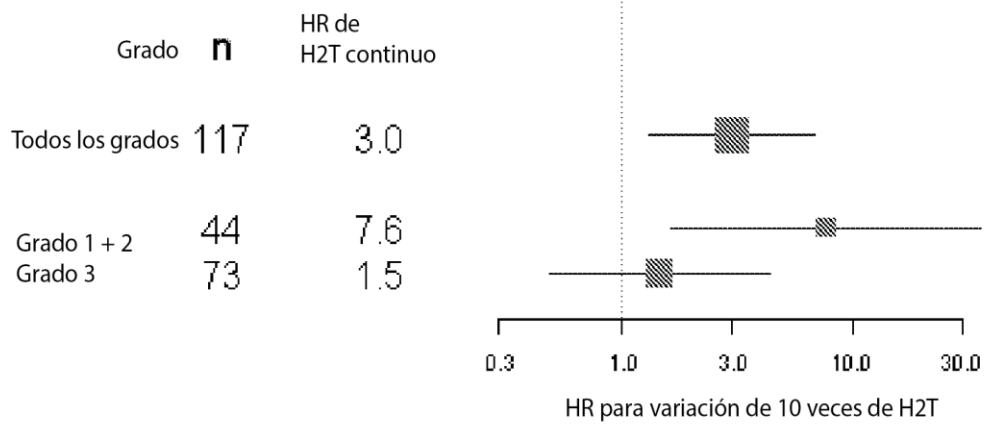


FIG 6

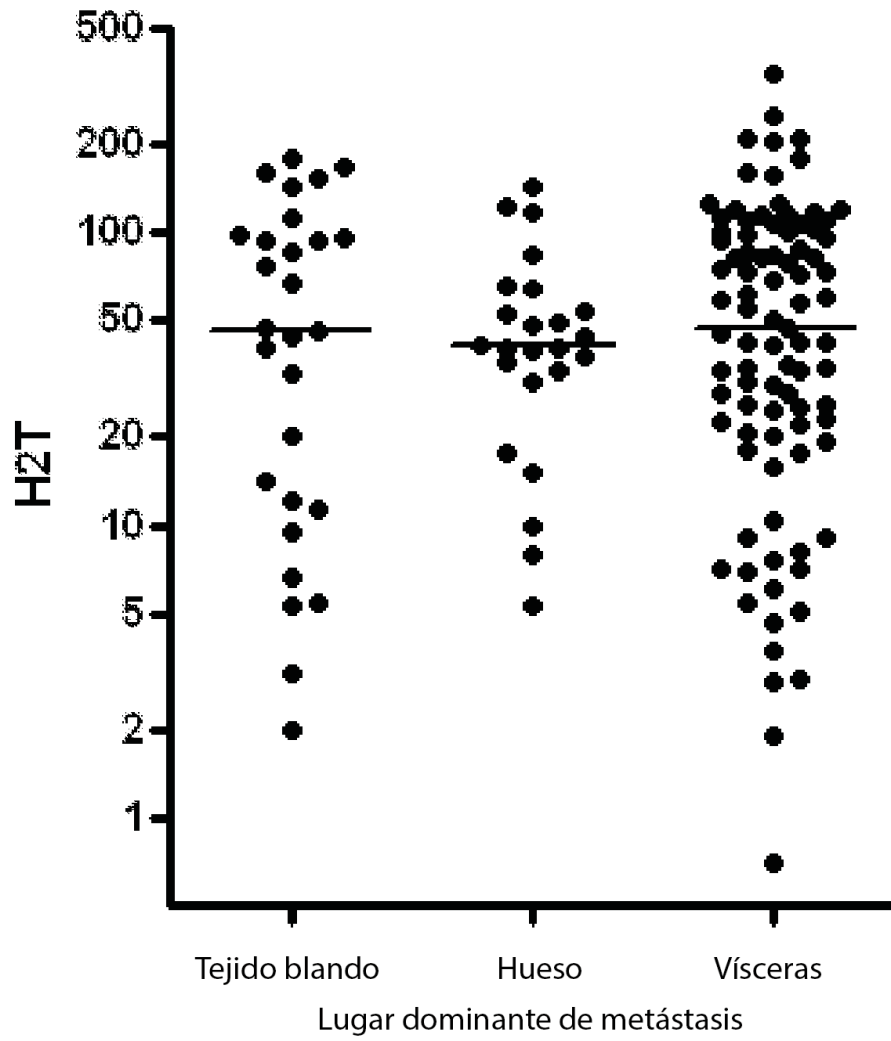


FIG 7