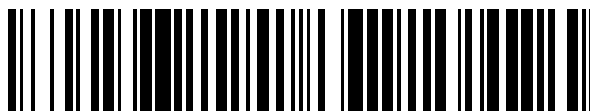


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 638**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2014 PCT/EP2014/071663**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015 WO15052287**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2014 E 14784425 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3063291**

54 Título: **Ensayos múltiple de tinción conjunta de receptores de HER2 y de estrógenos para detectar heterogeneidad tumoral**

30 Prioridad:

11.10.2013 US 201361889862 P

24.02.2014 US 201461943937 P

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

05.11.2019

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (50.0%)

1910 E. Innovation Park Drive

Tucson, AZ 85755, US y

NIHON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE

(50.0%)

72 Inventor/es:

NITTA, HIRO;

KELLY, BRIAN D.;

DENNIS, ESLIE y

MASUDA, SHINOBU

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 729 638 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

Ensayos múltiple de tinción conjunta de receptores de HER2 y de estrógenos para detectar heterogeneidad tumoral

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere a la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ*, particularmente a la detección de proteína HER2, ácido nucleico de HER2 y proteína receptora de estrógenos en una muestra individual.

10 **Antecedentes**

El cáncer de mama representa aproximadamente el 23% de todos los cánceres en todo el mundo y es responsable de cientos de miles de muertes cada año. Los cánceres de mama varían en su respuesta a diferentes tratamientos y es importante seleccionar un régimen de tratamiento adecuado para cada paciente. El estado del receptor es un sistema de clasificación común que se usa para seleccionar tratamientos para un paciente con cáncer de mama. Los tumores de mama pueden ser positivos o negativos para la proteína receptora de estrógenos (ER), la proteína HER2 (también conocida como ErbB2) y/o la proteína receptora de progesterona (PR). Los tumores de mama también se examinan de manera rutinaria para determinar la amplificación del gen HER2, como otra medida de si el tumor es positivo o negativo para HER2. Algunos tumores de mama son negativos para los tres marcadores y se denominan tumores “triple negativos”.

La selección de la terapia se basa en si el tumor es positivo para ER, positivo para HER2 o es triple negativo. Los tumores positivos para ER y/o PR se tratan normalmente con terapia de bloqueo hormonal (tal como tamoxifeno), mientras que los tumores positivos para HER2 se tratan con agentes terapéuticos dirigidos contra HER2 tales como trastuzumab o lapatinib. Un subconjunto de tumores positivos para HER2 también son positivos para ER. Algunos de tales tumores pueden responder favorablemente a una combinación de terapias antiestrogénicas y anti-HER2 (por ejemplo, Rimawi *et al.*, J. Clin. Oncol. 14: 1726-1731, 2013; Montemurro *et al.*, Ann. Oncol. doi: 10.1093/annonc/mdt287, 2013; Vaz-Luis *et al.*, Ann. Oncol. 24: 283-291, 2013).

Aunque estos métodos de clasificación del cáncer de mama y el tratamiento dirigido han mejorado los desenlaces de los pacientes, muchos tumores positivos para HER2 no responden a, o adquieren resistencia a, las terapias dirigidas a HER2. Esto puede deberse en parte a la discordancia entre la expresión de la proteína HER2 y la amplificación del gen HER2 y el posible papel de la heterogeneidad tumoral (por ejemplo, Nitta *et al.*, Diagn. Pathol. 7:60 2012) (véase la figura 12). Por ejemplo, aunque un tumor puede comprender células positivas para HER2/positivas para ER, el tumor también puede comprender otros tipos de células tales como células negativas para la proteína HER2/negativas para la proteína ER/positivas para el gen HER2 o negativas para la proteína HER2/positivas para la proteína ER/positivas para el gen HER2, y esas células pueden responder de manera diferente a diversos tratamientos (la figura 13 muestra una muestra de tumor con tres poblaciones de tipos de células diferentes). Por tanto, aunque un tratamiento particular puede ser el mejor para las células positivas para HER2/positivas para ER, pueden ser necesarios otros tratamientos para abordar los otros tipos de células. Sin saber que otros tipos de células están presentes en el tumor, esos otros tratamientos no deben administrarse necesariamente al paciente.

Los métodos de examen de HER2/ER actuales implican ensayos con marcadores individuales o duales. Por ejemplo, en una sección de tejido de una muestra de tumor se somete a prueba la proteína HER2 y/o la proteína ER. Dependiendo de los resultados, puede analizarse otra sección de tejido de la muestra de tumor para determinar el número de copias del gen HER2. La naturaleza independiente de estos ensayos no permite la tinción conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2. Como tal, no sería posible determinar el grado de heterogeneidad tumoral. Por ejemplo, no sería posible detectar células individuales que fuesen negativas para la proteína HER2/positivas para el gen HER2 entre una población de células que fuese positivas para la proteína HER2 sin la tinción conjunta de los marcadores en el mismo portaobjetos. La multiplexación, o tinción conjunta, de múltiples marcadores en el mismo portaobjetos, haría posible identificar aquellas células dentro de la población de células en la muestra que expresan de manera diferencial múltiples marcadores. Tal información sobre el grado de heterogeneidad tumoral puede ser valiosa, ya que puede ayudar a un médico a determinar una terapia adecuada para un paciente.

A pesar del atractivo de un ensayo múltiple para la tinción de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2, los trabajadores de este campo creían que no era posible realizar tal ensayo y lograr señales claras similares a las que se verían con una sola tinción. Uno de los motivos es que los trabajadores en este campo creen que las condiciones de ensayo para detectar los diversos marcadores son incompatibles entre sí. Por ejemplo, se pensaba que el procedimiento de acondicionamiento celular que se usa para pretratar las células antes de los componentes de ISH de ADN del cromosoma 17 y ADN de HER2 es incompatible con el ensayo de ICH de proteína HER2 y proteína ER. Particularmente, las etapas de acondicionamiento celular usadas por un sistema de tinción automatizado para la detección de ácidos nucleicos tienden a disminuir la capacidad para detectar proteínas en la muestra. Sin querer restringirse a una teoría particular, se creía que las proteasas usadas en las etapas de pretratamiento de ácidos nucleicos digerirían las mismas proteínas que van a detectarse en un ensayo de proteínas. Además, las etapas de acondicionamiento celular usadas para la detección automatizada de proteínas no permitirían suficientemente la

detección de genes.

En un ensayo múltiple para la tinción conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2, se cree que es comercialmente ventajoso poder usar el mismo anticuerpo de animal (por ejemplo, anticuerpo de conejo) para la proteína HER2 y la proteína ER. Sin embargo, los trabajadores en el campo creían que no sería posible realizar un ensayo múltiple usando el mismo anticuerpo de animal (por ejemplo, anticuerpo de conejo) tanto para la proteína HER2 como para la proteína ER debido a que el uso de un anticuerpo específico para HER2 junto con un anticuerpo específico para ER daría lugar a cantidades significativas de fondo, y excluiría de ese modo la capacidad para detectar las proteínas de manera apropiada.

El documento US 2009/203015 A1 se refiere a composiciones y métodos para detectar simultáneamente los niveles de expresión de ARNm de receptores hormonales, particularmente el receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR), opcionalmente en combinación con receptores de factores de crecimiento, particularmente el receptor del factor de crecimiento epidérmico ERBB2 (Her-2). Pueden usarse para determinar el estado del receptor hormonal y/o del receptor de factor de crecimiento, particularmente el estado de ER y PR y, opcionalmente, también el estado de ERBB2, tal como para evaluar o tratar el cáncer de mama. El documento US 2008/299555 A1 proporciona composiciones, kits, conjuntos de artículos y metodología para detectar múltiples moléculas diana en una muestra, tal como en una muestra de tejido. WO 2008/063378 A2 describe un método para realizar un ensayo de diagnóstico multiplexado, tal como para dos o más dianas diferentes en una muestra. El documento EP 2 608 150 A2 se refiere a un método para registrar conjuntamente imágenes de cortes de tejido teñidas con diferentes biomarcadores.

Como tal, antes de la presente invención, los trabajadores en el campo creían que un ensayo múltiple para la tinción de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2 no sería posible sobre o en células individuales, y mucho menos el uso del mismo anticuerpo de animal en un ensayo múltiple para la tinción de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2.

Sumario

A pesar de la complejidad de un ensayo múltiple para la tinción conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2, los inventores han descubierto sorprendentemente métodos para detectar conjuntamente múltiples moléculas diana, por ejemplo, dos o más proteínas y/o ácidos nucleicos, en una muestra individual (en un portaobjetos individual). Los métodos reivindicados incluyen detectar la presencia y/o cantidad de proteína HER2, ácido nucleico de HER2 (ADN genómico de HER2) y proteína ER en una muestra individual, en los que la detección conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2 es sobre o en células individuales presentes en una población de células, lo que permite así la detección de heterogeneidad tumoral. La detección de la cantidad de ácido nucleico de HER2 puede incluir la detección de la presencia y la cantidad de su cromosoma de referencia (cromosoma 17, por ejemplo, ADN centromérico del cromosoma 17). Los métodos proporcionan una subtificación rápida y precisa de tumores de mama con respecto al estado de HER2 (por ejemplo, expresión de la proteína HER2 y/o amplificación del gen HER2) y estado de ER (por ejemplo, expresión de la proteína ER).

En algunas realizaciones, los métodos incluyen poner en contacto la muestra (tal como una muestra de tumor de mama) con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína HER2 y detectar la presencia (por ejemplo, mediante tinción) y/o la cantidad de proteína HER2, en contacto con la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína ER y detectar la presencia y/o cantidad de proteína ER (por ejemplo, mediante tinción), y poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente al ADN genómico de HER2 y detectar (por ejemplo, mediante tinción) la presencia y/o cantidad de ADN genómico de HER2 (tal como el número de copias del gen HER2).

En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la detección de un ácido nucleico centromérico (tal como ADN centromérico del cromosoma 17) en la misma muestra. En algunos ejemplos, los métodos incluyen determinar la razón del número de copias del gen HER2 con respecto al número de copias de ADN centromérico del cromosoma 17, por ejemplo, para determinar la presencia y/o cantidad de amplificación del gen HER2 (tal como el número de copias del gen HER2) en la muestra.

Incluso en tejidos homogéneos, en los que la multiplexación no proporcionaría la clara ventaja de detectar heterogeneidad tumoral, la multiplexación tiene otras ventajas, tal como la preservación de la muestra.

En resumen, la presente invención presenta métodos múltiple para detectar conjuntamente proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína receptora de estrógenos (ER) y ADN genómico de HER2 (y opcionalmente ADN centromérico del cromosoma 17) en una muestra en un portaobjetos individual.

En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con un cromógeno; poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con un cromógeno; y poner en contacto la muestra con un ácido nucleico específico para ADN genómico de HER2 y teñir el ADN genómico de HER2 con un cromógeno. El cromógeno usado

para la proteína HER2 permite que cada uno de los otros cromógenos sea visible. El cromógeno usado para la proteína ER permite que cada uno de los otros cromógenos sea visible. El cromógeno usado para el ADN de HER2 permite que cada uno de los otros cromógenos sea visible.

5 En algunas realizaciones, las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el cromógeno se realizan antes de la etapa de poner en contacto la muestra con el ácido nucleico específico para ADN genómico de HER2.

10 En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2, poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con un primer cromógeno, el primer cromógeno está a un nivel eficaz para hacer visible la proteína HER2 y para bloquear el anticuerpo específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario; poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con un segundo cromógeno, en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 no se detecta de manera evidente con el segundo cromógeno, ya que el primer cromógeno introducido previamente bloquea el anticuerpo específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario; y poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y teñir el ADN genómico de HER2 con un tercer cromógeno. Las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno pueden realizarse antes de la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2. El primer cromógeno produce un primer color que permite la visualización (por ejemplo, es lo suficientemente transparente como para permitir la visualización) de un segundo color producido por el segundo cromógeno y un tercer color producido por el tercer cromógeno (y opcionalmente un cuarto color producido por un cuarto cromógeno). En algunas realizaciones, el segundo cromógeno bloquea la visibilidad de no más del 10% del tercer cromógeno en el portaobjetos. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno bloquea la visibilidad de no más del 8% del tercer cromógeno en el portaobjetos. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno bloquea la visibilidad de no más del 6% del tercer cromógeno en el portaobjetos. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno bloquea la visibilidad de no más del 4% del tercer cromógeno en el portaobjetos. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno bloquea la visibilidad de no más del 2% del tercer cromógeno en el portaobjetos. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno no bloquea nada de la visibilidad del tercer cromógeno.

35 En algunas realizaciones, la muestra se somete a un tratamiento con proteasa (por ejemplo, proteinasa K, pepsina, colagenasa, una combinación de las mismas, etc.) después de las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poniendo en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno, pero antes de la etapa de poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2. El tratamiento con proteasa es eficaz para permitir la hibridación de la sonda de ácido nucleico con su diana de ADN respectiva. En algunas realizaciones, la muestra se somete a un tratamiento térmico después de las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno, pero antes del tratamiento con proteasa. En algunas realizaciones, el tratamiento con proteasa no elimina el primer color ni el segundo color, y la morfología del tejido se mantiene suficientemente como para permitir la detección del primer color y el segundo color.

50 En algunas realizaciones, el primer cromógeno comprende 3,3'-diaminobencidina (DAB). La etapa de teñir la proteína HER2 puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para HER2. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno comprende Fast Red. La etapa de teñir la proteína ER puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para ER. En algunas realizaciones, el tercer cromógeno comprende acetato de plata. En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 comprende un conjunto de dos o más sondas diana oligonucleotídicas monocatenarias específicas para ADN de HER2. En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 comprende un marcador detectable.

60 El método puede comprender además poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 (CHR17) y teñir el centrómero CHR17 con un cuarto cromógeno. En algunas realizaciones, se pone en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 y la sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 simultáneamente. En algunas realizaciones, el cuarto cromógeno comprende digoxigenina (DIG).

65 La sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 puede comprender un conjunto de dos o más sondas de control oligonucleotídicas monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control de satélite alfa de CHR17, en las que X = 2-14. En algunas realizaciones, las sondas de control están configuradas para lograr al menos dos señales enumerables por célula con una intensidad de tinción de ≥ 2 y una

cobertura de tinción de $\geq 50\%$ del número de núcleos totales en el plazo de 3 horas de hibridación. En algunas realizaciones, cada sonda de control comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-14; o una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 1-14, teniendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 1-14; o una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1-14, o sus complementos. En algunas realizaciones, la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para centrómero CHR17 comprende hibridar la sonda en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas. En algunas realizaciones, el método está libre del uso de ADN de bloqueo. En algunas realizaciones, se usa una cantidad de ADN de bloqueo en una o más etapas del método. En algunas realizaciones, las sondas de control están configuradas para hibridarse de manera única y específica con una porción de la región de control del cromosoma 17 humano, de modo que otros cromosomas o porciones de los mismos no se marquen de manera evidente sin la influencia de ADN de bloqueo.

Más específicamente, el método puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario específico para proteína HER2; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a biotina que se une específicamente al anticuerpo primario específico para proteína HER2; poner en contacto la muestra con estreptavidina conjugada a peroxidasa del rábano picante; poner en contacto la muestra con un sustrato de peróxido de hidrógeno y 3,3'-diaminobencidina (DAB), lo que produce un precipitado de color marrón en las proximidades de la proteína HER2, la DAB es eficaz para bloquear el anticuerpo primario específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario; poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario específico para ER; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina que se une específicamente al anticuerpo primario específico para ER; poner en contacto la muestra con un fosfato de naftol y un segundo cromógeno, lo que produce un precipitado de color rojo en las proximidades de la proteína ER, el anticuerpo primario específico para proteína HER2 no se detecta de manera evidente con Fast Red ya que la DAB introducida previamente bloquea el anticuerpo específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario; poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 conjugada a dinitrofenilo; poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a dinitrofenilo; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa del rábano picante que se une específicamente al anticuerpo primario; poner en contacto la muestra con acetato de plata, hidroquinona y peróxido de hidrógeno, produciéndose de ese modo un precipitado de color negro en los núcleos correspondientes al ADN de HER2; y poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 (CHR17) conjugada a digoxigenina; poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a digoxigenina; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina que se une específicamente al anticuerpo primario anti-digoxigenina; Poner en contacto la muestra con un fosfato de naftol y Fast Red, produciéndose de ese modo un precipitado de color rojo en las proximidades del ADN centromérico del cromosoma 17. El método puede comprender además determinar visualmente la presencia y/o cantidad de proteína HER2, proteína ER, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra. El método puede incluir microscopía de campo brillante, por ejemplo, para determinar la presencia y/o cantidad de proteína HER2, proteína ER, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra.

El método puede comprender determinar visualmente la presencia y/o cantidad de la proteína HER2, la proteína ER, el ADN genómico de HER2 y el centrómero CHR17 en la muestra. El método puede ser capaz de detectar células que se clasifican como: (i) positivas para la proteína HER2, positivas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; (ii) positivas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; (iii) negativas para la proteína HER2, positivas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; (iv) negativas para la proteína HER2, positivas para la proteína ER y negativas para el gen HER2; (v) negativas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; o (vi) negativas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER y negativas para el gen HER2.

La presente invención también presenta un portaobjetos individual que comprende una muestra de células teñidas de manera cromogénica para la proteína HER2, la proteína ER y el ADN de HER2. La presente invención también presenta un portaobjetos individual que comprende una muestra de células teñidas de manera cromogénica para la proteína HER2, la proteína ER, el ADN de HER2 y el cromosoma 17. Cada marcador (por ejemplo, proteína HER2, proteína ER, ADN de HER2, cromosoma 17) se tiñe con un cromógeno diferente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína HER2 se tiñe con un primer cromógeno, la proteína ER se tiñe con un segundo cromógeno y el ADN de HER2 se tiñe con un tercer cromógeno. En algunas realizaciones, la proteína HER2 se tiñe con un primer cromógeno, la proteína ER se tiñe con un segundo cromógeno, el ADN de HER2 se tiñe con un tercer cromógeno y el cromosoma 17 se tiñe con un cuarto cromógeno. En algunas realizaciones, el primer cromógeno comprende DAB, el segundo cromógeno comprende Fast Red y el tercer cromógeno comprende acetato de plata.

La presente invención también presenta un método múltiplex para detectar conjuntamente proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína Ki67, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 en una muestra en un portaobjetos individual. El método puede comprender poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con un primer cromógeno; el primer cromógeno se encuentra a un nivel eficaz para hacer visible la proteína HER2 y bloquear el anticuerpo

específico para proteína HER2 en exceso; poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para Ki67 y teñir la proteína Ki67 con un segundo cromógeno, en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 no se detecta de manera evidente con el segundo cromógeno ya que el primer cromógeno introducido previamente bloquea el anticuerpo específico para proteína HER2 en exceso; poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y teñir el ADN genómico de HER2 con un tercer cromógeno; y poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 (CHR17) y teñir el centrómero CHR17 con un cuarto cromógeno.

La presente invención también presenta métodos múltiplex para detectar conjuntamente una proteína HER2, una proteína ER y un ADN genómico de HER2 en una muestra en un portaobjetos individual, en el que el método comprende teñir la proteína HER2 poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo específico para la proteína HER2 y poniendo en contacto la muestra con un primer componente de cromógeno para el anticuerpo específico para proteína HER2, el primer componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un primer color, en el que la presencia del primer color indica la presencia de la proteína HER2; teñir la proteína ER poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína ER y poniendo en contacto la muestra con un segundo componente de cromógeno para el anticuerpo específico para proteína ER, el segundo componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un segundo color, en el que la presencia del segundo color indica la presencia de la proteína ER; y teñir ADN de HER2 poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 y poniendo en contacto la muestra con un tercer componente de cromógeno para la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2, el tercer componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un tercer color, en el que la presencia del tercer color indica la presencia de ADN de HER2. En algunas realizaciones, el método comprende además teñir el ADN centromérico del cromosoma 17 poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN centromérico del cromosoma 17 y poniendo en contacto la muestra con un cuarto componente de cromógeno para la sonda de ácido nucleico específica para ADN centromérico del cromosoma 17. El cuarto componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un cuarto color, en el que la presencia del cuarto color indica la presencia del cromosoma 17 ADN centromérico. En algunas realizaciones, el primer componente de cromógeno comprende DAB, el segundo componente de cromógeno comprende Fast Red y el tercer componente de cromógeno comprende plata. En algunas realizaciones, el primer color es lo suficientemente transparente como para permitir la visualización del segundo color y el tercer color.

Las anteriores y otras características de la divulgación resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que avanza con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Las siguientes figuras se presentan en color.

Las figuras 1A y 1B son un par de imágenes de una muestra de tejido tumoral de mama teñidas para el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y la proteína ER (color rojo) a un aumento de 4X (figura 1A) y un aumento de 60X (figura 1B). La muestra presenta amplificación del gen HER2, positiva para la proteína HER2 y positiva para la proteína ER. Sin embargo, algunas células (rodeadas por un círculo) son negativas para la proteína HER2, aunque son positivas para la proteína ER y tienen amplificación del gen HER2.

Las figuras 2A y 2B son un par de imágenes de una muestra de tejido tumoral de mama teñidas para el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y la proteína ER (color rojo) a un aumento de 4X (figura 2A) y un aumento de 60X (figura 2B). La muestra presenta amplificación del gen HER2 y es positiva para la proteína ER, pero es negativa para la proteína HER2, tal como lo demuestra la tinción de color marrón débil o ausente.

Las figuras 3A y 3B son un par de imágenes de una muestra de tejido tumoral de mama teñidas para el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y la proteína ER (color rojo) a un aumento de 4X (figura 3A) y un aumento de 60X (figura 3B). La muestra presenta la amplificación del gen HER2 y es positiva para la proteína HER2, pero es negativa para ER, tal como lo demuestra la falta de tinción de color rojo. La tinción de color rojo en la figura 3B es la tinción de la proteína ER en células normales de la glándula mamaria en la muestra.

Las figuras 4A-4C son una serie de imágenes que muestran IHC de proteína ER con tinción iVIEW-DAB (figura 4A) o tinción con ULTRAVIEW Red (figura 4B) e IHC/ISH de proteína y gen HER2 con tinción para IHC de ULTRAVIEW Red (figura 4C) en una muestra de tejido de mama. Aumento de 20X.

Las figuras 5A-5C son una serie de imágenes que muestran IHC de proteína Ki67 con tinción iVIEW-DAB (figura 5A) o tinción ULTRAVIEW Red (figura 5B) e IHC/ISH de proteína y gen HER2 con tinción para IHC ULTRAVIEW Red (figura 5C) en una muestra de tejido de mama. Aumento de 20X.

La figura 6 es una imagen de la detección a modo de ejemplo del gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (color marrón) y Ki67 (color rojo) en una muestra de tejido de mama.

Las figuras 7A-7D son una serie de imágenes de tinción de la proteína HER2 (tinción de color marrón), el gen HER2 (puntos negros) y la proteína Ki67 (tinción de color rojo) (figuras 7A y 7C) o la proteína HER2 (tinción de color marrón), el gen HER2 (puntos negros) y la proteína ER (tinción de color rojo) (figuras 7B y 7D) en una muestra de tejido de mama con un aumento de 20X (figuras 7A y 7B) o un aumento de 60X (figuras 7C y 7D).

5 Las figuras 8A-8C son una serie de imágenes que muestran el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (tinción de color marrón) y la proteína ER (tinción de color rojo) en una muestra de tejido de mama equívoca para HER2. La figura 8B muestra la muestra con un aumento de 10X. El área de color rojo recuadrada en el lado superior izquierdo en la figura 8B se muestra en la figura 8A con un aumento de 60X y el área azul recuadrada (ubicada aproximadamente en el centro) en la figura 8B se muestra en la figura 8C con un aumento de 60X.

10 Las figuras 9A-9C son una serie de imágenes que muestran el gen HER2 (puntos negros), la proteína HER2 (tinción de color marrón) y la proteína ER (tinción de color rojo) en una muestra de tejido de mama positivo para HER2. La figura 9B muestra la muestra con un aumento de 10X. El área de color rojo recuadrada en el lado superior izquierdo en la figura 9B se muestra en la figura 9A con un aumento de 60X y el área azul recuadrada (ubicada aproximadamente en el centro) en la figura 9B se muestra en la figura 9C con un aumento de 60X.

15 Las figuras 10A y 10B son un par de imágenes que muestran la tinción de la proteína HER2 (color marrón), la proteína ER (púrpura), el gen HER2 (manchas de color negro) y el ADN centromérico del cromosoma 17 (manchas de color rojo) en una muestra de tejido de mama positiva para HER2/positiva para ER ejemplar con un aumento de 20X (figura 10A) y un aumento de 60X (figura 10B).

20 Las figuras 11A y 11B son un par de imágenes que muestran la tinción de la proteína HER2 (color marrón), la proteína ER (púrpura), el gen HER2 (manchas de color negro) y el ADN centromérico del cromosoma 17 (manchas de color rojo) en una muestra de tejido de mama negativa para HER2/positiva para ER ejemplar con un aumento de 20X (figura 11A) y con un aumento de 60X (figura 11B).

25 La figura 12 muestra una representación esquemática de cuatro tipos de células: positivas para la proteína HER2/positivas para la proteína ER/positivas para el gen HER2, negativas para la proteína HER2/positivas para la proteína ER/positivas para el gen HER2, positivas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER/positivas para el gen HER2, negativas para la proteína HER2/negativas para la proteína ER/positivas para el gen HER2. Algunos tumores que muestran heterogeneidad pueden tener dos o más de los tipos de células.

30 La figura 13 muestra una demostración de la heterogeneidad microintratumoral del cáncer de mama usando los métodos de la presente invención (ensayo del gen HER2/proteína HER2/proteína ER). La heterogeneidad tumoral de la proteína HER2 y la expresión de la proteína ER se observaron con bajo aumento (A). Sin embargo, con un aumento elevado, se reconocieron tres tipos fenotípicos y genéticos de poblaciones de células de cáncer de mama: 1) población de células positiva para la proteína HER2, positiva para el gen HER2 y positiva para ER (B); 2) población de células negativa para HER2, positiva para el gen HER2 y positiva para la proteína ER (C); y 3) población de células negativa para HER2, positiva para el gen HER2 y negativa para ER (D).

35 La figura 14 muestra una forma redonda definida por un ajuste de curva cerrada simple dentro de una primera región. La primera región es un área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo. El círculo concéntrico interno tiene un radio interno (R_{in}) y el círculo concéntrico externo tiene un radio externo (R_{ext}). R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} . La curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$.

40 La figura 15 muestra una representación esquemática de diversas etapas usadas para teñir el HER2, ER y ADN de HER2. La presente invención no se limita a los marcadores, reactivos, etapas u orden de etapas mostrados en la figura 15.

45 La figura 16 muestra una serie de ensayos realizados con muestras de cáncer de mama y ejemplos de puntuaciones. El panel de la izquierda muestra los ensayos de IHC de HER2. El panel central muestra un ISH de HER2 dual. El panel de la derecha muestra el ensayo de gen-proteína HER2 (tres marcadores): la proteína HER2 se muestra en color marrón, el ADN de HER2 se tiñe de negro y el cromosoma 17 se muestra de color rojo. La figura 16A muestra una muestra puntuada como 3+ (IHC de HER2). La figura 16B muestra una muestra puntuada como 2+ (IHC de HER2). La figura 16C muestra una muestra puntuada como 1+ (IHC de HER2). La figura 16D muestra una muestra calificada como 0 o negativa (IHC de HER2).

50 La figura 17 muestra un ejemplo de un ensayo de gen-proteína HER2 realizado con una muestra de cáncer de mama. La proteína HER2 se muestra en color marrón, el ADN de HER2 se tiñe de negro y el cromosoma 17 se muestra de color rojo. La muestra presenta heterogeneidad: las células en la parte inferior izquierda son negativas para la proteína HER2 (1+) pero se amplifica el ADN de HER2, las células de la parte central son equívocas para la proteína HER2 (2+) pero se amplifica el ADN de HER2 y las células de la izquierda son positivas para la proteína HER2 (3+) y se amplifica el ADN de HER2. Por tanto, no todas las células de cáncer de mama en la muestra sobreexpresan la proteína HER2.

La figura 18 muestra un ensayo de gen-proteína HER2 realizado en una muestra de cáncer gástrico. La proteína HER2 se muestra en color marrón, el ADN de HER2 se tiñe de negro y el cromosoma 17 se muestra de color rojo. La muestra presenta heterogeneidad: las células resaltadas en el recuadro amarillo en el lado inferior izquierdo son negativas para la proteína HER2, mientras que otras células en la muestra son positivas para la proteína HER2. La presente invención no se limita a ensayos de gen-proteína en células de cáncer de mama y puede realizarse en cualquier tejido apropiado, por ejemplo, tejido gástrico.

Descripción detallada

I. Términos

A menos que se expliquen de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención dada a conocer. Los términos en singular “un/o”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra “o” pretende incluir “y” a menos que el contexto indique claramente lo contrario. “Que comprende” significa “que incluye”. Por tanto, “que comprende A o B” significa “que incluye A” o “que incluye B” o “que incluye A y B”.

Se describen a continuación métodos y materiales adecuados para la práctica y/o pruebas de realizaciones de la divulgación. Tales métodos y materiales son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Pueden usarse otros métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Por ejemplo, se describen métodos convencionales bien conocidos en la técnica a la que se refiere la divulgación en diversas referencias generales y más específicas, incluyendo, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos hasta 2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las explicaciones de los términos.

Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica o someter a prueba la tecnología da a conocer, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

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

Detectar: determinar si un agente (tal como una señal o un antígeno, una proteína o un ácido nucleico particular) está presente o ausente, por ejemplo, en una muestra. En algunos ejemplos, esto puede incluir además la cuantificación y/o localización, por ejemplo, la localización dentro de una célula o un compartimento celular particular. “Detectar” se refiere a cualquier método para determinar si existe algo o no, tal como determinar si una molécula diana está presente en una muestra biológica. Por ejemplo, “detectar” puede incluir el uso de un dispositivo visual o mecánico para determinar si una muestra presenta una característica específica. En determinados ejemplos, la microscopía óptica y otros medios microscópicos se usan para detectar un marcador detectable unido a una diana o de manera próxima a la misma. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un agente (por ejemplo, antígeno, la proteína, ácido nucleico) es “visible” si se “detecta”, a través de un marcador detectable ligado directa o indirectamente al agente.

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

dianas para proporcionar un ensayo múltiple que puede proporcionar la detección de las múltiples dianas en una muestra individual.

5 Los marcadores detectables incluyen moléculas cromogénicas, fluorescentes, fosforescentes y/o luminiscentes, catalizadores (tales como enzimas) que convierten una sustancia en otra sustancia para proporcionar una señal detectable (por ejemplo, al convertir una sustancia incolora en una sustancia coloreada o viceversa, o produciendo un precipitado o aumentando la turbidez de la muestra), haptenos que pueden detectarse a través de las interacciones de unión anticuerpo-hapteno usando conjugados de anticuerpos marcados de manera detectable adicionales, y moléculas o materiales paramagnéticos y magnéticos. Los ejemplos particulares de marcadores detectables incluyen: enzimas, tales como peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, glucosa oxidasa, β -galactosidasa o β -glucuronidasa; fluoróforos tales como fluoresceínas, luminóforos, cumarinas, colorantes BODIPY, resorufinas y rodaminas (pueden encontrarse muchos ejemplos adicionales de moléculas fluorescentes en The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR); nanopartículas tales como puntos cuánticos (patentes estadounidenses n.ºs 6.815.064, 6.682.596 y 6.649.138); quelatos de metal tales como los quelatos de DOTA y DPTA de iones de metales radiactivos o paramagnéticos como Gd^{3+} ; y liposomas, por ejemplo liposomas que contienen moléculas fluorescentes atrapadas. Cuando el marcador detectable incluye una enzima, un sustrato detectable tal como un cromógeno, un compuesto fluorogénico o un compuesto luminogénico se usa en combinación con la enzima para generar una señal detectable (una amplia variedad de tales compuestos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Life Technologies, Carlsbad, CA).

25 Alternativamente, puede usarse una enzima en un esquema de detección metalográfica. En algunos ejemplos, los métodos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima, tal como fosfatasa alcalina, en combinación con un ion de metal soluble en agua y un sustrato inactivo en reacciones redox de la enzima. El sustrato se convierte en un agente activo en reacciones redox por la enzima, y el agente activo en reacciones redox reduce el ion de metal, haciendo que forme un precipitado detectable (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 7.642.064; 7.632.652). En otros ejemplos, los métodos de detección metalográfica incluyen el uso de una enzima oxidoreductasa (tal como la peroxidasa del rábano picante) junto con un ion de metal soluble en agua, un agente oxidante y un agente reductor, para formar de nuevo un precipitado detectable (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.670.113). Los haptenos son pequeñas moléculas que pueden unirse por anticuerpos. Los ejemplos de haptenos incluyen dinitrofenilo (DNP), biotina, digoxigenina (DIG) y fluoresceína. Otros haptenos incluyen haptenos de oxazol, pirazol, tiazol, nitroarilo, benzofurano, triterpeno, urea, tiourea, rotenoide, cumarina y cicloglano, tales como los que se describen en la patente estadounidense n.º 7.695.929.

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

40 Están disponibles públicamente secuencias de ácido nucleico y proteína ER. Por ejemplo, el gen ER está ubicado en el cromosoma 6q25.1 y su secuencia se da a conocer como el n.º de registro de GenBank NC_000006.11 (152011631-152424409). Los n.ºs de registro de GenBank NM_001122742, NM_001122741, NM_001122740, NM_000125, XM_005266856 y XM_005266857 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de ER y los n.ºs de registro de GenBank NP_001116214, NP_001116213, NP_001116212, NP_000116, XP_005266913, y XP_005266914 dan a conocer secuencias de proteína ER, tal como se proporcionó por GenBank el 4 de octubre de 2013.

50 HER2: también conocido como el homólogo 2 del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar v-erb-b2 (ErbB2), el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, Her2/neu, c-erb B2/neu y el homólogo del oncogén derivado de neuroblastoma/glioblastoma; n.º de registro de GenBank Gene ID 2064. Un miembro de la familia de tirosina cinasas receptoras del factor de crecimiento epidérmico. Her2 se heterodimeriza con otros miembros de la familia de receptores de EGF unidos a ligando, aunque carece de un dominio de unión a ligando y no puede unirse a los ligandos por sí mismo. La amplificación y/o sobreexpresión de Her2 se producen en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama y de ovarios.

60 Están disponibles públicamente secuencias de ácido nucleico y proteína Her2. Por ejemplo, el gen Her2 está ubicado en el cromosoma 17q12 y su secuencia se describe como el n.º de registro de GenBank NC_000017.10 (37844167-37884915). Los n.ºs de registro de GenBank NM_001005862, NM_004448, XM_005257139 y XM_005257140 dan a conocer secuencias de ácido nucleico de Her2 y los n.ºs de registro de GenBank: NP_001005862, NP_004439, XP_005257196, y XP_005257197 dan a conocer secuencias de proteína Her2, tal como se proporcionó por GenBank el 4 de octubre de 2013.

65 Hibridación: formar pares de bases entre regiones complementarias de dos cadenas de ADN, ARN o entre ADN y ARN, formando de ese modo una molécula dúplex. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación y de la composición y

longitud de las secuencias de ácido nucleico de hibridación. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (tal como la concentración de Na⁺) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. La presencia de un producto químico que disminuye la hibridación (tal como formamida) en el tampón de hibridación también determinará la rigurosidad (Sadhu *et al.*, J. Biosci. 6: 817-821, 1984). Los cálculos referentes a las

- 5 condiciones de hibridación para alcanzar grados particulares de rigurosidad se comentan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11). Las condiciones de hibridación para ISH también se comentan en Landegent *et al.*, Hum. Genet. 77: 366-370, 1987; Lichter *et al.*, Hum. Genet. 80: 224-234, 1988; y Pinkel *et al.*, Proc. Natl Acad Sci. USA 85: 9138-9142, 1988.
- 10 Inmunohistoquímica (IHC): un método de determinación de la presencia o distribución de un antígeno en una muestra detectando la interacción del antígeno con un agente de unión específica, tal como un anticuerpo. Una muestra se pone en contacto con un anticuerpo en condiciones que permiten la unión anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno puede detectarse por medio de un marcador detectable conjugado al anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado a un anticuerpo secundario, que se une específicamente
- 15 al anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta).

Hibridación in situ (ISH): un método de determinación de la presencia o distribución de un ácido nucleico en una muestra usando la hibridación de una sonda de ácido nucleico marcada para localizar una secuencia de ADN o ARN específica en una porción o sección de tejido (*in situ*), o, si el tejido es lo suficientemente pequeño (por ejemplo, semillas de plantas, embriones de *Drosophila*), en todo el tejido (ISH de preparación completa). Puede usarse ISH de ADN para determinar la estructura de los cromosomas, tal como para su uso en diagnóstico médico para evaluar la integridad cromosómica y/o para determinar el número de copias de genes en una muestra. ISH de ARN mide y localiza ARNm y otros transcritos dentro de secciones de tejido o preparaciones completas.

- 25 Para la ISH, las células y los tejidos de muestra se tratan generalmente para fijar los ácidos nucleicos diana en su lugar y para aumentar el acceso de la sonda a la molécula diana. La sonda marcada de manera detectable se hibrida con la secuencia diana a temperatura elevada, y luego se retira por lavado la sonda en exceso. Los parámetros de la disolución, tales como la temperatura, la concentración de sal y/o detergente, pueden manipularse para eliminar cualquier interacción no idéntica (por ejemplo, de modo que solo permanezcan unidas las coincidencias de secuencia exactas). Luego, la sonda marcada se localiza y potencialmente se cuantifica en el tejido usando o bien autorradiografía, o bien microscopía de fluorescencia o bien inmunohistoquímica, respectivamente.
- 30 ISH también puede usar dos o más sondas, que normalmente están marcadas de manera diferente para detectar simultáneamente dos o más ácidos nucleicos.

- 35 Sonda: un ácido nucleico aislado (tal como un oligonucleótido sintético aislado), unido a un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores típicos incluyen isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos (incluidos, entre otros, DNP) y enzimas. Se comentan métodos de marcaje y orientación en la elección de marcadores apropiados para diversos propósitos, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989) y Ausubel *et al.* (en Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. y Wiley-Intersciences, 1992).
- 40

Las sondas pueden seleccionarse para proporcionar una especificidad deseada, y pueden comprender al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleótidos o más de un ácido nucleico diana. En ejemplos particulares, las sondas pueden incluir al menos 100, 250, 500, 600, 1000 nucleótidos o más de un ácido nucleico diana. En algunos

45 ejemplos, la sonda incluye segmentos de nucleótidos que proceden de porciones no contiguas de un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico genómico de HER2.

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

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

Un agente de unión específica se une sustancialmente solo a una diana particular. Puede producirse una cantidad minoritaria de interacción inespecífica entre un agente de unión específica y una proteína o un ácido nucleico no diana. La unión específica de anticuerpo a antígeno generalmente da como resultado un aumento de más de 2 veces, tal como de más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100 veces de la cantidad de anticuerpo unido u otro

5 ligando (por tiempo unitario) a una proteína diana, en comparación con una proteína no diana. Pueden usarse formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que reaccionan específicamente con una proteína particular (tales como los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína HER2 o la proteína ER). Véase Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo.

10 La unión específica de una sonda de ácido nucleico a una molécula de ácido nucleico diana generalmente da como resultado un aumento de más de 2 veces, tal como de más de 5 veces, más de 10 veces o más de 100 veces de la cantidad de sonda de ácido nucleico unida a un ácido nucleico diana en comparación con un ácido nucleico no diana. Una variedad de condiciones de ISH son apropiadas para seleccionar sondas de ácido nucleico que se unen

15 específicamente con una secuencia de ácido nucleico particular (tal como una sonda específica para HER2 o una sonda de centrómero del cromosoma 17).

Sujeto: cualquier organismo vertebrado pluricelular, tal como los mamíferos humanos o no humanos (por ejemplo, sujetos veterinarios).

20

II. Vista general de varias realizaciones

En el presente documento se describen métodos para detectar conjuntamente múltiples moléculas diana (tales como dos o más proteínas y/o ácidos nucleicos) en una muestra individual en un portaobjetos individual. En realizaciones

25 particulares, los métodos incluyen detectar la presencia y/o cantidad de proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2 (tal como el número de copias del gen HER2) en una muestra individual. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además detectar la presencia y/o cantidad de ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra, y en algunos ejemplos, determinar la razón de ADN genómico de HER2 con respecto a ADN centromérico del cromosoma 17 (tal como la razón del número de copias del gen HER2 con respecto al número de

30 copias de centrómero del cromosoma 17). Los métodos incluyen el uso de diferentes marcadores detectables y/o sistemas de detección para cada uno de la proteína HER2, la proteína ER, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 (si están incluidos), de tal manera que cada uno pueda detectarse visualmente de manera individual en una muestra individual. La figura 15 muestra un ejemplo no limitativo de un ensayo de gen-proteína para detectar proteína HER2, ADN de HER2 y ADN del cromosoma 17.

35 En algunas realizaciones de los métodos, se pone en contacto una muestra con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo primario) que se une específicamente a la proteína HER2 y se detecta la proteína HER2, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo primario) que se une específicamente a la proteína ER y se detecta la proteína ER, y se pone en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico que se

40 une específicamente al ADN genómico de HER2 y se detecta el ADN genómico de HER2. En una realización, el método comprende detectar la proteína HER2 y la proteína ER antes de detectar el ADN de HER2 (o antes de detectar el ADN de HER2 y el ADN de CHR17). En una realización específica, el método comprende detectar secuencialmente la proteína HER2 (poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo específico para HER2 y detectando la proteína HER2 en la muestra), seguido por detectar la proteína ER (poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo específico para la ER y detectando la proteína ER en la muestra), y luego seguido por detectar el

45 ADN genómico de HER2 (poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y detectando el ADN genómico de HER2).

Como ejemplo, se hace referencia a las figuras 1A-1B, que muestran un par de imágenes de una muestra de tejido tumoral de mama teñidas para el gen HER2 (tinción nuclear de punteado de color negro), la proteína HER2 (tinción de membrana de color marrón) y la proteína ER (tinción citoplásmica de color rojo) con un aumento de 4X (figura 1A) y un aumento de 60X (figura 1B). La muestra presenta amplificación del gen HER2, positiva para la proteína HER2 y positiva para la proteína ER. Sin embargo, algunas células (rodeadas por un círculo) son negativas para la proteína HER2, aunque son positivas para la proteína ER y tienen amplificación del gen HER2. Debido a que las terapias dirigidas a HER2 se dirigen a la proteína HER2, esta heterogeneidad podría dar como resultado que la terapia no afecte (por ejemplo, inhiba o incluso destruya) a las células tumorales que presentan amplificación del gen HER2, pero que no sobreexpresan la proteína HER2. Sin embargo, las células que son positivas para ER todavía se verían

55 afectadas por las terapias dirigidas a ER.

60 En realizaciones adicionales, el método incluye poner en contacto la muestra (de manera simultánea o secuencial) con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de centrómero del cromosoma 17 y detectar el ADN genómico de HER2 y luego detectar el ADN genómico de centrómero del cromosoma 17.

65 Los métodos pueden usar diferentes marcadores detectables y/o sistemas de detección para cada una de las dianas, de manera que cada una pueda detectarse individualmente en una muestra individual. Las proteínas/ADN

pueden detectarse mediante los cromógenos usando reactivos adicionales tales como anticuerpos secundarios específicos para los anticuerpos primarios.

5 El primer marcador (por ejemplo, HER2) puede teñirse de un primer color, el segundo marcador (por ejemplo, ER) puede teñirse de un segundo color, el tercer marcador (por ejemplo, ADN de HER2) puede teñirse de un tercer color, y el cuarto marcador (por ejemplo, el cromosoma 17) puede teñirse de un cuarto color. El primer color es lo suficientemente transparente como para permitir la visualización del segundo color y/o del tercer y/o el cuarto color. En algunas realizaciones, el primer color bloquea no más del 50%, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10%, no más del 8%, no más del 6%, no más del 4%, no más del 2% o nada de la intensidad del
10 segundo color y/o el tercer color y/o el cuarto color. El segundo color permite la visualización del primer color y/o el tercero y/o el cuarto color. En algunas realizaciones, el segundo color bloquea no más del 50%, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10%, no más del 8%, no más del 6%, no más del 4%, no más del 2% o nada de la intensidad del primer color y/o el tercer color y/o el cuarto color. El tercer color permite la visualización del primer color y/o el segundo color y/o el cuarto color. En algunas realizaciones, el tercer color bloquea no más del 50%, no más del 40%, no más del 30%, no más del 20%, no más del 10%, no más del 8%, no más del 6%, no más del 4%, no más del 2% o nada de la intensidad del primer color y/o el segundo color y/o el tercer color.

La detección incluye, pero no se limita a, microscopía de campo brillante. En algunas realizaciones, la etapa de tinción de proteínas se realiza antes de la etapa de tinción de ADN. Por ejemplo, la etapa de teñir la proteína HER2 y
20 la proteína ER se realiza antes de la etapa de teñir el ADN de HER2 y el ADN del cromosoma 17.

La proteína HER2 puede detectarse usando un primer cromógeno. La proteína ER puede detectarse usando un segundo cromógeno (diferente). El ADN de HER2 puede detectarse usando un tercer cromógeno (diferente). El ADN centromérico del cromosoma 17 puede detectarse con un cuarto cromógeno (diferente). Las proteínas/ADN pueden
25 detectarse mediante los cromógenos usando reactivos adicionales tales como anticuerpos secundarios específicos para los anticuerpos primarios.

El primer cromógeno puede usarse a un nivel como para bloquear el anticuerpo específico para proteína HER2 que no está unido por su anticuerpo secundario apropiado. Esto puede ayudar a reducir la reactividad cruzada si, por
30 ejemplo, la especie huésped es la misma para el anticuerpo primario específico para proteína HER2 y el anticuerpo primario específico para proteína ER. En algunas realizaciones, el primer cromógeno (para detectar HER2) comprende 3,3'-diaminobencidina (DAB).

En algunas realizaciones, el segundo cromógeno es lo suficientemente transparente como para bloquear no más del
35 10% del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno es lo suficientemente transparente como para bloquear no más del 8% del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno es lo suficientemente transparente como para bloquear no más del 6% del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno es lo suficientemente transparente como para bloquear no más del 4% del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. En
40 algunas realizaciones, el segundo cromógeno es lo suficientemente transparente como para bloquear no más del 2% del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. En algunas realizaciones, el segundo cromógeno es lo suficientemente transparente como para que no bloquee la visibilidad del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. Por ejemplo, es visible todo el color resultante del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno que está presente en el portaobjetos: el segundo cromógeno no impide la visibilidad del color resultante del tercer cromógeno y/o el cuarto cromógeno. En algunos ejemplos de los métodos dados a conocer, se pone en contacto la muestra con un
45 anticuerpo que se une específicamente a la proteína HER2. Se conocen en la técnica métodos para construir anticuerpos específicos para HER2. Además, tales anticuerpos pueden estar disponibles comercialmente. En un ejemplo específico, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2, tal como el anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER-2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, por ejemplo, número de catálogo 790-2991). Los anticuerpos adicionales específicos para HER2 incluyen el anticuerpo anti-c-erbB2 A0485 (Dako, Carpintería, CA). En algunos ejemplos, el anticuerpo específico para HER2 se marca de manera detectable, lo que permite la detección de la proteína HER2 en la muestra. En otros ejemplos, después de poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-HER2 (el anticuerpo primario), se pone en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable producido contra el anticuerpo primario, tal como un
50 anticuerpo secundario conjugado a una enzima (por ejemplo, fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa del rábano picante (HRP)) o un anticuerpo secundario conjugado a un hapteno que puede detectarse con un reactivo adicional conjugado a una enzima. La presencia de la proteína HER2 se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de sustrato y/o cromógeno, lo que produce un precipitado coloreado en las proximidades del anticuerpo anti-HER2. La presencia y/o cantidad de proteína HER2 se detecta al determinar la intensidad de tinción en la muestra. En algunos ejemplos, la intensidad de tinción se clasifica mediante un lector de portaobjetos en una escala numérica, tal como una escala de 0-3 (por ejemplo, en la que 0 indica que no hay tinción con respecto al fondo, 1 indica tinción débil, 2 indica tinción moderada y 3 indica tinción fuerte).

Puede usarse cualquier composición de detección o cromógeno de manera apropiada para cualquiera de los
65 marcadores. Véase, por ejemplo, el documento WO 2013148498.

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

En algunos ejemplos de los métodos dados a conocer, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a la proteína ER. Se conocen en la técnica métodos de construcción de anticuerpos específicos para ER. Además, tales anticuerpos pueden estar disponibles comercialmente. En un ejemplo específico, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo monoclonal de conejo anti-ER, tal como el anticuerpo monoclonal de conejo anti-ER (SP1) (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, por ejemplo, número de catálogo 790-4324). Los anticuerpos específicos para ER adicionales incluyen los anticuerpos monoclonales anti-ER 1D5 y ER-2-123 (Dako, Carpintería, CA). En algunos ejemplos, el anticuerpo específico para ER se marca de manera detectable, lo que permite la detección de la proteína ER en la muestra. En otros ejemplos, después de poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-ER (el anticuerpo primario), se pone en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable producido contra el anticuerpo primario, tal como un anticuerpo secundario conjugado a una enzima (por ejemplo, AP o HRP) o un anticuerpo secundario conjugado a un hapteno que puede detectarse con un reactivo adicional conjugado a una enzima. La presencia de proteína ER se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de sustrato y/o cromógeno, lo que produce un precipitado coloreado en las proximidades del anticuerpo anti-ER. La presencia y/o cantidad de proteína ER se detecta determinando la intensidad de tinción en la muestra. En algunos ejemplos, la tinción se puntúa con un lector de portaobjetos determinando un porcentaje de células tumorales en la muestra que se tiñen para la proteína ER.

En un ejemplo particular, el método incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a la proteína ER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de conejo anti-ER SP1), por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-ER se una específicamente a la proteína ER en la muestra. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a AP que se une específicamente al anticuerpo primario, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo primario. Luego, se pone en contacto la muestra con un fosfato de naftol y cromógeno Fast Red, lo que produce un precipitado de color rojo cerca del anticuerpo anti-ER (y la proteína ER) que puede detectarse visualmente mediante microscopía óptica. En un ejemplo, los reactivos (excepto el anticuerpo anti-ER) se incluyen en un kit, tal como el kit de detección de color rojo con fosfatasa alcalina ULTRAVIEW Universal (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 760-501). Un experto en la técnica puede seleccionar reactivos de detección alternativos (tales como anticuerpos, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) incluyendo aquellos que producen un precipitado de color diferente para la detección de la proteína ER. En algunas realizaciones, el cromógeno (por ejemplo, el segundo cromógeno) usado para ER comprende cualquier otro cromógeno apropiado (véase el documento US20130260379), por ejemplo, Fast Red, Discovery Purple, etc.

Alternativamente, el método incluye poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a la proteína ER (por ejemplo, anticuerpo monoclonal de conejo anti-ER SP1), por ejemplo en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-ER se una específicamente a la proteína ER en la muestra. Luego, se pone en contacto la muestra con un anticuerpo secundario biotilado que se une específicamente al anticuerpo primario, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo primario. Luego, se pone en contacto la muestra con estreptavidina-HRP, seguido por peróxido de hidrógeno y cromógeno Discovery Purple (un conjugado de tiramida-rodamina; Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de componente 700-229), lo que produce un colorante púrpura unido a la muestra cerca del anticuerpo anti-ER (y la proteína ER) que puede detectarse visualmente mediante microscopía óptica.

En algunos ejemplos, de los métodos dados a conocer, se pone en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a ADN genómico de HER2. Un experto en la técnica conoce métodos de construcción de sondas de ácido nucleico específicas para HER2. Las sondas de ácido nucleico específicas para HER2 también pueden estar disponibles comercialmente. Por ejemplo, una sonda HER2 adecuada para uso en los métodos dados a conocer incluye la sonda de HER2 incluida en el cóctel de sondas para ISH dual de HER2 INFORM (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 780-4422). En un ejemplo, se pone en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico de HER2 marcado con hapteno, por ejemplo en condiciones específicas para que la sonda se una específicamente (hibride con) ADN genómico de HER2 en la muestra. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al hapteno, por ejemplo, en

condiciones suficientes para que el anticuerpo se una específicamente al hapteno. El anticuerpo puede conjugarse a una enzima (tal como AP o HRP) o, alternativamente, puede ponerse en contacto la muestra con un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-hapteno, en el que el segundo anticuerpo se conjuga a una enzima. La presencia de ADN genómico de HER2 se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de sustrato y/o sustrato para producir un precipitado coloreado en las proximidades de la sonda de ácido nucleico de HER2. En algunos ejemplos, el número de copias del gen del ADN de HER2 en se puntúa la muestra con un lector de portaobjetos contando el número de áreas de precipitado (“manchas”) en los núcleos de las células tumorales.

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

25 En ejemplos adicionales, los métodos dados a conocer incluyen además poner en contacto la muestra con una sonda que se une específicamente a ADN centromérico del cromosoma 17 y detectar el ADN del cromosoma 17 (tal como el número de copias del cromosoma 17) en la muestra. En algunos ejemplos, de los métodos dados a conocer, se pone en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a ADN centromérico del cromosoma 17. Un experto en la técnica conoce métodos de construcción de sondas de ácido nucleico específicas para el centrómero del cromosoma 17. Además, las sondas de ácido nucleico del centrómero del cromosoma 17 también pueden estar disponibles comercialmente. Por ejemplo, una sonda de centrómero del cromosoma 17 adecuada para uso en los métodos dados a conocer incluye la sonda de centrómero del cromosoma 17 incluida en el cóctel de sondas para ISH dual de HER2 INFORM (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 780-4422). En un ejemplo, se pone en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico centromérico del cromosoma 17 marcado con hapteno, por ejemplo en condiciones específicas para que la sonda se una específicamente (hibride con) ADN genómico de centrómero del cromosoma 17 en la muestra. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente al hapteno, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo se una específicamente al hapteno. El anticuerpo puede conjugarse a una enzima (tal como AP o HRP) o, alternativamente, puede ponerse en contacto la muestra con un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo anti-hapteno, en el que el segundo anticuerpo se conjuga a una enzima. La presencia del ADN genómico de centrómero del cromosoma 17 se detecta poniendo en contacto la enzima con una composición de cromógeno y/o sustrato para producir un precipitado coloreado en las proximidades de la sonda de ácido nucleico centromérico del cromosoma 17. En algunos ejemplos, el lector de portaobjetos puntúa el número de copias del gen del ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra contando el número de áreas de precipitado (“manchas”) en los núcleos de las células tumorales.

En un ejemplo particular, el método incluye poner en contacto la muestra con una sonda de ADN centromérico del cromosoma 17 conjugada a digoxigenina (DIG), por ejemplo, en condiciones suficientes para que la sonda de centrómero del cromosoma 17 se una específicamente al ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente a DIG, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-DIG se una específicamente a DIG. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a AP que se une específicamente al anticuerpo anti-DIG, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo anti-DIG. Luego, se pone en contacto la muestra con un fosfato de naftol y Fast Red, produciéndose un precipitado de color rojo que se deposita en los núcleos cerca de la sonda del centrómero del cromosoma 17 (y el ADN de centrómero del cromosoma 17) y puede detectarse visualmente mediante microscopía óptica como manchas de color rojo. En un ejemplo, los reactivos (a excepción de la sonda de centrómero del cromosoma 17) se incluyen en un kit, tal como el kit de detección de DIG para ISH ULTRAVIEW Red (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, número de catálogo 760-505). Un experto en la técnica puede seleccionar reactivos de detección alternativos (tales como haptenos, anticuerpos, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) incluyendo aquellos que producen un precipitado de color diferente para la detección de ADN centromérico del cromosoma 17.

En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 comprende un conjunto de dos o más sondas diana oligonucleotídicas monocatenarias específicas para ADN de HER2. Las sondas oligonucleotídicas pueden ser específicas para una región entre los nucleótidos 35.027.979 y 35.355.516 del cromosoma 17 humano. En algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas de ADN de HER2 (sondas diana)

comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos. La sonda de HER2 oligonucleotídica monocatenaria (sonda oligonucleotídica de HER2) puede ser una sonda genómica sin repeticiones, marcada con dinitrofenilo (DNP), que se dirige específicamente a la región del gen HER2. De manera similar a la sonda de ADN para ISH dual de HER2 INFORM, la sonda oligonucleotídica de HER2 puede abarcar > 327.000 nucleótidos (nt) (35.027.979-35.355.516) de ADN genómico del cromosoma 17 humano, que abarca la región diana de HER2 (UCSC Genome Browser on Human May 2004 (NCBI hg17) Assembly). En algunas realizaciones, las secuencias oligonucleotídicas de HER2 se diseñan a partir de las secuencias en la sonda de ADN para ISH dual de HER2 INFORM. Cada uno de los oligonucleótidos de HER2 puede diseñarse con una longitud de 80 meros; por tanto, el nivel de rigurosidad para la unión no diana puede elevarse hasta un mayor nivel de acuerdo con los criterios de diseño de sonda oligonucleotídica mencionados anteriormente. La especificidad de la sonda oligonucleotídica de HER2 puede validarse experimentalmente en propagaciones en metafase en las condiciones de ensayo de ISH examinadas. Se usaron búsquedas bioinformáticas para identificar secuencias de ácido nucleico específicas para HER2 alrededor de la región diana de HER2. La secuencia de ácido nucleico diana genómica seleccionada se separó en segmentos consecutivos de 80 nt no solapantes. Se sintetizaron mil ciento noventa y seis (1196) oligonucleótidos de 80 meros, que portaban cada uno 5 haptenos de DNP en una fosforamidita abásica con una separación de 20 nt. En este caso se muestra una estructura representativa de estos oligonucleótidos:

5'T[DNP]CTCGTCTCGGCCCGGACCT[DNP]GCGTCCTGGGCCCGCAGGG G[DNP]AGTCCTGCCCCATGCTC-
CCG[DNP]GGCGGGGCCGCCCTGTGCCC [DNP]T-3' (SEQ ID NO: 15).

Los oligonucleótidos se purificaron por afinidad y se analizaron mediante espectrometría de masas y electroforesis en gel. La sonda oligonucleotídica de HER2 se agrupó en un tampón basado en formamida sin ADN de bloqueo humano. En el proceso de examen inicial, se sometieron a prueba funcionalmente el número de oligonucleótidos, el número y la separación de los haptenos de DNP en el tampón basado en formamida sin ADN humano de bloqueo para determinar la sensibilidad y especificidad para el gen HER2. Pueden hallarse detalles adicionales en la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/943.196, titulada OLIGONUCLEOTIDES FOR TISSUE DIAGNOSTICS, presentada el 21 de febrero de 2014.

En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 comprende un conjunto de dos o más sondas de control oligonucleotídicas monocatenarias. Las sondas de control oligonucleotídicas son específicas para dos o más (entre 2 y 14, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ≥ 4, ≥ 6, ≥ 8, etc.) monómeros distintos de la región de control de satélite alfa del cromosoma 17. En algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas del cromosoma 17 (sondas de control) comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos.

En algunas realizaciones, las sondas de control oligonucleotídicas del cromosoma 17 (cada sonda de control) pueden comprender una de las SEQ ID NO: 1-14 (o sus complementos) (véase más adelante en la tabla 1). En algunas realizaciones, las sondas de control (cada sonda de control) pueden comprender una versión truncada de una de las SEQ ID NO: 1-14 (o sus complementos). La versión truncada puede tener al menos 30 pares de bases contiguos de dicha secuencia, al menos 40 pares de bases contiguos de dicha secuencia, o al menos 50 30 pares de bases contiguos de dicha secuencia. En algunas realizaciones, las sondas de control (cada sonda de control) pueden comprender una secuencia que tiene al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 95% de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1-14 (o sus complementos).

Tabla 1 - Sondas oligonucleotídicas monocatenarias para el cromosoma 17

Nombre de oligo	Secuencias	Longitud
SEQ ID. NO. 1	AATTCGTTGAAACGGGATAATTTGAGCTGACTAA ACAGAAGCAGTCTCAGAATCTTCTTTGTGATGTTTG CATTCAAA	79
SEQ ID. NO. 2	CTTCGTTGAAACGGGTATATCTTCACATGCCATCT AGACAGAAGCATCCTCAGAAGCTTCTCTGTGATGA CTGCATTC	79
SEQ ID. NO. 3	TGAACTCTCCTTTTGAGAGCGCAGTTTGGAACTCT CTTTCTGTGGCATCTGCAAGGGGACATGTAGACCT CTTTGAAG	79

ES 2 729 638 T3

SEQ ID. NO. 4	TTTCGTTGGAAACGGAATCATCTTCACATAAAAAC TACACAGATGCATTCTCAGGAACCTTTTGGTGATGT TTGTATTC	79
SEQ ID. NO. 5	CCTATGGTAGTAAAGGGAATAGCTTCATAGAAAAA CTAGACAGAAGCATTCTCAGAAAATACTTTGTGAT GATTGAGTTTAAAC	83
SEQ ID. NO. 6	CACAGAGCTGAACATTCCTTTGGATGGAGCAGGTT TGAGACACTCTTTTGTACAATCTACAAGTGGATAT TTGGACCTCTCTGAGG	87
SEQ ID. NO. 7	GTTTCACATTGCTTTTCATAGAGTAGTTCTGAAACA TGCTTTTCGTAGTGTCTACAAGTGGACATTTGGAG	71
SEQ ID. NO. 8	CCTGTGGTGGAAAACGAATTATCGTCACGTAAAAA CTAGAGAGAAGCATTGTCAGAAA	58
SEQ ID. NO. 9	TGCATTCAACTCACAGAGTTGAAGGTTCTTTTCAA AGAGCAGTTTCCAATCACTCTTTGTGTGG	65
SEQ ID. NO. 10	CATTCCCTTTGACAGAGCAGTTTGGAAACTCTCTTT GTGTAGAATCTGCAAGTGGAGATATGGACCGCTTT	71
SEQ ID. NO. 11	CCTATGGTAGTAAAGGAAATAGCTTCATATAAAAAG CTAGACAGTAGCATTACAGAAAACCTTTGGTGAC GACTGAGTTT	80
SEQ ID. NO. 12	ATTCGTTGGAAACGGGATAAACCGCACAGAACTA AACAGAAGCATTCTCAGAACCCTTTCGTGATGTTT GCATTCAAC	80
SEQ ID. NO. 13	CGTAGTAAAGGAAATAACTTCCTATAAAAAGAAG ACAGAAGCTTTCTCAGAAAATTCTTTGGGATGATT GAGTTGAACTC	80
SEQ ID. NO. 14	ACAGAGCTGAGCATTCTTGCATGATGATGAGTTTA GAAACACACTTTCTGCAGAATCTGCAATTGCATAT TTGGACCTT	80

5 Las sondas oligonucleotídicas de ADN de HER2 (sondas diana) y las sondas oligonucleotídicas de centrómero del cromosoma 17 (sondas de control) pueden lograr una señal enumerable cuando se hibridan con su diana de ADN respectiva. Una señal enumerable tiene una forma generalmente redonda. En algunas realizaciones, una forma redonda es una forma definida por una curva cerrada simple (véase la figura 14) que se ajusta dentro de una primera región. La primera región es un área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo. El círculo concéntrico interno tiene un radio interno (R_{in}) y el círculo concéntrico externo tiene un radio

externo (R_{ext}). R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} , y la curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$.

Las sondas oligonucleotídicas de ADN de HER2 pueden hibridarse en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas, menor de aproximadamente 2 horas, 1 hora o menor de aproximadamente una hora. Las sondas oligonucleotídicas de centrómero del cromosoma 17 pueden hibridarse en condiciones durante un periodo de tiempo menor de horas, menos de aproximadamente 2 horas, 1 hora o menor de aproximadamente una hora. Las sondas oligonucleotídicas de centrómero del cromosoma 17 (sondas de control) pueden lograr al menos dos señales enumerables por célula, por ejemplo, con una intensidad de tinción de ≥ 2 y una cobertura de tinción de $\geq 50\%$ del número de núcleos totales en el plazo de 3 horas de hibridación (o en el plazo de 2 horas de hibridación, o en el plazo de 1 hora de hibridación). En algunas realizaciones, las sondas oligonucleotídicas de centrómero del cromosoma 17 están configuradas para hibridar de manera única y específica con una porción de la región de control del cromosoma 17 humano, de modo que no se marquen de manera evidente otros cromosomas o porciones de los mismos sin la influencia de ADN de bloqueo. En algunas realizaciones, las sondas de control oligonucleotídicas del cromosoma 17 y/o las sondas de oligo de ADN de HER2 comprenden entre 50 y 100 nucleótidos.

Las sondas de control oligonucleotídicas del cromosoma 17 pueden comprender cada una un marcador detectable, por ejemplo, un hapteno (por ejemplo, dinitrofenilo, digoxigenina, biotina o fluoresceína, etc.). Las sondas oligonucleotídicas del cromosoma 17 marcadas pueden detectarse usando cualquier método o reactivo apropiado, por ejemplo, con un anticuerpo secundario dirigido al hapteno y/o con otros componentes y reactivos de detección. Por ejemplo, en un ejemplo particular, el método comprende poner en contacto la muestra con sondas de control oligonucleotídicas del cromosoma 17 conjugadas a digoxigenina (DIG), por ejemplo, en condiciones suficientes para que las sondas de control oligonucleotídicas del cromosoma 17 se unan específicamente a ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo anti-hapteno que se une específicamente a DIG, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo anti-DIG se una específicamente a DIG. Luego se pone en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a HRP que se une específicamente al anticuerpo anti-DIG, por ejemplo, en condiciones suficientes para que el anticuerpo secundario se una específicamente al anticuerpo anti-DIG. Luego se pone en contacto la muestra con un componente de cromógeno, produciéndose un precipitado que se deposita en los núcleos cerca de las sondas de control oligonucleotídicas del cromosoma 17 (y el ADN centromérico del cromosoma 17) y puede detectarse visualmente mediante microscopía óptica. Un experto habitual en la técnica puede seleccionar reactivos de detección apropiados (tales como haptenos, anticuerpos, enzimas, sustratos y/o cromógenos alternativos) que incluyen aquellos que producen un precipitado de color diferente para la detección de ADN centromérico del cromosoma 17.

Los métodos dados a conocer están dirigidos a la detección de múltiples dianas de ácidos nucleicos y proteínas en una muestra individual. Como resultado, la señal detectable para cada miembro del ensayo debe ser distinguible individualmente. Por tanto, en algunos ejemplos, la señal visual generada por el ensayo de detección para cada miembro del ensayo es de un color diferente. En un ejemplo específico, los métodos dan como resultado una tinción de color marrón para la proteína HER2 (por ejemplo, tinción de color marrón en la membrana celular), tinción de color rojo para la proteína ER (por ejemplo, tinción de color rojo en el núcleo) y tinción de color negro para el ADN genómico de HER2 (por ejemplo, manchas negras en el núcleo, tal como manchas negras distinguibles individualmente o agrupaciones de manchas negras). En otro ejemplo específico, los métodos dan como resultado una tinción de color marrón para la proteína HER2, una tinción de color púrpura para la proteína ER y una tinción de color negro para el ADN genómico de HER2. En otro ejemplo específico, los métodos dan como resultado una tinción de color marrón para la proteína HER2, una tinción de color rojo para la proteína ER y una tinción de color negro para el ADN genómico de HER2. Un experto habitual en la técnica puede seleccionar diferentes combinaciones de reactivos de detección para proporcionar tinciones de diferente color para cada una de la proteína HER2, la proteínas ER y el ADN genómico de HER2. En ejemplos adicionales, los métodos dan como resultado además una tinción de color rojo para el ADN centromérico del cromosoma 17 (por ejemplo, manchas de color rojo en el núcleo, tales como manchas de color rojo distinguibles individualmente o agrupaciones de manchas de color rojo). En un ejemplo particular, los métodos dan como resultado una tinción de color marrón de la proteína HER2, una tinción de color púrpura de la proteína ER, una tinción de color negro del ADN genómico de HER2 y una tinción de color rojo del ADN centromérico del cromosoma 17. En algunas realizaciones, se utiliza la tinción de la proteína HER2 con la tinción de DAB (color marrón) porque este es el sistema de detección aceptado actualmente y los patólogos están familiarizados con el mismo. Sin embargo, pueden usarse combinaciones de colores adicionales.

Los métodos dados a conocer en el presente documento también pueden incluir etapas para el pretratamiento de muestras de tejido antes de o entre las etapas que incluyen poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para HER2 y un anticuerpo específico para ER, una sonda de ácido nucleico específica para HER2 y/o una sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17. Un experto en la técnica conoce estas etapas y pueden incluir la desparafinación de una muestra (tal como una muestra de FFPE), el acondicionamiento celular, lavados, etcétera. En el ejemplo 1 se proporciona un protocolo a modo de ejemplo, que incluye tal pretratamiento y otras etapas. Un experto en la técnica puede realizar ajustes a estas condiciones (por ejemplo, ajustes menores en los tiempos y/o las temperaturas de las incubaciones, etapas de lavado, etc.).

Los cromógenos a modo de ejemplo que pueden usarse en los métodos dados a conocer incluyen (pero no se limitan a) los que se muestran en la tabla 2. Aunque no es exhaustiva, la tabla 2 proporciona información sobre las variedades de cromógenos disponibles en la actualidad. Otros cromógenos ilustrativos incluyen los descritos en la publicación de patente estadounidense 2013/0260379 y la solicitud de patente estadounidense provisional n.º 61/831.552, presentada el 5 de junio de 2013.

Tabla 2. Sistemas de cromógeno/sustrato a modo de ejemplo disponibles comercialmente

Abr.	Nombre	Color	Enzima
DAB	3,3'-diamino-bencidina + H ₂ O ₂	negro pardo	peroxidasa
AEC	3-amino-9-etil-carbazol + H ₂ O ₂	rojo	peroxidasa
CN	4-cloro-1-naftol + H ₂ O ₂	azul	peroxidasa
BCIP/NBT	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato + azul de nitrotetrazolio	negro índigo	fosfatasa alcalina
FAST RED	4-cloro-2-metilbencenodiazonio + fosfato de 2,4-dimetilanilida del ácido 3-hidroxi-2-naftoico	rojo	fosfatasa alcalina
FAST BLUE	Sal de disodio de fosfato de naftol AS-MX + hemisal (cloruro de zinc) de sal de Fast Blue BB	azul	fosfatasa alcalina
FUCSINA	Naftol AS-BI + nueva fucsina	rojo	fosfatasa alcalina
NBT	azul de nitrotetrazolio + metosulfato de fenazina	púrpura azulado	deshidrogenasa
ALK GOLD †	Dihidrogenofosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo + Fast Blue BB	dorado amarillento	fosfatasa alcalina
† Publ. de patente internacional n.º WO 2012/024185			

10 En algunas realizaciones, los métodos incluyen determinar si la muestra es positiva o negativa para HER2. En algunos ejemplos, se determina que la muestra es positiva o negativa para la proteína HER2, positiva o negativa para la amplificación del gen HER2, o ambas. Un experto en la técnica puede determinar si una muestra (tal como una muestra de tumor de mama) es positiva o negativa para la proteína HER2 y/o la amplificación del gen HER2. En algunos ejemplos, se puntúa la muestra de manera semicuantitativa para la proteína HER2, tal como 0 (negativa), 1+ (negativa), 2+ (equivoca) o 3+ (positiva). En algunos ejemplos, se puntúa la muestra para la amplificación del gen HER2 según el número de copias del gen HER2, tal como seis o más copias de HER2 (positiva) o menos de seis copias de HER2 (negativa). En otros ejemplos, se puntúa la muestra para la amplificación del gen HER2 en función de la razón del número de copias del gen HER2 con respecto al número de copias del centrómero del cromosoma 17, tal como HER2/CEN17 < 1.8 (negativa), 1,8 ≥ HER2/CEN17 ≤ 2,2 (equivoca), HER2/CEN17 > 2,2 (positiva). Se encuentran disponibles directrices de prueba de HER2 adicionales e incluyen las que se describen en Wolff *et al.*, J. Clin. Oncol., doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984. La figura 16 muestra ejemplos de puntuación para la proteína HER2.

25 En algunas realizaciones, los métodos también incluyen determinar si la muestra es positiva o negativa para la proteína ER. Un experto en la técnica puede determinar si una muestra (tal como una muestra de tumor de mama) es positiva o negativa para la proteína ER. En algunos ejemplos, se determina que una muestra es positiva para ER si hay tinción de proteína ER en el núcleo ≥ 1% de las células tumorales en la muestra y se determina que es negativa para ER si hay tinción de proteína ER en el núcleo < 1% de las células tumorales en la muestra. En ejemplos adicionales, se determina que una muestra tiene una baja expresión de ER si la tinción de ER se detecta en el 1-10% de las células tumorales en la muestra y se determina que tiene una alta expresión de ER si se detecta una tinción de ER en > 10% de las células tumorales en la muestra.

35 Los métodos dados a conocer pueden automatizarse (por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 1). Están disponibles comercialmente sistemas para IHC y/o ISH automatizados, tales como el sistema de tinción de portaobjetos BENCHMARK ULTRA, el sistema de tinción de portaobjetos BENCHMARK XT y el sistema de tinción de portaobjetos DISCOVERY XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), los sistemas de tinción de portaobjetos BOND-MAX y BOND-III (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) y el sistema de tinción de portaobjetos IQ Kinetic (Biocare Medical, Concord, CA). Ventana Medical Systems, Inc. es el cesionario de varias patentes estadounidenses que dan a conocer sistemas y métodos para realizar análisis automatizados, incluidas las patentes estadounidenses n.ºs 5.650.327; 5.654.200; 6.296.809; 6.352.861; 6.582.962; 6.827.901 y 6.943.029.

III. Muestras

45 Las muestras a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, frotis de sangre, preparaciones de citocentrífuga, frotis de citología, biopsias con aguja gruesa y/o aspirados con aguja fina. En algunos ejemplos, las muestras incluyen secciones de tejido (por ejemplo, secciones de tejido de crióstato y/o secciones de tejido incluidas en parafina). En realizaciones particulares, las muestras incluyen células tumorales, tales como células tumorales de mama o células tumorales de ovario. Se conocen en la técnica métodos para obtener una muestra biológica de un sujeto. Por

ejemplo, los métodos de obtención de tejido de mama o células de mama son rutinarios. Pueden aislarse muestras biológicas a modo de ejemplo de células o tejidos normales, o de células o tejidos neoplásicos. En ejemplos particulares, una muestra biológica incluye una muestra de tumor, tal como una muestra de tumor de mama.

- 5 Por ejemplo, una muestra de un tumor de mama que contiene material celular puede obtenerse mediante extirpación quirúrgica de la totalidad o parte del tumor, recogiendo un aspirado con aguja fina del tumor, así como otros métodos conocidos en la técnica. En ejemplos particulares, se aplica una muestra de tejido o células a un sustrato y se analiza para detectar proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2. Un soporte sólido puede contener la muestra biológica y permitir la detección conveniente de componentes (por ejemplo, proteínas y/o moléculas de
- 10 ácido nucleico) en la muestra. Los soportes a modo de ejemplo incluyen portaobjetos de microscopio (por ejemplo, portaobjetos de microscopio de vidrio o portaobjetos de microscopio de plástico), cubreobjetos (por ejemplo, cubreobjetos de vidrio o cubreobjetos de plástico), placas de cultivo tisular, placas de múltiples pocillos, membranas (por ejemplo, de nitrocelulosa o poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF)) o chips BIACORE™.
- 15 Las muestras descritas en el presente documento pueden prepararse usando cualquier método conocido ahora o desarrollado más adelante en la técnica. Generalmente, las muestras de tejido se preparan fijando e incluyendo el tejido en un medio. En otros ejemplos, las muestras incluyen una suspensión celular que se prepara como monocapa sobre un soporte sólido (tal como un portaobjetos de vidrio), por ejemplo, extendiendo o centrifugando las células sobre el soporte sólido. En ejemplos adicionales, pueden usarse secciones de tejido fresco congelado (por
- 20 ejemplo, sin fijar) en los métodos dados a conocer en el presente documento.

El proceso de fijación de una muestra puede variar. La fijación de una muestra de tejido conserva las células y los constituyentes del tejido en un estado lo más parecido posible a la vida y permite que se sometan a procedimientos preparativos sin cambios significativos. La fijación detiene los procesos de autólisis y descomposición bacteriana que

25 comienzan con la muerte celular y estabiliza los componentes celulares y tisulares para que resistan las etapas posteriores del procesamiento del tejido, tales como ISH o IHC.

Los tejidos pueden fijarse mediante cualquier proceso adecuado, incluida la perfusión o la inmersión en un fijador. Los fijadores pueden clasificarse como agentes de reticulación (tales como los aldehídos, por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído, así como agentes de reticulación distintos de aldehído), agentes oxidantes (por

30 ejemplo, iones y complejos metálicos, tales como el tetróxido de osmio y el ácido crómico), agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, ácido acético, metanol y etanol), fijadores de mecanismo desconocido (por ejemplo, cloruro mercurico, acetona y ácido pícrico), reactivos de combinación (por ejemplo, fijador de Carnoy, Methacam, líquido de Bouin, fijador B5, líquido de Rossman y líquido de Gendre), microondas y fijadores variados (por ejemplo, excluida la fijación de volumen y la fijación con vapor). También pueden incluirse aditivos en el fijador,

35 tal como tampones, detergentes, ácido tánico, fenol, sales de metal (tal como cloruro de zinc, sulfato de zinc y sales de litio) y lantano.

El fijador más usado en la preparación de muestras es el formaldehído, generalmente en forma de una disolución de formalina (formaldehído al 4% en una disolución tampón, denominada formalina tamponada al 10%). En un ejemplo, el fijador es formalina tamponada neutra al 10%.

40

En algunos ejemplos se usa un medio de incrustación. Un medio de incrustación es un material inerte en el que se incrustan tejidos y/o células para ayudar a preservarlos para análisis futuros. La incrustación también permite cortar

45 muestras de tejido en secciones delgadas. Los medios de incrustación incluyen parafina, celoidina, compuesto OCT™, agar, plástico o material acrílico. Muchos medios de incrustación son hidrófobos; por tanto, puede ser necesario tener que retirar el material inerte antes del análisis histológico o citológico, que utiliza principalmente reactivos hidrófilos. El término desparafinación o desparafinado se usa ampliamente en el presente documento para referirse a la retirada parcial o completa de cualquier tipo de medio de incrustación de una muestra biológica. Por

50 ejemplo, las secciones de tejido incrustadas en parafina se desparafinan mediante su paso a través de disolventes orgánicos, tales como tolueno, xileno, limoneno u otros disolventes adecuados.

IV. Métodos de tratamiento

55 Los métodos dados a conocer pueden incluir además seleccionar y/o administrar un tratamiento al sujeto. En algunos ejemplos, se selecciona y administra un tratamiento basándose en el estado de HER2 y/o ER del tumor del sujeto. Por ejemplo, a un sujeto con un tumor positivo para ER/negativo para HER2 se le administran uno o más agentes terapéuticos antiestrogénicos, tales como tamoxifeno, letrozol, toremifeno, fulvestrant, anastrozol y/o exemestano. A un sujeto con un tumor positivo para HER2/negativo para ER se le administran una o más terapias dirigidas a HER2, tales como trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y/o trastuzumab emtansina. A un sujeto con un

60 tumor positivo para HER2/positivo para ER se le administran una o más terapias antiestrogénicas y una o más terapias dirigidas a HER2. En un ejemplo, a un sujeto con un tumor positivo para HER2/positivo para ER se le administran trastuzumab y letrozol; trastuzumab y anastrozol; o trastuzumab, lapatinib y letrozol. En ejemplos adicionales, a los sujetos también se les administra quimioterapia neoadyuvante, independientemente del estado de

65 ER o HER2. Por ejemplo, los sujetos pueden tratarse con taxanos (tales como paclitaxel o docetaxel), antraciclina (tales como daunorubicina, doxorubicina, epirubicina o mitoxantrona), ciclofosfamida, capecitabina, 5-fluorouracilo,

metotrexato, o combinaciones de los mismos. Un experto en la técnica puede seleccionar regímenes terapéuticos apropiados para un sujeto basándose en el estado de HER2 y ER del sujeto, y la edad, el estado, historial de tratamiento previo del sujeto y otros factores.

- 5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características específicas para las realizaciones de trabajo y los protocolos generales. El alcance de la presente divulgación no se limita a aquellas características ejemplificadas mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

10 Ensayo de gen-proteína HER2 y ER

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

15 Se desarrolló un ensayo múltiplex para la detección de las proteínas HER2 y ER y el número de copias del gen HER2 en una muestra individual. En primer lugar, se detectó la proteína HER2 mediante IHC usando el anticuerpo monoclonal de conejo PATHWAY anti-HER2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección de iVIEW-DAB (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A continuación se detectó la proteína ER mediante IHC
20 usando el anticuerpo monoclonal de conejo CONFIRM anti-receptor de estrógenos (SP1) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección de color rojo de fosfatasa alcalina ULTRA VIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Finalmente, se detectó el ADN genómico de HER2 con ISH usando una sonda HER2 marcada con DNP y se detectó con la detección de DNP para SISH ULTRAVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Se realizaron todas las etapas con un instrumento de tinción para IHC/ISH automatizado BENCHMARK XT (Ventana
25 Medical Systems, Tucson, AZ, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS) con NexES V10.6 de la siguiente manera:

(1) Cocción: 60°C durante 4 minutos, enjuague;

30 (2) Se realizó desparafinación para retirar la cera para la penetración de reactivos usando EZ Prep (n.º de catálogo VMSI: 950-102): 2x8 minutos a 72°C, enjuague;

(3) Se realizó acondicionamiento celular usando CC1 (n.º de catálogo VMSI: 950-124) 2x16 minutos y 1x8 minutos a 95°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;

35 (4) Tratar con inhibidor IVIEW (n.º de catálogo VMSI: 253-2187) durante 4 minutos a 37°C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;

(5) Aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo PATHWAY anti-HER2/neu 4B5 (n.º de catálogo VMSI 790-2991), incubado durante 32 minutos a 37°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;

40 (6) Detección con el sistema de detección de IVIEW-DAB: bloqueador de biotina A (n.º de catálogo VMSI 253-2030) durante 4 minutos a 37°C, enjuague, bloqueador de biotina B (n.º de catálogo VMSI 253-2031) durante 4 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-Ig de biotina (n.º de catálogo VMSI 253-2188) durante 8 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-SA-HRP (n.º de catálogo VMSI 253-2189) durante 8 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-DAB (n.º de catálogo VMSI 253-2190) e IVIEW-peróxido de hidrógeno (n.º de catálogo VMSI 253-2191) durante 8 minutos a 37°C, enjuague e IVIEW-cobre (n.º de catálogo VMSI 253-2192) durante 4 minutos a 37°C, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);

50 (7) Opcional: se aplicó tampón de reacción y se incubó la muestra a 95°C durante 8 minutos, se incubó durante 4 minutos sin calentar, se enjuague con tampón de reacción;

(8) Aplicación del anticuerpo primario: anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º de catálogo VMSI 790-4324), incubado durante 16 minutos a 37°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;

55 (9) Se realizó detección con el sistema de detección de color rojo de fosfatasa alcalina universal ULTRAVIEW: múltiplex de fosfatasa alcalina universal de color rojo ULTRAVIEW (n.º de catálogo VMSI 253-4327) durante 16 minutos a 37°C, enjuague, intensificador ULTRAVIEW Red (n.º de catálogo VMSI 253-4326) durante 4 minutos a 37°C, ULTRAVIEW-naftol rojo (n.º de catálogo VMSI 253-4328) durante 4 minutos a 37°C, ULTRAVIEW-Fast Red A (n.º de catálogo VMSI 253-429) y ULTRAVIEW-Fast Red B (n.º de catálogo VMSI 253-4330) durante 16 minutos a 37°C, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);

60 (10) Aplicar 900 µl de tampón de enjuague, 4 minutos a 37°C, acondicionamiento celular: acondicionador celular 2 (n.º de catálogo VMSI 950-123) durante 3 ciclos de 8 minutos a 90°C, enjuague;

65 (11) Tratamiento con proteasa: proteasa para ISH 2 (n.º de catálogo VMSI 780-4148) durante 12 minutos a 37°C, enjuague;

(12) Clarificación: disolución HybClear (n.º de catálogo VMSI 780-4572) durante 4 minutos a 52°C;

5 (13) Sonda: sonda de DNP para HER2 (n.º de catálogo VMSI 780-4422) durante 4 minutos a 52°C, 4 minutos a 80°C y 6 horas a 44°C, enjuague;

(14) Lavado riguroso con tampón de enjuague 4x8 minutos a 72°C, enjuague

10 (15) Detección con el sistema de detección de DNP para SISH ULTRAVIEW: anticuerpo anti-DNP para ISH con plata (n.º de catálogo VMSI 253-4414) durante 20 minutos a 37°C, enjuague, DNP-HRP para ISH con plata (n.º de catálogo VMSI 253-4413) durante 24 minutos a 37°C, enjuague, cromógeno de DNP para ISH con plata A (n.º de catálogo VMSI 253-4410) durante 4 minutos a temperatura ambiente, enjuague, cromógeno de DNP para ISH con plata A durante 4 minutos a temperatura ambiente, cromógeno de DNP para ISH con plata B (n.º de catálogo VMSI 253-4411) durante 4 minutos a temperatura ambiente y cromógeno de DNP para ISH con plata C (n.º de catálogo VMSI 253-4412) durante 8 minutos a temperatura ambiente, enjuague;

(16) Contratinción y contratinción posterior: hematoxilina de Mayer (42 Lifesciences).

20 El protocolo de tinción da como resultado la tinción de color marrón de la proteína HER2, la tinción de color rojo de la proteína ER y la tinción de color negro del ADN genómico de HER2. Se proporcionan muestras representativas de tumores de mama que muestran una muestra que presenta amplificación del gen HER2, son positivas para la proteína HER2 y positivas para la proteína ER (figuras 1A y 1B), una muestra con amplificación del gen HER2, negativa para la proteína HER2 y positiva para la proteína ER (figuras 2A y 2B), y se proporciona una muestra con amplificación del gen HER2, positiva para la proteína HER2 y negativa para la proteína ER (figuras 3A y 3B). Dentro de la muestra se observó heterogeneidad. Por ejemplo, incluso en la muestra positiva para la proteína HER2 (figura 1), algunas células presentaban amplificación del gen HER2 y eran positivas para la proteína ER, pero carecían de la proteína HER2 (células rodeadas por un círculo en la figura 1B).

30 Ejemplo 2

Comparación de métodos de detección y uso de Ki67

Este ejemplo describe la comparación de métodos de detección para IHC de proteína ER y también la comparación de IHC de ER con IHC de Ki67.

35 Se sometió a prueba la tinción para IHC de proteína ER con los reactivos iVIEW-DAB o los reactivos ULTRA VIEW Red en muestras de tumores de mama (figuras 4A y 4B) y se comparó con el IHC/ISH de HER2 teñido con ULTRAVIEW Red (figura 4C). Se seleccionó la tinción con ULTRAVIEW Red (figura 4C) para su inclusión en el ensayo (tal como se describe en el ejemplo 1). Se realizaron experimentos similares usando IHC de proteína Ki67 en lugar de IHC de ER (figuras 5A-5C). La figura 6 muestra una muestra teñida para el gen HER2, la proteína HER2 y la proteína Ki67. En las figuras 7A-7D, se muestra un ejemplo de la tinción de gen y proteína HER2 con IHC de Ki67 o ER en una muestra positiva para HER2. En las figuras 8 y 9, se muestra un ejemplo de la tinción de gen y proteína HER2 con IHC de Ki67 o ER en un caso equívoco para HER2, respectivamente.

45 Ejemplo 3

Ensayo cuádruplex de gen-proteína HER2 y ER

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

Se desarrolló un ensayo múltiple para la detección de las proteínas HER2 y ER, el número de copias del gen HER2 y el número de copias del gen del ADN centromérico del cromosoma 17 en una muestra individual. En primer lugar, se detectó la proteína HER2 mediante IHC usando el anticuerpo monoclonal de conejo PATHWAY anti-HER2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección de iVIEW-DAB (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A continuación se detectó la proteína ER mediante IHC usando el anticuerpo monoclonal de conejo CONFIRM anti-receptor de estrógenos (SP1) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección de Discovery Purple o detección de fosfatasa alcalina de color rojo (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Finalmente, se detectaron el ADN genómico del ácido nucleico de HER2 y el ADN centromérico del cromosoma 17 con ISH dual usando una sonda de HER2 marcada con DNP detectada con detección de DNP para SISH ULTRAVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y una sonda de centrómero del cromosoma 17 marcada con DIG detectada con HRP-Green (42 Lifesciences). Se realizaron todas las etapas con un instrumento de tinción para IHC/ISH automatizado BENCHMARK XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS) con NexES V10.6 de la siguiente manera:

65 (1) Cocción: 60°C durante 4 minutos, enjuague;

ES 2 729 638 T3

- (2) Se realizó desparafinación para retirar la cera para la penetración de reactivos usando EZ Prep (n.º de catálogo VMSI: 950-102): 2x8 minutos a 72°C, enjuague;
- 5 (3) Se realizó acondicionamiento celular usando CC1 (n.º de catálogo VMSI: 950-124) 2x16 minutos y 1x8 minutos a 95°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;
- (4) Tratar con inhibidor IVIEW (n.º de catálogo VMSI: 253-2187) durante 4 minutos a 37°C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;
- 10 (5) Aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo PATHWAY anti-HER2/neu 4B5 (n.º de catálogo VMSI 790-2991), incubado durante 32 minutos a 37°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;
- (6) Detección con el sistema de detección de IVIEW-DAB: bloqueador de biotina A (n.º de catálogo VMSI 253-2030) durante 4 minutos a 37°C, enjuague, bloqueador de biotina B (n.º de catálogo VMSI 253-2031) durante 4 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-Ig de biotina (n.º de catálogo VMSI 253-2188) durante 8 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-SA-HRP (n.º de catálogo VMSI 253-2189) durante 8 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-DAB (n.º de catálogo VMSI 253-2190) e IVIEW-peróxido de hidrógeno (n.º de catálogo VMSI 253-2191) durante 8 minutos a 37°C, enjuague e IVIEW-cobre (n.º de catálogo VMSI 253-2192) durante 4 minutos a 37°C, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 15 (7) Opcional: se aplicó tampón de reacción y se incubó la muestra a 95°C durante 8 minutos, se incubó durante 4 minutos sin calentar, se enjuagó con tampón de reacción;
- 20 (8) Aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º de catálogo VMSI 790-4324), incubado durante 16 minutos a 37°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;
- 25 (9) Se realizó detección con el sistema de detección de color rojo de fosfatasa alcalina universal ULTRAVIEW: multímero de fosfatasa alcalina universal de color rojo ULTRAVIEW (n.º de catálogo VMSI 253-4327) durante 16 minutos a 37°C, enjuague, intensificador ULTRAVIEW Red (n.º de catálogo VMSI 253-4326) durante 4 minutos a 37°C, ULTRAVIEW-naftol rojo (n.º de catálogo VMSI 253-4328) durante 4 minutos a 37°C, ULTRAVIEW-Fast Red A (n.º de catálogo VMSI 253-429) y ULTRAVIEW-Fast Red B (n.º de catálogo VMSI 253-4330) durante 16 minutos a 37°C, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 30 (10) Aplicar 900 µl de tampón de enjuague, 4 minutos a 37°C, acondicionamiento celular: acondicionador celular 2 (n.º de catálogo VMSI 950-123) durante 3 ciclos de 8 minutos a 90°C, enjuague;
- 35 (11) Tratamiento con proteasa: proteasa para ISH 2 (n.º de catálogo VMSI 780-4148) durante 8 minutos a 37°C, enjuague;
- (12) Clarificación: disolución HybClear (n.º de catálogo VMSI 780-4572) durante 4 minutos a 52°C;
- 40 (13) Sonda: cóctel de sondas de HER2-DNP y cr.17-DIG (n.º de catálogo VMSI 780-4422) durante 4 minutos a 52°C, 4 minutos a 80°C y 6 horas a 44°C, enjuague;
- 45 (14) Lavado riguroso con tampón de enjuague 4x8 minutos a 72°C, enjuague
- 50 (15) Detección de HER2 con el sistema de detección de DNP para SISH ULTRAVIEW: anticuerpo anti-DNP para ISH con plata (n.º de catálogo VMSI 253-4414) durante 20 minutos a 37°C, enjuague, DNP-HRP para ISH con plata (n.º de catálogo VMSI 253-4413) durante 24 minutos a 37°C, enjuague, cromógeno de DNP para ISH con plata A (n.º de catálogo VMSI 253-4410) durante 4 minutos a temperatura ambiente, enjuague, cromógeno de DNP para ISH con plata A durante 4 minutos a temperatura ambiente, cromógeno de DNP para ISH con plata B (n.º de catálogo VMSI 253-4411) durante 4 minutos a temperatura ambiente y cromógeno de DNP para ISH con plata C (n.º de catálogo VMSI 253-4412) durante 8 minutos a temperatura ambiente, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);
- 55 (16) Detección de señal de ISH de cr. 17: incubar con el anticuerpo anti-DIG de ratón UltraView Red-DIG del kit de detección (n.º de catálogo VMSI 760-505) seguido por anticuerpo anti-Ms-HRP UltraMap (n.º de catálogo VMSI 760-4313). Detección de color verde con HRP-Green (42 Lifesciences, Alemania).
- 60 (17) Contratinción y contratinción posterior: hematoxilina de Mayer (42 Lifesciences).
- 65

Ejemplo 4Ensayo cuádruplex de gen-proteína HER2 y ER usando sondas de oligo de HER2

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

10 Se detecta la proteína HER2 mediante IHC usando el anticuerpo monoclonal de conejo PATHWAY anti-HER2/neu (4B5) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección de iVIEW-DAB (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A continuación se detecta la proteína ER se detecta mediante IHC usando el anticuerpo monoclonal de conejo CONFIRM anti-receptor de estrógenos (SP1) (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) con detección de Discovery Purple o detección de rojo de fosfatasa alcalina (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Luego se detectan el ADN genómico de ácido nucleico de HER2 y el ADN centromérico del cromosoma 17 con ISH dual usando un conjunto de sondas de oligo específicas para ADN de HER2 marcado con DNP y una serie de sondas de oligo específicas para centrómero del cromosoma 17 marcado con DNP. Se detectan las sondas de oligo de HER2 con la detección de DNP para SISH ULTRAVIEW (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), y se detectan las sondas para el cromosoma 17 con la detección de DIG para ISH ULTRAVIEW Red (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Se realizan todas las etapas con un instrumento de tinción para IHC/ISH automatizado BENCHMARK XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS) con NexES V10.6 de la siguiente manera:

20 (1) Cocción: 60°C durante 4 minutos, enjuague;

(2) Se realizó desparafinación para retirar la cera para la penetración de reactivos usando EZ Prep (n.º de catálogo VMSI: 950-102): 2x8 minutos a 72°C, enjuague;

25 (3) Se realizó acondicionamiento celular usando CC1 (n.º de catálogo VMSI: 950-124) 2x16 minutos y 1x8 minutos a 95°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;

30 (4) Tratar con inhibidor IVIEW (n.º de catálogo VMSI: 253-2187) durante 4 minutos a 37°C, enjuagar el portaobjetos con tampón de reacción;

(5) Aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo PATHWAY anti-HER2/neu 4B5 (n.º de catálogo VMSI 790-2991), incubado durante 32 minutos a 37°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;

35 (6) Detección con el sistema de detección de IVIEW-DAB: bloqueador de biotina A (n.º de catálogo VMSI 253-2030) durante 4 minutos a 37°C, enjuague, bloqueador de biotina B (n.º de catálogo VMSI 253-2031) durante 4 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-Ig de biotina (n.º de catálogo VMSI 253-2188) durante 8 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-SA-HRP (n.º de catálogo VMSI 253-2189) durante 8 minutos a 37°C, enjuague, IVIEW-DAB (n.º de catálogo VMSI 253-2190) e IVIEW-peróxido de hidrógeno (n.º de catálogo VMSI 253-2191) durante 8 minutos a 37°C, enjuague e IVIEW-cobre (n.º de catálogo VMSI 253-2192) durante 4 minutos a 37°C, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);

40 (7) Opcional: se aplicó tampón de reacción y se incubó la muestra a 95°C durante 8 minutos, se incubó durante 4 minutos sin calentar, se enjuagó con tampón de reacción;

45 (8) Aplicación de anticuerpo primario: anticuerpo CONFIRM anti-ER (SP1) (n.º de catálogo VMSI 790-4324), incubado durante 16 minutos a 37°C, enjuague del portaobjetos con tampón de reacción;

50 (9) Se realizó detección con el sistema de detección de color rojo de fosfatasa alcalina universal ULTRAVIEW: múltiplo de fosfatasa alcalina universal de color rojo ULTRAVIEW (n.º de catálogo VMSI 253-4327) durante 16 minutos a 37°C, enjuague, intensificador ULTRAVIEW Red (n.º de catálogo VMSI 253-4326) durante 4 minutos a 37°C, ULTRAVIEW-naftol rojo (n.º de catálogo VMSI 253-4328) durante 4 minutos a 37°C, ULTRAVIEW Fast Red A (n.º de catálogo VMSI 253-429) y ULTRAVIEW Fast Red B (n.º de catálogo VMSI 253-4330) durante 16 minutos a 37°C, enjuague (todos los enjuagues con tampón de reacción);

55 (10) Aplicar 900 µl de tampón de enjuague, 4 minutos a 37°C, acondicionamiento celular: acondicionador celular 2 (n.º de catálogo VMSI 950-123) durante 3 ciclos de 8 minutos a 90°C, enjuague;

60 (11) Tratamiento con proteasa: proteasa para ISH 3 (n.º de catálogo VMSI 780-4149) durante 20 minutos a 37°C.

(12) Prehibridación: disolución HybReady (n.º de catálogo VMSI 780-4409) durante 4 minutos a 50°C.

65 (13) Sonda: sondas de oligo de DNP de HER2 y sondas de oligo de cr. 17-DIG (VMSI) durante 4 minutos a 50°C.

(14) Desnaturalización: calentar durante 8 minutos a 80°C.

(15) Hibridación: incubar durante 1 hora a 44°C.

(16) Primer lavado riguroso: tres ciclos con SSC 2X de 8 minutos a 68°C.

(17) Detección de señal de ISH de HER2: kit de detección de DNP para SISH UltraView (n.º de catálogo VMSI 760-098).

(18) Segundo lavado riguroso: tres ciclos con SSC 2X de 8 minutos a 76°C.

(19) Detección de señal de ISH de cr. 17: incubar con el anticuerpo anti-DIG de ratón UltraView Red-DIG del kit de detección (n.º de catálogo VMSI 760-505) seguido por anticuerpo anti-Ms-HRP UltraMap (n.º de catálogo VMSI 760-4313). Detección de color verde con HRP-Green (42 Lifesciences, Alemania).

(20) Compensación: hematoxilina de Mayer (42 Lifesciences).

El protocolo de tinción da como resultado la tinción de color marrón de la proteína HER2, la tinción de color púrpura de la proteína ER, la tinción de color negro del ADN genómico de HER2 y la tinción azul verdosa del ADN centromérico del cromosoma 17. En las figuras 10A y 10B, se presenta una muestra representativa, que presenta amplificación del gen HER2, es positiva para la proteína HER2 y positiva para la proteína ER. En las figuras 11A y 11B, se presenta una muestra considerada negativa para HER2 (proteína y gen) y positiva para ER.

En vista de las muchas realizaciones posibles a las que pueden aplicarse los principios de la divulgación, debe reconocerse que las realizaciones ilustradas son solo ejemplos y no deben tomarse como limitativas del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención está definido por las siguientes reivindicaciones. Por tanto, se reivindica como la presente invención todo lo que se encuentra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

Lista de secuencias

<110> VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.

<120> ENSAYOS MÚLTIPLEX DE TINCIÓN CONJUNTA DE RECEPTORES DE HER2 Y DE ESTRÓGENOS PARA DETECTAR HETEROGENEIDAD TUMORAL

<130> P31858-WO

<150> Documento US61/889862

<151> 11-10-2013

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 79

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

aattcgttgg aaacgggata atttcagctg actaaacaga agcagttctca gaatcttctt 60

tgtgatgttt gcattcaaa 79

<210> 2

<211> 79

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

cttcggtoga aacgggtata tcttcacatg ccatctagac agaagcatcc tcagaagctt 60

ctctgtgatg actgcattc 79

ES 2 729 638 T3

<210> 3
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 3
 tgaactctcc ttttgagagc gcagttttga aactctcttt ctgtggcatc tgcaagggga 60
 catgtagacc tctttgaag 79
 10 <210> 4
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 4
 tttcgttgga aacggaatca ttttcacata aaaactacac agatgcattc tcaggaactt 60
 tttggtgatg tttgtattc 79
 <210> 5
 20 <211> 83
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 25 cctatggtag taaaggaat agcttcatag aaaaactaga cagaagcatt ctcagaaaat 60
 actttgtgat gattgagttt aac 83
 <210> 6
 <211> 87
 30 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 cacagagctg aacattcctt tggatggagc aggtttgaga cactcttttt gtacaatcta 60
 35 caagtggata tttggacctc tctgagg 87
 <210> 7
 <211> 71
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7
 gtttcacatt gcttttcata gagtagttct gaaacatgct tttcgtagtg tctacaagtg 60
 gacatttggg g 71
 45 <210> 8
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 8
 cctgtgtgg aaaacgaatt atgctcacgt aaaaactaga gagaagcatt gtcagaaa 58
 55 <210> 9
 <211> 65
 <212> ADN

ES 2 729 638 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

1 tgcattcaac tcacagagtt gaaggttcct tttcaaagag cagtttccaa tcactctttg 60

5 tgtgg 65

<210> 10
<211> 71
<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

11 cattcccttt gacagagcag tttggaaact ctctttgtgt agaatctgca agtggagata 60

15 tggaccgctt t 71

<210> 11
<211> 80
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 11

11 cctatggtag taaaggaaat agcttcatat aaaagctaga cagtagcatt cacagaaaac 60

11 tcttggtgac gactgagttt 80

25 <210> 12
<211> 80
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 12

11 atttcgttgg aaacgggata aaccgcacag aactaaacag aagcattctc agaaccttct 60

11 tcgtgatggt tgcattcaac 80

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

35 <400> 13

40 cgtagtaaag gaaataactt cctataaaaa gaagacagaa gctttctcag aaaattcttt 60

11 gggatgattg agttgaactc 80

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

45 <400> 14

11 acagagctga gcattccttg cgatgtagca gtttagaaac acactttctg cagaatctgc 60

50 aattgcatat ttggacctt 79

REIVINDICACIONES

1. Método múltiplex para detectar conjuntamente proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína receptora de estrógenos (ER) y ADN genómico de HER2 en una muestra en un portaobjetos individual, comprendiendo dicho método:
 - poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con un cromógeno;
 - poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con un cromógeno; y
 - poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y teñir el ADN genómico de HER2 con un cromógeno;
 - en el que las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el cromógeno se realizan antes de la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2,
 - en el que el cromógeno usado para la proteína HER2 permite que cada uno de los otros cromógenos sea visible, el cromógeno usado para la proteína ER permite que cada uno de los otros cromógenos sea visible, y el cromógeno usado para el ADN de HER2 permite que cada uno de los otros cromógenos sea visible
 - en el que la detección conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2 es sobre o en células individuales presentes en una población de células, permitiendo así la detección de heterogeneidad tumoral.
2. Método según la reivindicación 1,
 - a) en el que la muestra comprende una muestra de tejido de mama;
 - b) en el que la muestra de tejido de mama comprende células tumorales de mama;
 - c) en el que la muestra de tejido de mama es una muestra de tejido fresco, una muestra de tejido congelado o una muestra de tejido fijado;
 - d) que comprende además visualizar los cromógenos usando microscopía de campo brillante;
 - e) en el que método se automatiza
 - f) en el que la muestra se somete a un tratamiento con proteasa después de las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el cromógeno, pero antes de la etapa de poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2, en el que el tratamiento con proteasa es eficaz para permitir la hibridación de la sonda de ácido nucleico con su diana de ADN respectiva, particularmente en el que la muestra se somete a un tratamiento térmico después de las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el cromógeno, pero antes del tratamiento con proteasa, y/o particularmente en el que la proteasa comprende proteinasa K, pepsina, colagenasa, dispasa, o una combinación de las mismas, y/o en el que el tratamiento con proteasa no elimina los colores resultantes de los cromógenos para la proteína HER2 y la proteína ER, y la morfología del tejido se mantiene suficientemente como para permitir la detección de dichos colores;
 - g) en el que el cromógeno usado para la proteína HER2 comprende 3,3'-diaminobencidina (DAB);
 - h) en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 comprende un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína HER2, particularmente en el que el anticuerpo monoclonal específico para proteína HER2 comprende un anticuerpo monoclonal de conejo, especialmente en el que el anticuerpo monoclonal de conejo es un anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 4B5;
 - i) en el que teñir la proteína HER2 comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para HER2,

- particularmente en el que el anticuerpo secundario marcado de manera detectable comprende un anticuerpo secundario biotilado, especialmente en el que teñir la proteína HER2 en la muestra comprende además poner en contacto la muestra con estreptavidina conjugada a una enzima, un sustrato para la enzima y el cromógeno para producir un precipitado coloreado, particularmente en el que la enzima comprende peroxidasa del rábano picante, el sustrato comprende peróxido de hidrógeno y el cromógeno comprende 3,3'-diaminobencidina (DAB);
- 5 j) en el que el cromógeno para la proteína ER comprende Fast Red;
- 10 k) en el que el anticuerpo específico para ER comprende un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína ER, particularmente en el que el anticuerpo monoclonal específico para ER comprende un anticuerpo monoclonal de conejo, especialmente en el que el anticuerpo monoclonal de conejo es un anticuerpo monoclonal de conejo anti-ER SP1;
- 15 l) en el que teñir la proteína ER comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para ER, particularmente en el que el anticuerpo secundario marcado de manera detectable comprende un anticuerpo secundario conjugado a una enzima, especialmente en el que detectar la proteína ER en la muestra comprende además poner en contacto la muestra con un sustrato para la enzima y el cromógeno para producir un precipitado coloreado, particularmente en el que la enzima comprende fosfatasa alcalina, el sustrato comprende naftol, y el segundo cromógeno comprende Fast Red;
- 20 m) en el que el cromógeno para el ADN de HER2 comprende acetato de plata;
- 25 n) en el que la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 comprende un conjunto de dos o más sondas diana oligonucleotídicas monocatenarias específicas para ADN de HER2, particularmente en el que el conjunto de dos o más sondas diana oligonucleotídicas monocatenarias es específico para una región entre los nucleótidos 35.027.979 y 35.355.516 del cromosoma 17 humano, o particularmente en el que las sondas diana pueden lograr una señal enumerable cuando se hibridan con ADN de HER2,
- 30 especialmente en el que cada señal enumerable tiene una forma generalmente redonda, una forma redonda es una forma definida por una curva cerrada simple que se ajusta dentro de una primera región, la primera región es un área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo, teniendo el círculo concéntrico interno un radio interno (R_{in}) y teniendo el círculo concéntrico externo un radio externo (R_{ext}) en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} , y la curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$, y/o particularmente en el que las sondas diana comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos;
- 35 o) en el que la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 comprende un marcador detectable, particularmente en el que el marcador detectable es un hapteno, especialmente en el que el hapteno comprende dinitrofenilo, digoxigenina, biotina o fluoresceína, y/o particularmente en el que detectar el ADN genómico de HER2 en la muestra comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente al marcador detectable, especialmente que comprende además poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario, en particular en el que el anticuerpo secundario se conjuga a una enzima, opcionalmente que comprende además poner en contacto la muestra con un sustrato para la enzima y un metal, por ejemplo, en el que la enzima es peroxidasa del rábano picante, el sustrato es peróxido de hidrógeno y el metal es acetato de plata; y/o
- 40 p) en el que la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 comprende hibridar la sonda en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas.
- 50 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 (CHR17) y teñir el centrómero CHR17 con un cromógeno.
- 55 4. Método según la reivindicación 3,
- 60 a) en el que se pone en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 y la sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 simultáneamente;
- b) en el que el cromógeno para el cromosoma 17 comprende digoxigenina (DIG);
- 65 c) en el que la sonda de ácido nucleico específica para centrómero CHR17 comprende un conjunto de dos o más sondas de control oligonucleotídicas monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control de satélite alfa de CHR17, en el que $X = 2-14$, particularmente en el que las sondas de

control están configuradas para lograr al menos dos señales enumerables por célula con una intensidad de tinción de ≥ 2 y una cobertura de tinción de $\geq 50\%$ del número de núcleos totales en el plazo de 3 horas de hibridación, especialmente en el que cada sonda de control comprende:

- 5 • una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-14; o
- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 1-14, teniendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 1-14; o
- 10 • una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1-14, o
- sus complementos, o especialmente en los que $X \leq 4$, $X \leq 6$ o $X \leq 8$

15 particularmente en el que las sondas de control pueden lograr una señal enumerable cuando se hibridan con el cromosoma 17, particularmente en el que cada señal enumerable tiene una forma generalmente redonda, una forma redonda es una forma definida por un ajuste de curva cerrada simple dentro de una primera región, la primera región es una área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo, teniendo el círculo concéntrico interno un radio interno (R_{in}) y teniendo el círculo concéntrico externo un radio externo (R_{ext}) en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} , y la curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$, particularmente en el que las sondas de control están configuradas para hibridarse de manera única y específica con una porción de la región de control del cromosoma 17 humano, de modo que otros cromosomas o porciones de los mismos no se marquen de manera evidente sin la influencia de ADN de bloqueo, y/o particularmente en el que las sondas de control comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos;

20 d) en el que la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para centrómero CHR17 comprende hibridar la sonda en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas;

25 e) en el que método está libre del uso de ADN de bloqueo o en el que se usa una cantidad de ADN de bloqueo en una o más etapas del método, y/o

30 f) que comprende además determinar el número de copias del gen HER2 y el número de copias del centrómero CHR17 en la muestra, particularmente que comprende además determinar la razón del número de copias del gen HER2 en la muestra con respecto al número de copias de ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra.

35 5. Método múltiplex para detectar conjuntamente proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína receptora de estrógenos (ER), ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 (CHR17) en una muestra en un portaobjetos individual, comprendiendo dicho método:

40 poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario específico para proteína HER2; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a biotina que se une específicamente al anticuerpo primario específico para proteína HER2; poner en contacto la muestra con estreptavidina conjugada a peroxidasa del rábano picante; poner en contacto la muestra con un sustrato de peróxido de hidrógeno y 3,3'-diaminobencidina (DAB), lo que produce un precipitado de color marrón en las proximidades de la proteína HER2, la DAB es eficaz para bloquear el anticuerpo primario específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario;

45 poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario específico para ER; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina que se une específicamente al anticuerpo primario específico para ER; poner en contacto la muestra con un fosfato de naftol y un segundo cromógeno, lo que produce un precipitado de color rojo en las proximidades de la proteína ER, el anticuerpo primario específico para proteína HER2 no se detecta de manera evidente con Fast Red ya que la DAB introducida previamente bloquea el anticuerpo específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario;

50 poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 conjugada a dinitrofenilo; poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a dinitrofenilo; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa del rábano picante que se une específicamente al anticuerpo primario; poner en contacto la muestra con acetato de plata, hidroquinona y peróxido de hidrógeno, produciéndose de ese modo un precipitado de color negro en los núcleos correspondientes al ADN de HER2; y

55 poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma

17 (CHR17) conjugada a digoxigenina; poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente a digoxigenina; poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina que se une específicamente al anticuerpo primario anti-digoxigenina; poner en contacto la muestra con un fosfato de naftol y Fast Red, produciéndose de ese modo un precipitado de color rojo en las proximidades del ADN centromérico del cromosoma 17.

en el que la detección conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2 es sobre o en células individuales presentes en una población de células, permitiendo así la detección de heterogeneidad tumoral.

6. Método según la reivindicación 5,

a) que comprende además determinar visualmente la presencia y/o cantidad de proteína HER2, proteína ER, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra;

b) en el que se usa microscopía de campo brillante para determinar la presencia y/o cantidad de proteína HER2, proteína ER, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra;

c) en el que determinar la presencia y/o cantidad del ADN genómico de HER2 en la muestra comprende determinar el número de copias de ADN genómico de HER2, y en el que determinar la presencia y/o cantidad del ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra comprende determinar el número de copias de ADN centromérico del cromosoma 17, particularmente que comprende además determinar la razón del número de copias del gen del ADN genómico de HER2 y el número de copias del ADN centromérico del cromosoma 17;

d) en el que las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno se realizan antes de la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y con la sonda de ácido nucleico específica para ADN del cromosoma 17; y/o

e) en el que el primer cromógeno produce un primer color que es lo suficientemente transparente como para permitir la visualización de un segundo color producido por el segundo cromógeno y un tercer color producido por el tercer cromógeno y un cuarto color producido por el cuarto cromógeno.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además determinar visualmente la presencia y/o cantidad de la proteína HER2, la proteína ER, el ADN genómico de HER2 y el centrómero CHR17 en la muestra.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que método puede detectar células que se clasifican como: (i) positivas para la proteína HER2, positivas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; (ii) positivas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; (iii) negativas para la proteína HER2, positivas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; (iv) negativas para la proteína HER2, positivas para la proteína ER y negativas para el gen HER2; (v) negativas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER y positivas para el gen HER2; o (vi) negativas para la proteína HER2, negativas para la proteína ER y negativas para el gen HER2, particularmente en el que el método puede detectar más de una categoría de células dentro de la muestra.

9. Portaobjetos individual que comprende una muestra de células teñidas de manera cromogénica para la proteína HER2, la proteína ER y el ADN de HER2, particularmente en el que cada uno de proteína HER2, proteína ER y ADN de HER2 se tiñen con un cromógeno diferente, o particularmente en el que la proteína HER2 se tiñe con un cromógeno, el primer cromógeno, la proteína ER se tiñe con un segundo cromógeno y el ADN de HER2 se tiñe con un tercer cromógeno, especialmente en el que el primer cromógeno comprende DAB, el segundo cromógeno comprende Fast Red y el tercer cromógeno comprende acetato de plata.

10. Portaobjetos individual que comprende una muestra de células teñidas de manera cromogénica para la proteína HER2, la proteína ER, el ADN de HER2 y el cromosoma 17, particularmente en el que cada uno de la proteína HER2, la proteína ER, el ADN de HER2 y el cromosoma 17 se tiñen con un cromógeno diferente, o particularmente en el que la proteína HER2 se tiñe con un primer cromógeno, la proteína ER se tiñe con un segundo cromógeno, el ADN de HER2 se tiñe con un tercer cromógeno y el cromosoma 17 se tiñe con un cuarto cromógeno, y/o particularmente en el que más del 50% de los núcleos tienen señales enumerables para el cromosoma 17, especialmente en el que cada señal enumerable es una forma generalmente redonda, una forma redonda es una forma definida por una curva cerrada simple que se ajusta dentro de una primera región, la primera región es un área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo, teniendo el círculo concéntrico interno un radio interno (R_{in}) y teniendo el

círculo concéntrico externo un radio externo (R_{ext}) en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} , y la curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$.

- 5 11. Método múltiplex para detectar conjuntamente proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína Ki67, ADN genómico de HER2 y ADN centromérico del cromosoma 17 en una muestra en un portaobjetos individual, comprendiendo dicho método:
- 10 poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con un primer cromógeno, el primer cromógeno se encuentra a un nivel eficaz para hacer visible la proteína HER2 y bloquear el anticuerpo específico para proteína HER2 en exceso;
- 15 poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para Ki67 y teñir la proteína Ki67 con un segundo cromógeno, en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 no se detecta de manera evidente con el segundo cromógeno ya que el primer cromógeno introducido previamente bloquea el anticuerpo específico para proteína HER2 en exceso;
- 20 poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y teñir el ADN genómico de HER2 con un tercer cromógeno; y
- 25 12. Método múltiple para detectar conjuntamente una proteína HER2, una proteína ER y un ADN genómico de HER2 en una muestra en un portaobjetos individual, comprendiendo dicho método:
- 30 teñir la proteína HER2 poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2 y poniendo en contacto la muestra con un primer componente de cromógeno para el anticuerpo específico para proteína HER2, el primer componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un primer color, en el que la presencia del primer color indica la presencia de la proteína HER2;
- 35 teñir la proteína ER poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína ER y poniendo en contacto la muestra con un segundo componente de cromógeno para el anticuerpo específico para proteína ER, el segundo componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un segundo color, en el que la presencia del segundo color indica la presencia de la proteína ER; y
- 40 teñir el ADN de HER2 poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 y poniendo en contacto la muestra con un tercer componente de cromógeno para la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2, el tercer componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un tercer color, en el que la presencia del tercer color indica la presencia de ADN de HER2,
- 45 en el que la detección conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2 es sobre o en células individuales presentes en una población de células, permitiendo así la detección de heterogeneidad tumoral.
- 50 13. Método según la reivindicación 12,
- 55 a) que comprende además teñir ADN centromérico del cromosoma 17 poniendo en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN centromérico del cromosoma 17 y poner en contacto la muestra con un cuarto componente de cromógeno para la sonda de ácido nucleico específica para ADN centromérico del cromosoma 17, el cuarto componente de cromógeno está adaptado para emitir o hacer visible un cuarto color, en el que la presencia del cuarto color indica la presencia de ADN centromérico del cromosoma 17, particularmente en el que la sonda de ácido nucleico específica para ADN centromérico del cromosoma 17 comprende un marcador detectable;
- 60 b) en el que la muestra es una muestra de tejido;
- 65 c) en el que el primer componente de cromógeno comprende DAB, el segundo componente de cromógeno comprende Fast Red, y el tercer componente de cromógeno comprende plata;
- d) en el que el primer color es lo suficientemente transparente como para permitir la visualización del segundo color y del tercer color;
- e) que comprende además visualizar los colores usando microscopía de campo brillante;

f) en el que método se automatiza;

g) en el que las etapas de teñir la proteína HER2 y teñir la proteína ER se realizan antes de la etapa de teñir el ADN de HER2;

5 h) en el que la muestra se somete a un tratamiento con proteasa después de las etapas de teñir la proteína HER2 y la proteína ER pero antes de la etapa de teñir el ADN de HER2, en el que el tratamiento con proteasa es eficaz para permitir la hibridación de las sondas de ácido nucleico a sus dianas de ADN respectivas, particularmente en el que la muestra se somete a un tratamiento térmico después de las etapas de teñir la proteína HER2 y la proteína ER pero antes del tratamiento con proteasa, y/o particularmente en el que la proteasa comprende proteinasa K, pepsina, colagenasa, dispasa, o una combinación de las mismas, y/o particularmente en el que el tratamiento con proteasa no elimina el primer color ni el segundo color, y la morfología del tejido se mantiene suficientemente como para permitir la detección del primer color y el segundo color;

15 i) en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 comprende un primer marcador, y el primer componente cromogénico comprende un componente inductor para inducir que el primer marcador emita el primer color, o en el que el primer componente de cromógeno comprende un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para proteína HER2;

20 j) en el que el anticuerpo específico para proteína ER comprende un segundo marcador, y el segundo componente cromogénico comprende un componente inductor para inducir que el primer marcador emita el segundo color, particularmente en el que el segundo componente de cromógeno comprende un anticuerpo primario que se une específicamente al segundo marcador, especialmente en el que el segundo componente de cromógeno comprende además un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario, en particular en el que el anticuerpo secundario se conjuga a una enzima, opcionalmente en el que el segundo componente de cromógeno comprende además un sustrato para la enzima y un metal, por ejemplo en el que la enzima del anticuerpo secundario comprende peroxidasa del rábano picante, el sustrato comprende peróxido de hidrógeno y el metal comprende plata;

30 k) en el que el segundo componente de cromógeno comprende un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para proteína ER;

35 l) en el que la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 comprende un marcador detectable, particularmente en el que el marcador detectable es un hapteno, especialmente en el que el hapteno comprende dinitrofenilo, digoxigenina, biotina o fluoresceína.

40 14. Método según cualquiera de la reivindicación 13, en el que la sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 comprende un conjunto de dos o más sondas de control oligonucleotídicas monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control de satélite alfa del cromosoma 17, en el que $X = 2-14$.

45 15. Método según la reivindicación 14,

a) en el que $X \geq 4$, $X \geq 6$, o $X \geq 8$;

b) en el que las sondas de control están configuradas para lograr al menos dos señales enumerables por célula con una intensidad de tinción de ≥ 2 y una cobertura de tinción de $\geq 50\%$ del número de núcleos totales en el plazo de 3 horas de hibridación;

50 c) en el que cada sonda de control comprende:

- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 61-74; o
- 55 • una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 61-74, teniendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 61-74; o
- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 61-74, o
- 60 • sus complementos;

65 d) en el que la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para centrómero del cromosoma 17 comprende hibridar la sonda en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas;

e) en el que método está libre del uso de ADN de bloqueo, o en el que se usa una cantidad de ADN de bloqueo en una o más etapas del método;

5 f) en el que las sondas de control pueden lograr una señal enumerable cuando se hibridan con el cromosoma 17;

10 g) en el que las sondas de control están configuradas para hibridarse de manera única y específica con una porción de la región de control del cromosoma 17 humano, de modo que otros cromosomas o porciones de los mismos no se marquen de manera evidente sin la influencia de ADN de bloqueo; y/o

h) en el que las sondas de control comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos.

16. Método múltiplex para detectar conjuntamente proteína receptora 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), proteína receptora de estrógenos (ER) y ADN genómico de HER2 en una muestra en un portaobjetos individual, comprendiendo dicho método:

20 poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para proteína HER2, poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con un primer cromógeno, el primer cromógeno se encuentra en un nivel eficaz para hacer visible la proteína HER2 y para bloquear el anticuerpo específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario;

25 poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con un segundo cromógeno, en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 no se detecta de manera evidente con el segundo cromógeno, ya que el primer cromógeno que se introdujo previamente bloquea el anticuerpo específico para proteína HER2 no unido por el anticuerpo secundario; y

30 poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 y teñir el ADN genómico de HER2 con un tercer cromógeno;

35 en el que las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno se realizan antes de la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2,

40 en el que el primer cromógeno produce un primer color que es lo suficientemente transparente como para permitir la visualización de un segundo color producido por el segundo cromógeno y un tercer color producido por el tercer cromógeno

45 en el que la detección conjunta de proteína HER2, proteína ER y ADN genómico de HER2 es sobre o en células individuales presentes en una población de células, permitiendo así la detección de heterogeneidad tumoral.

17. Método según la reivindicación 16,

50 a) en el que la muestra comprende una muestra de tejido de mama, particularmente en el que la muestra de tejido de mama comprende células tumorales de mama, y/o particularmente en el que la muestra de tejido de mama es una muestra de tejido fresco, una muestra de tejido congelado o una muestra de tejido fijado;

b) que comprende además visualizar los cromógenos usando microscopía de campo brillante;

c) en el que método se automatiza;

55 d) en el que la muestra se somete a un tratamiento con proteasa después de las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno, pero antes de la etapa de poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2, en el que el tratamiento con proteasa es eficaz para permitir la hibridación de la sonda de ácido nucleico con su diana de ADN respectiva, particularmente en el que la muestra se somete a un tratamiento térmico después de las etapas de poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para proteína HER2 y teñir la proteína HER2 con el primer cromógeno y poner en contacto la muestra con el anticuerpo específico para ER y teñir la proteína ER con el segundo cromógeno, pero antes del tratamiento con proteasa, y/o particularmente en el que la proteasa comprende proteinasa K, pepsina, colagenasa, dispasa, o una combinación de las mismas, y/o particularmente en el que el tratamiento con proteasa no elimina el primer color o el segundo color, y la morfología del tejido se mantiene suficientemente como para permitir la detección del primer color y el segundo color;

60

65

e) en el que el primer cromógeno comprende 3,3'-diaminobencidina (DAB);

5 f) en el que el anticuerpo específico para proteína HER2 comprende un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína HER2, particularmente en el que el anticuerpo monoclonal específico para proteína HER2 comprende un anticuerpo monoclonal de conejo, especialmente en el que el anticuerpo monoclonal de conejo es un anticuerpo monoclonal de conejo anti-HER2 4B5;

10 g) en el que teñir la proteína HER2 comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para HER2, particularmente en el que el anticuerpo secundario marcado de manera detectable comprende un anticuerpo secundario biotinilado, o particularmente en el que teñir la proteína HER2 en la muestra comprende además poner en contacto la muestra con estreptavidina conjugada a una enzima, un sustrato para la enzima y el primer cromógeno para producir un precipitado coloreado, especialmente en el que la enzima comprende peroxidasa del rábano picante, el sustrato comprende peróxido de hidrógeno y el primer cromógeno comprende 3,3'-diaminobencidina (DAB);

20 h) en el que el segundo cromógeno comprende Fast Red;

25 i) en el que el anticuerpo específico para ER comprende un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína ER, particularmente en el que el anticuerpo monoclonal específico para ER comprende un anticuerpo monoclonal de conejo, especialmente en el que el anticuerpo monoclonal de conejo es un anticuerpo monoclonal de conejo anti-ER SP1;

30 j) en el que teñir la proteína ER comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario marcado de manera detectable que se une específicamente al anticuerpo específico para ER, particularmente en el que el anticuerpo secundario marcado de manera detectable comprende un anticuerpo secundario conjugado a una enzima, especialmente en el que detectar la proteína ER en la muestra comprende además poner en contacto la muestra con un sustrato para la enzima y el segundo cromógeno para producir un precipitado coloreado, opcionalmente en el que la enzima comprende fosfatasa alcalina, el sustrato comprende naftol y el segundo cromógeno comprende Fast Red;

35 k) en el que el tercer cromógeno comprende acetato de plata;

40 l) en el que la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 comprende un conjunto de dos o más sondas diana oligonucleotídicas monocatenarias específicas para ADN de HER2, particularmente en el que el conjunto de dos o más sondas diana oligonucleotídicas monocatenarias son específicas para una región entre los nucleótidos 35.027.979 y 35.355.516 del cromosoma 17 humano, y/o particularmente en el que las sondas diana pueden lograr una señal enumerable cuando se hibridan con ADN de HER2, especialmente en el que cada señal enumerable tiene una forma generalmente redonda, una forma redonda es una forma definida por una curva cerrada simple dentro de una primera región, la primera región es un área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo, teniendo el círculo concéntrico interno un radio interno (R_{in}) y teniendo el círculo concéntrico externo un radio externo (R_{ext}) en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} , y la curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$, y/o particularmente en el que las sondas diana comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos;

50 m) en el que la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 comprende un marcador detectable, particularmente en el que el marcador detectable es un hapteno, especialmente en el que el hapteno comprende dinitrofenilo, digoxigenina, biotina o fluoresceína, y/o particularmente en el que detectar el ADN genómico de HER2 en la muestra comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo primario que se une específicamente al marcador detectable, especialmente que comprende además poner en contacto la muestra con un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario, en particular en el que el anticuerpo secundario se conjuga a una enzima, opcionalmente que comprende además poner en contacto la muestra con un sustrato para la enzima y un metal, por ejemplo, en el que la enzima es peroxidasa del rábano picante, el sustrato es peróxido de hidrógeno y el metal es acetato de plata;

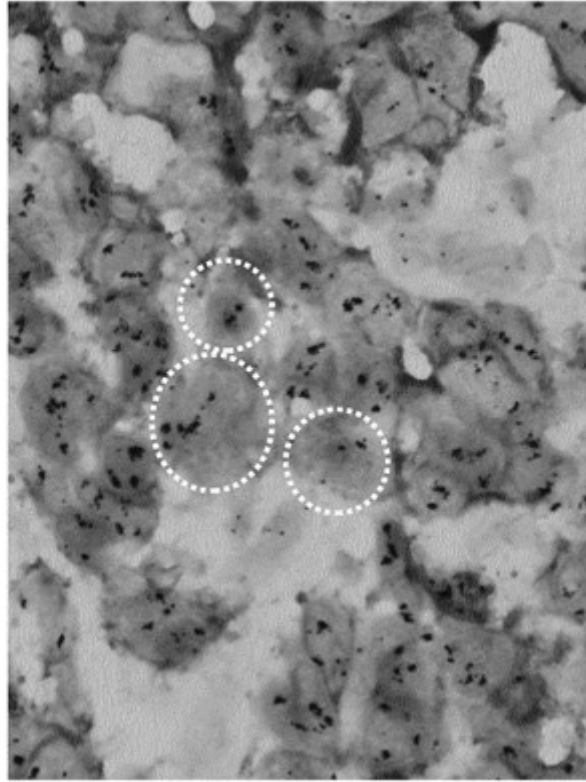
60 n) en el que la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico de HER2 comprende hibridar la sonda en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas; y/o

65 o) que comprende además poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico específica de centrómero del cromosoma 17 (CHR17) y teñir el centrómero CHR17 con un cuarto cromógeno, particularmente en el que se pone en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para ADN de HER2 y la sonda de ácido nucleico específica de centrómero del cromosoma 17 simultáneamente,

especialmente en el que el cuarto cromógeno comprende digoxigenina (DIG).

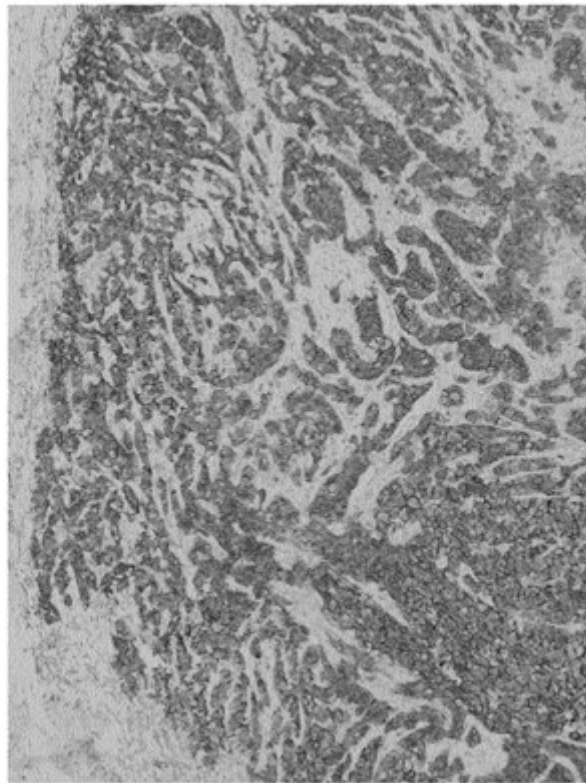
18. Método según la reivindicación 17, en el que la sonda de ácido nucleico específica para centrómero CHR17 comprende un conjunto de dos o más sondas de control oligonucleotídicas monocatenarias específicas para X monómeros distintos de una región de control de satélite alfa de CHR17, en el que $X = 2-14$.
19. Método según la reivindicación 18,
- a) en el que las sondas de control están configuradas para lograr al menos dos señales enumerables por célula con una intensidad de tinción de ≥ 2 y una cobertura de tinción de $\geq 50\%$ del número de núcleos totales en el plazo de 3 horas de hibridación;
- b) en el que cada sonda de control comprende:
- una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-14; o
 - una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una versión truncada de las SEQ ID NO: 1-14, teniendo la versión truncada al menos 40 pb contiguos de dichas SEQ ID NO: 1-14; o
 - una secuencia seleccionada del grupo que consiste en una secuencia que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1-14, o
 - sus complementos;
- c) en el que $X \leq 4$, $X \leq 6$, o $X \leq 8$;
- d) en el que la etapa de poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico específica para centrómero CHR17 comprende hibridar la sonda en condiciones durante un periodo de tiempo menor de aproximadamente 3 horas;
- e) en el que método está libre del uso de ADN de bloqueo, o en el que se usa una cantidad de ADN de bloqueo en una o más etapas del método;
- f) en el que las sondas de control pueden lograr una señal enumerable cuando se hibridan con el cromosoma 17, particularmente en el que cada señal enumerable tiene una forma generalmente redonda, una forma redonda es una forma definida por un ajuste de curva cerrada simple dentro de una primera región, la primera región es un área en y entre un círculo concéntrico interno y un círculo concéntrico externo, teniendo el círculo concéntrico interno un radio interno (R_{in}) y teniendo el círculo concéntrico externo un radio externo (R_{ext}) en el que R_{in} es $\geq 50\%$ de R_{ext} , y la curva cerrada simple tiene un radio R_{simple} en el que $R_{in} \leq R_{simple} \leq R_{ext}$;
- g) en el que las sondas de control están configuradas para hibridarse de manera única y específica con una porción de la región de control del cromosoma 17 humano, de modo que otros cromosomas o porciones de los mismos no se marquen de manera evidente sin la influencia de ADN de bloqueo;
- h) en el que las sondas de control comprenden cada una entre 50 y 100 nucleótidos; y/o
- i) que comprende además determinar el número de copias del gen HER2 y el número de copias del centrómero CHR17 en la muestra, particularmente que comprende además determinar la razón del número de copias del gen HER2 en la muestra con respecto al número de copias de ADN centromérico del cromosoma 17 en la muestra.

FIG. 1B



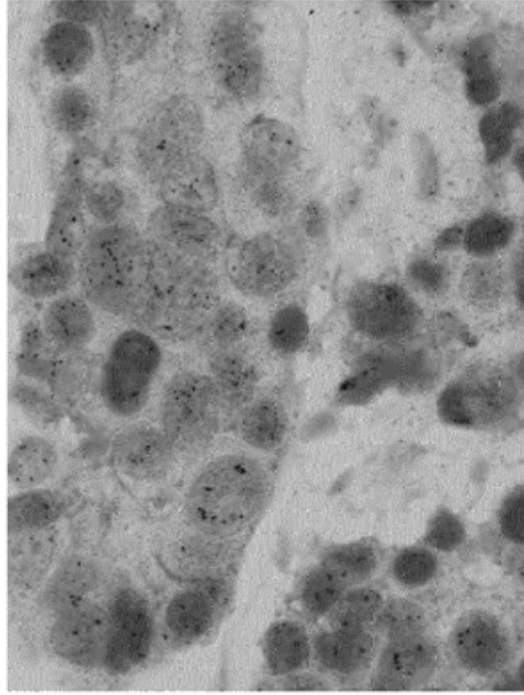
Objetivo 60X

FIG. 1A



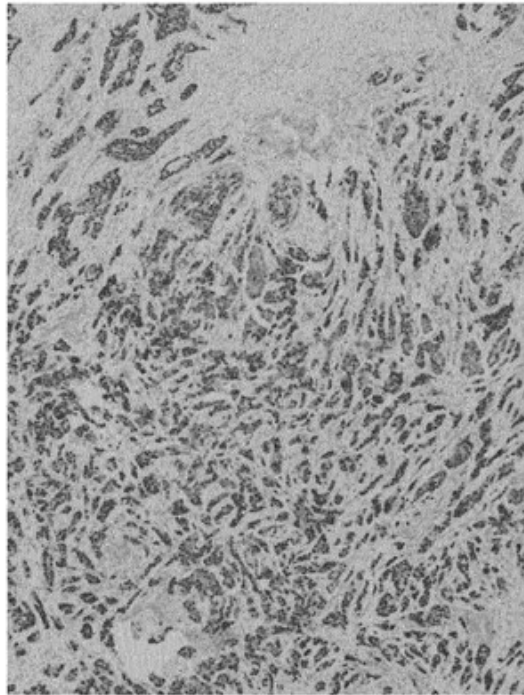
Objetivo 4X

FIG. 2B



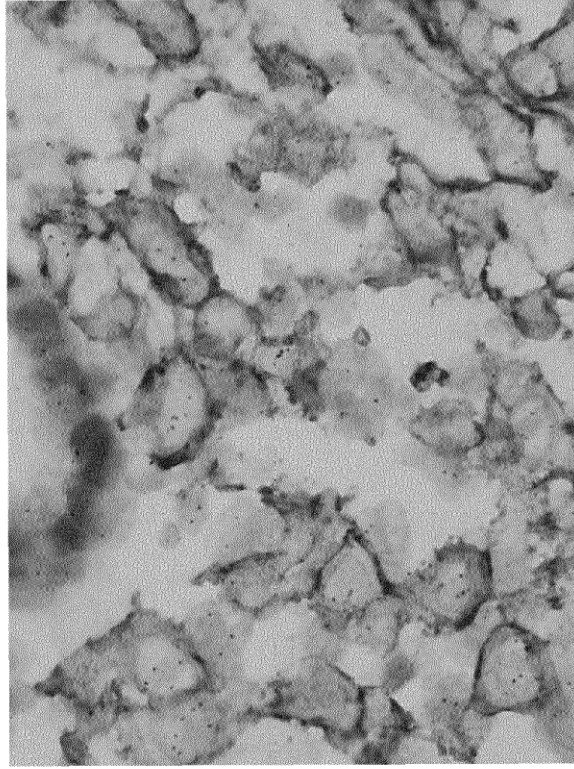
Objetivo 60X

FIG. 2A



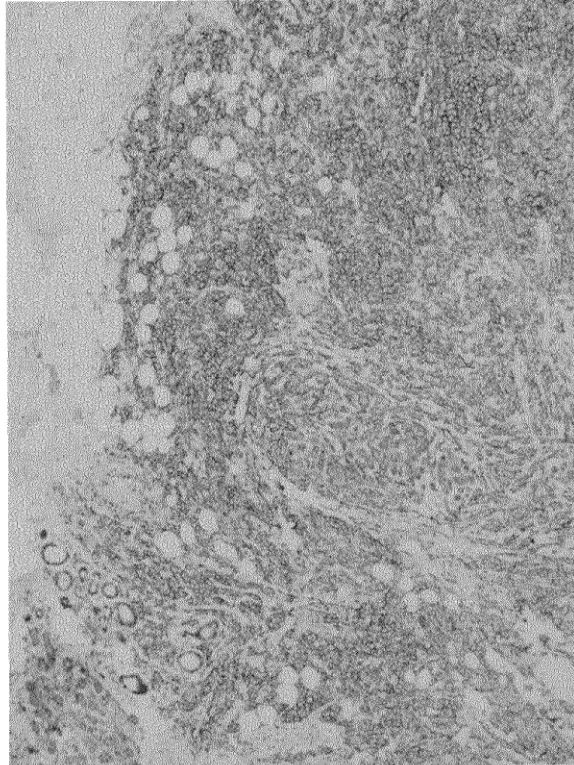
Objetivo 4X

FIG. 3B



Objetivo 60X

FIG. 3A



Objetivo 4X

FIG. 4C

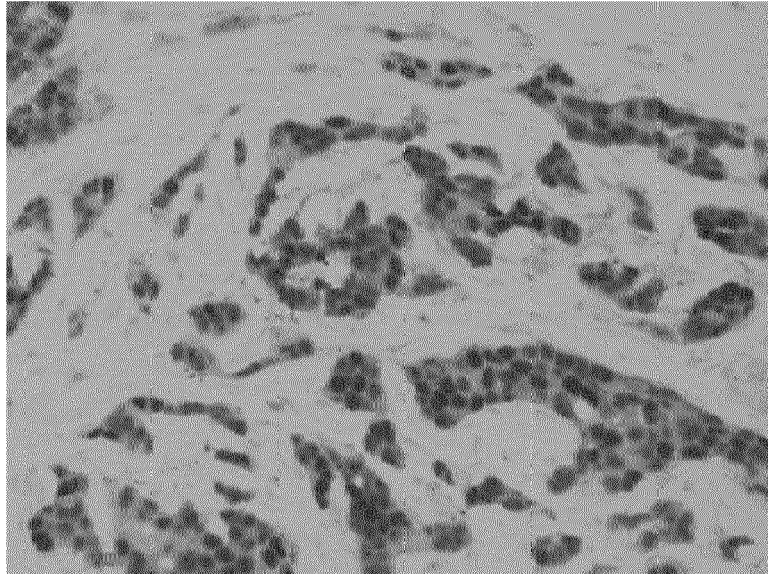


FIG. 4B

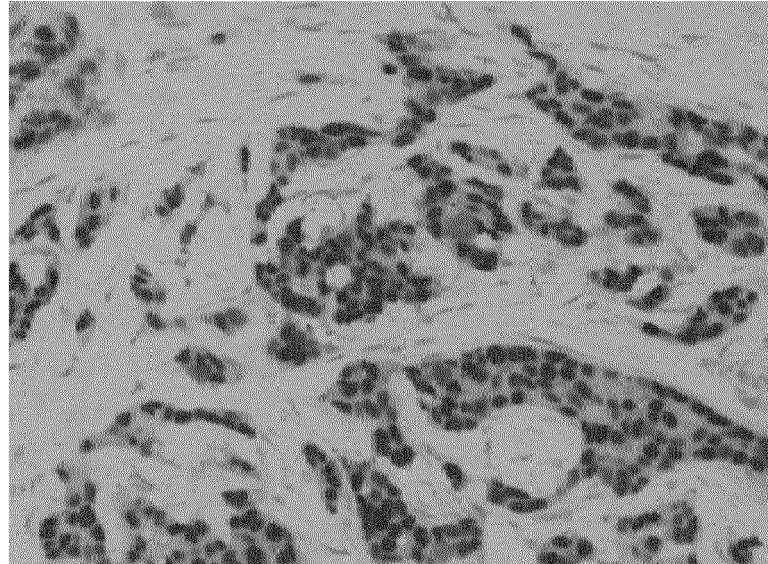


FIG. 4A

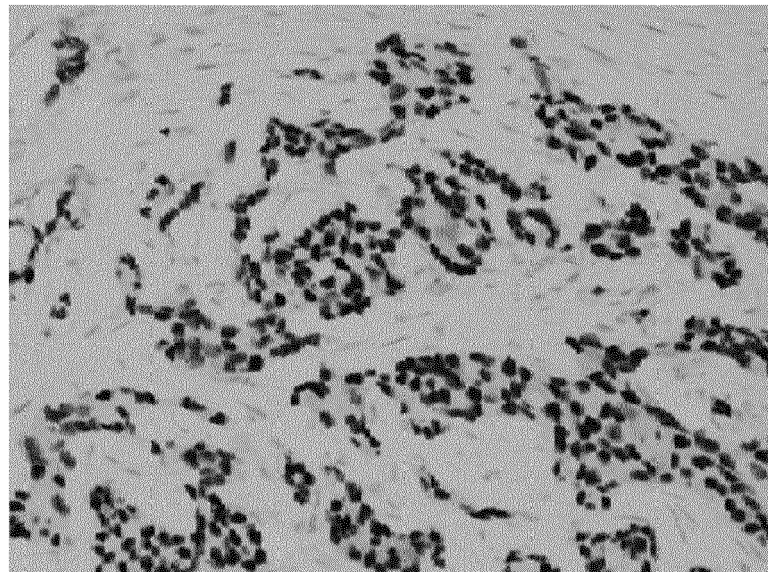


FIG. 5C

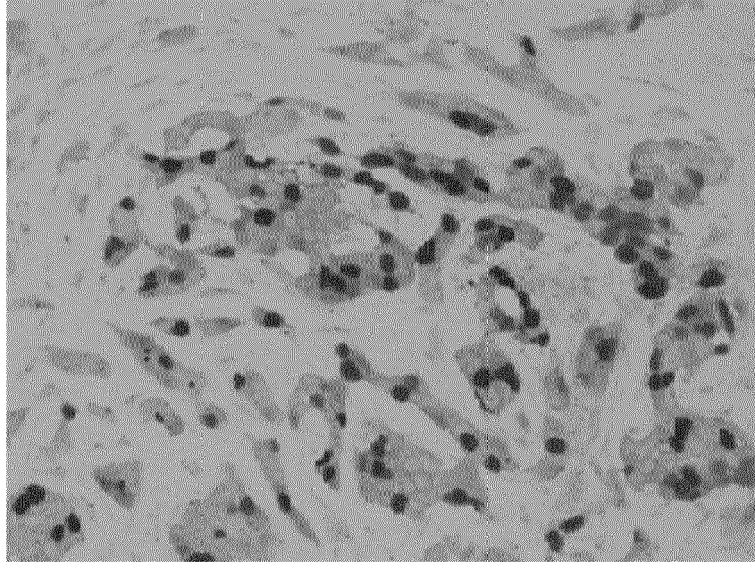


FIG. 5B

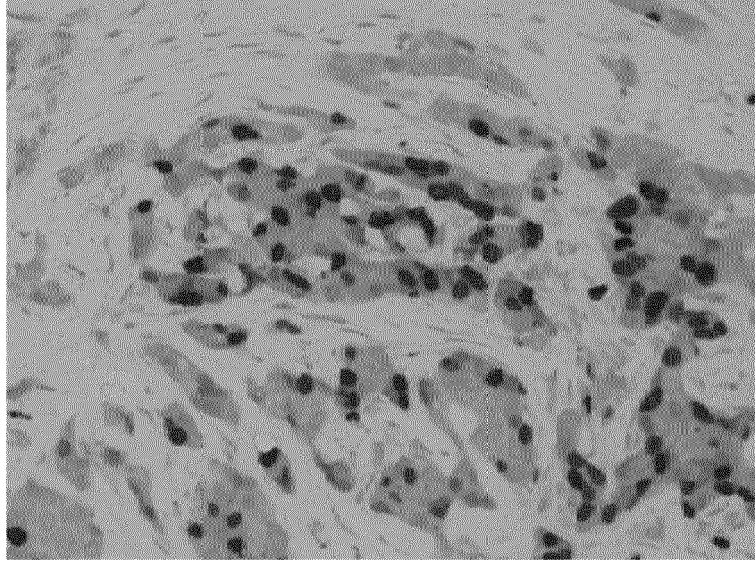
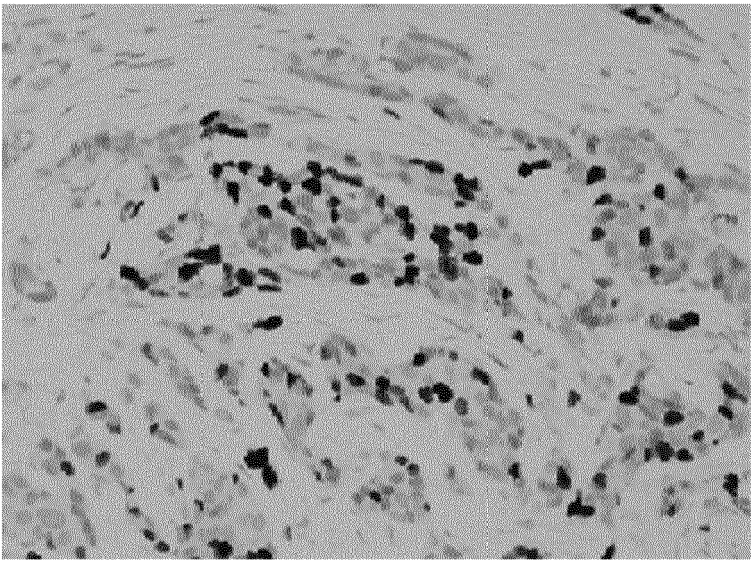


FIG. 5A



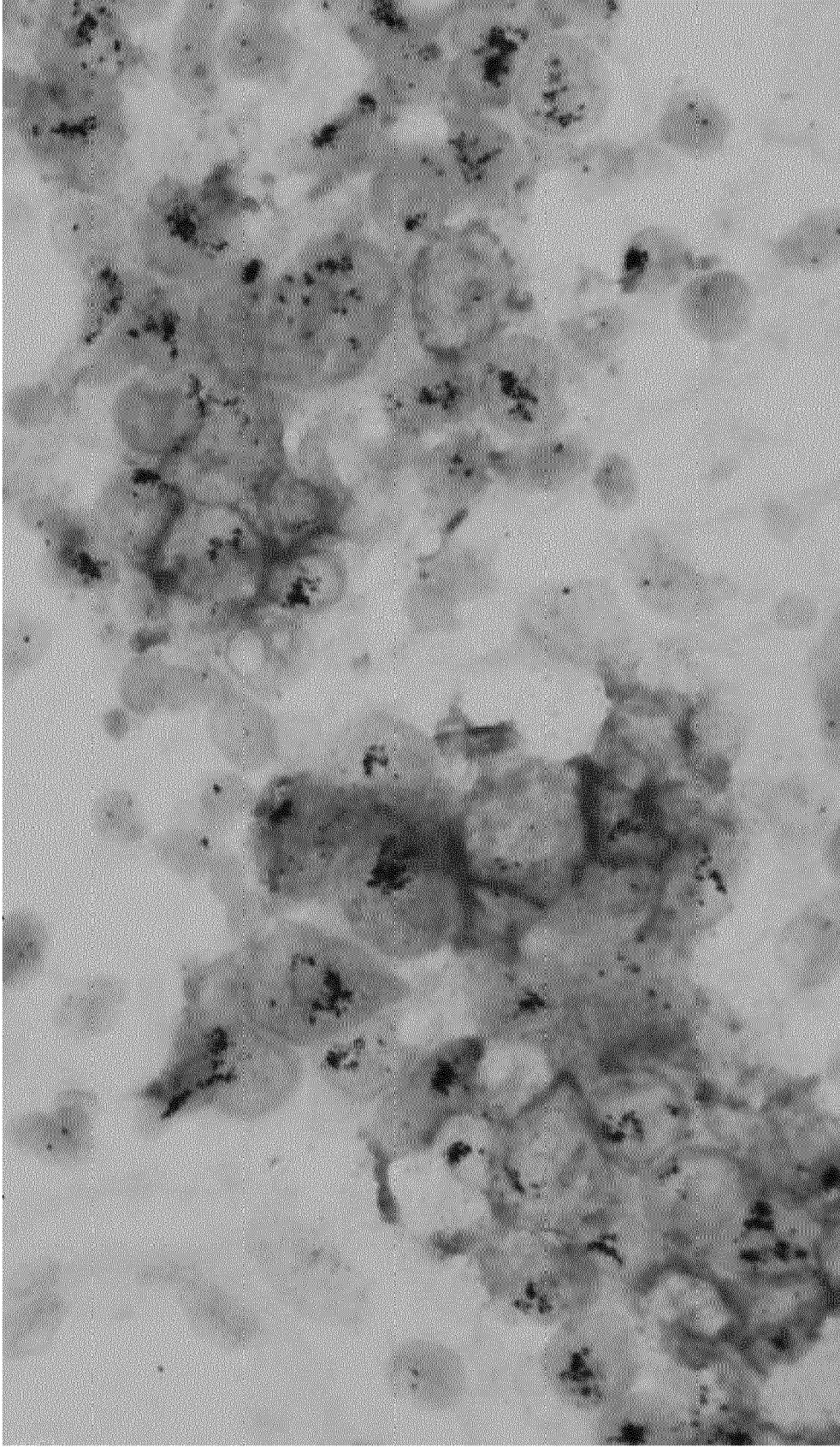


FIG. 6

FIG. 7B

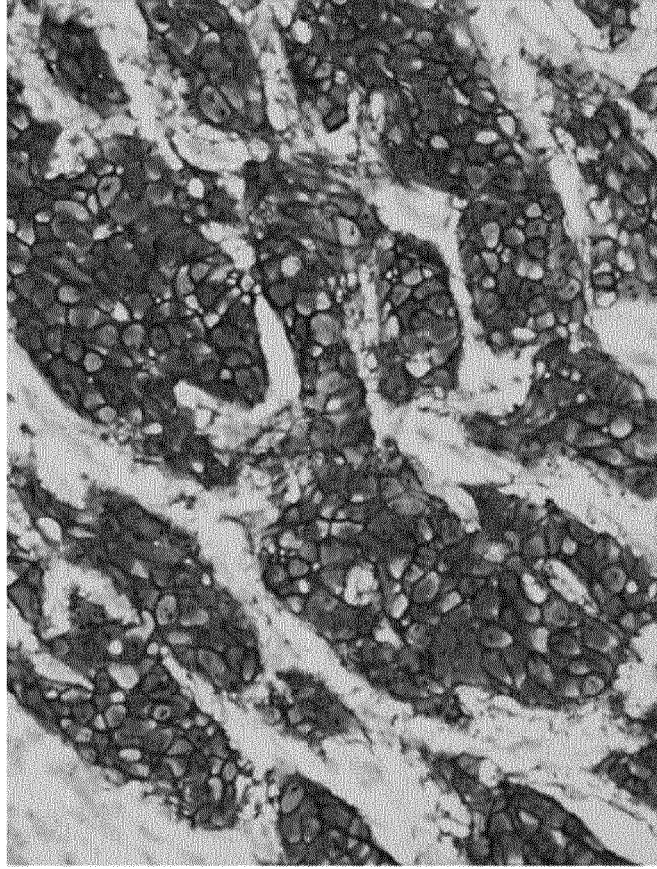


FIG. 7A

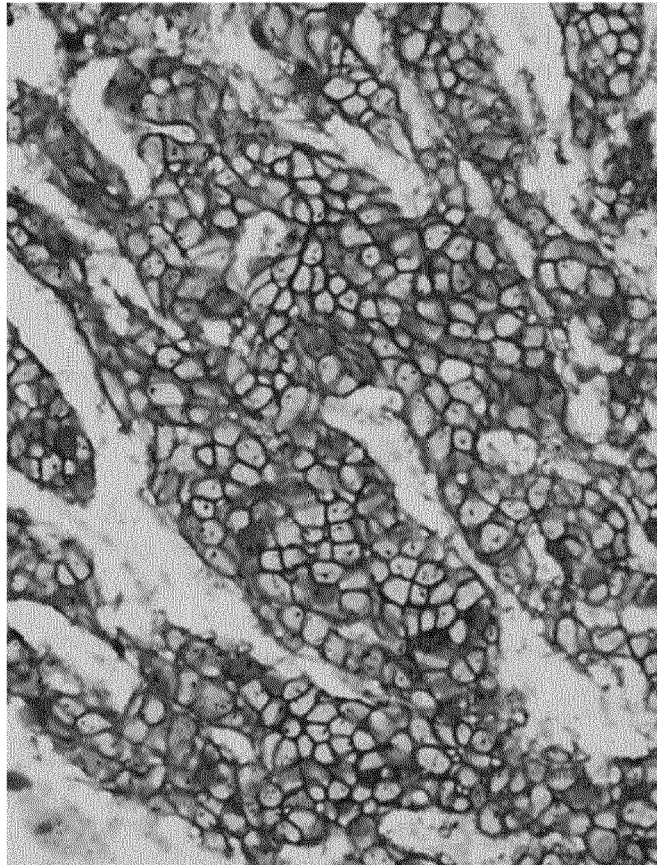


FIG. 7D

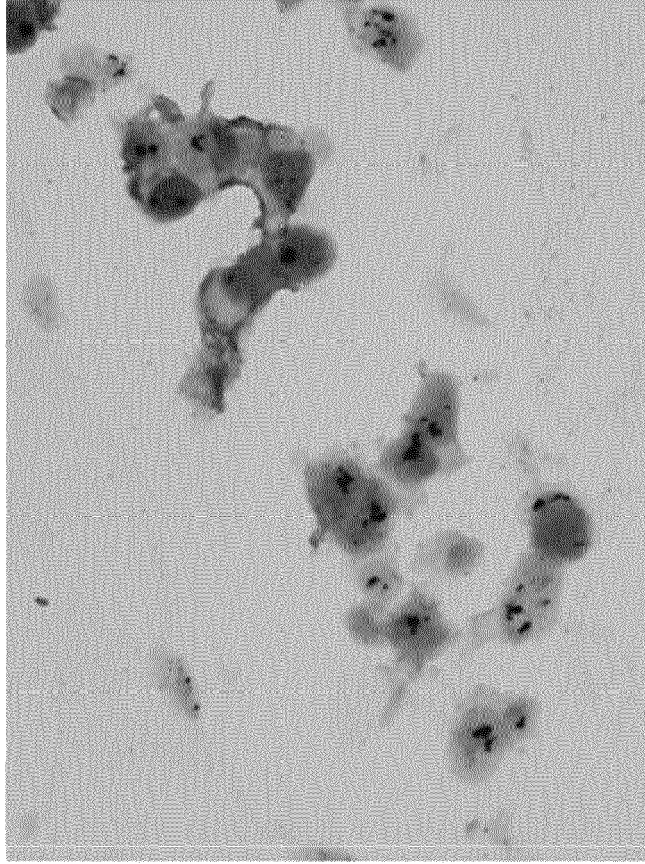


FIG. 7C

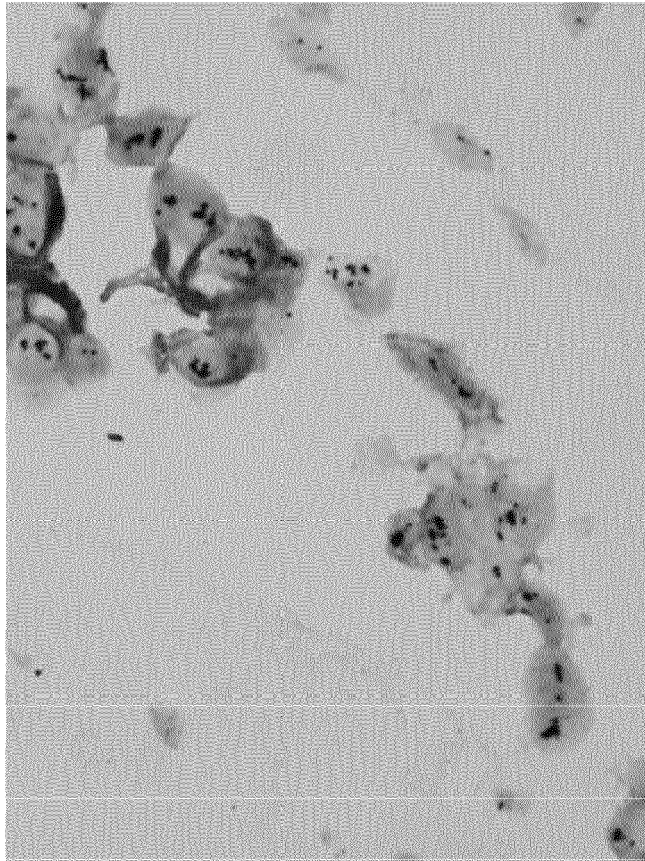


FIG. 8C

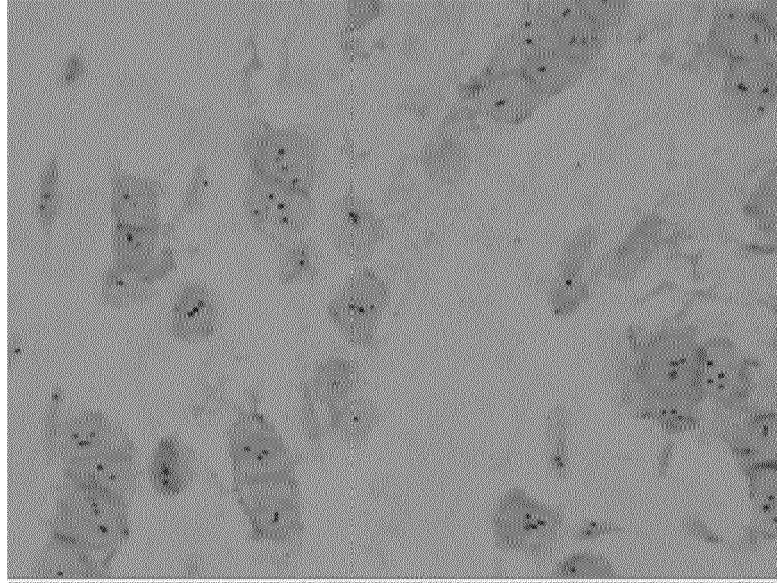


FIG. 8B

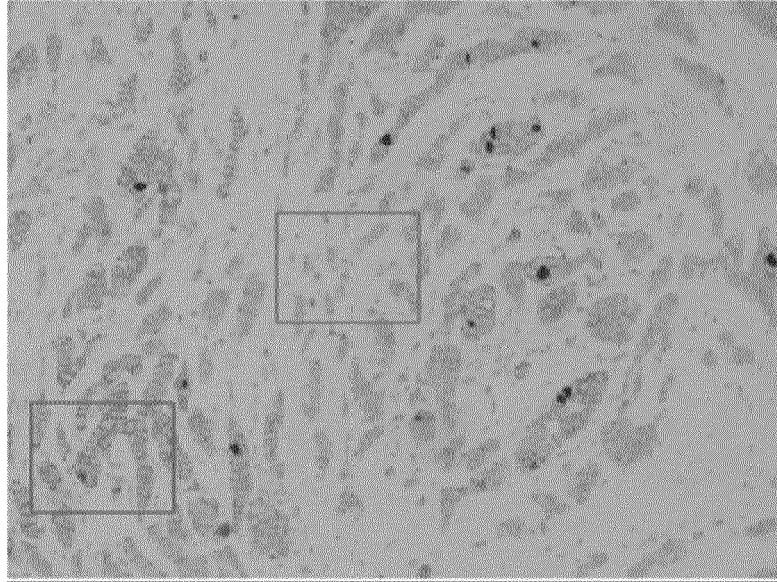


FIG. 8A

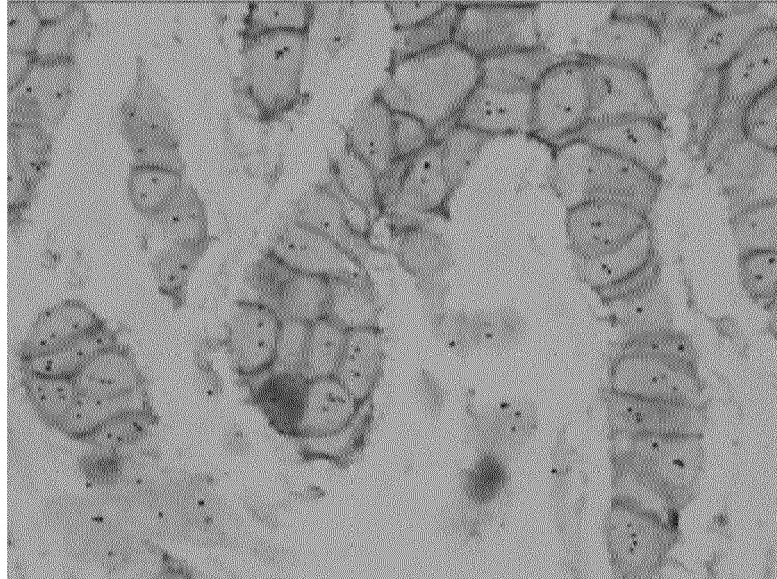


FIG. 9C

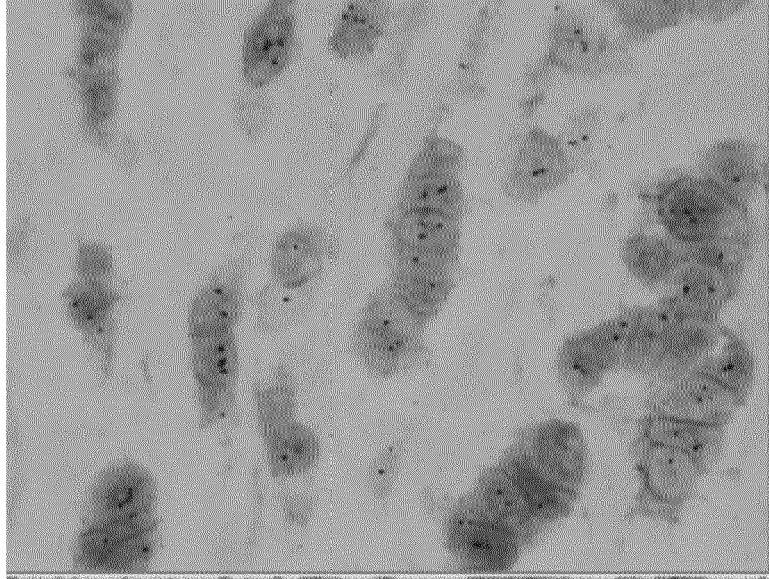


FIG. 9B

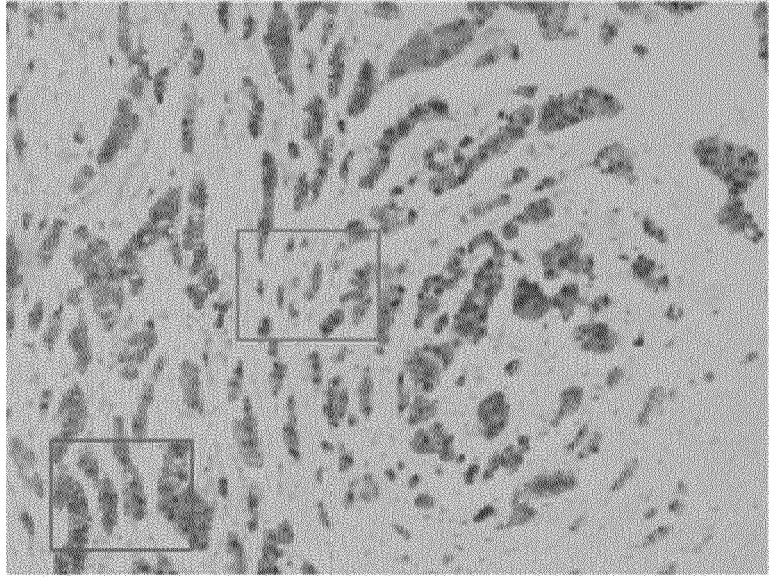


FIG. 9A

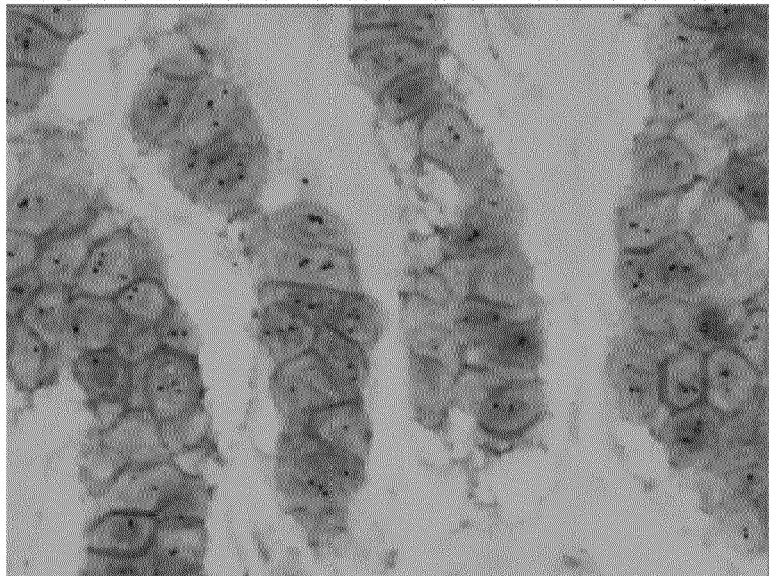


FIG. 10B

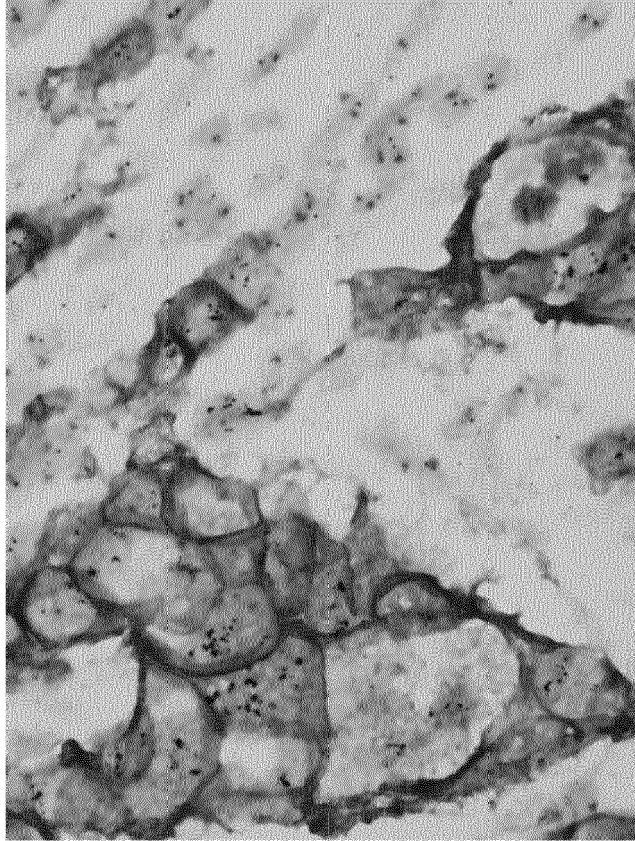


FIG. 10A

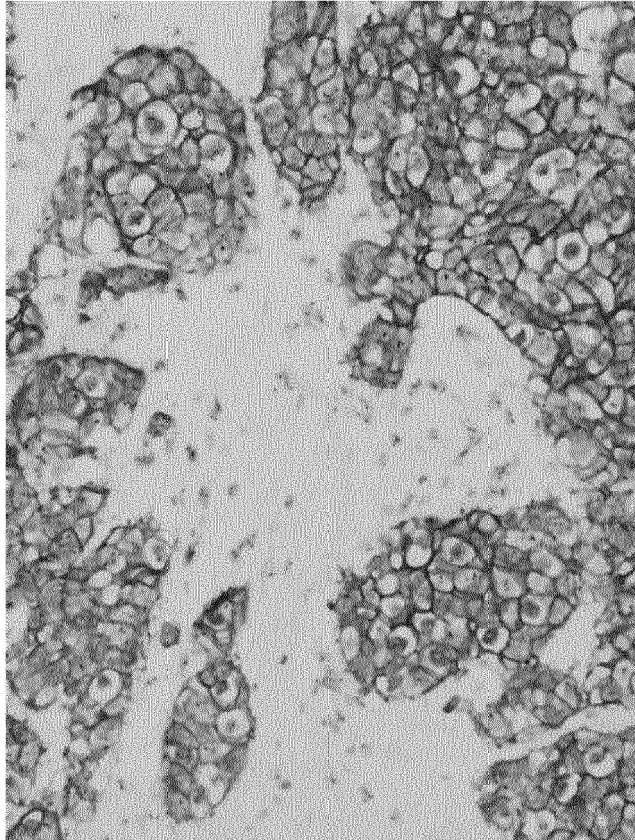


FIG. 11B

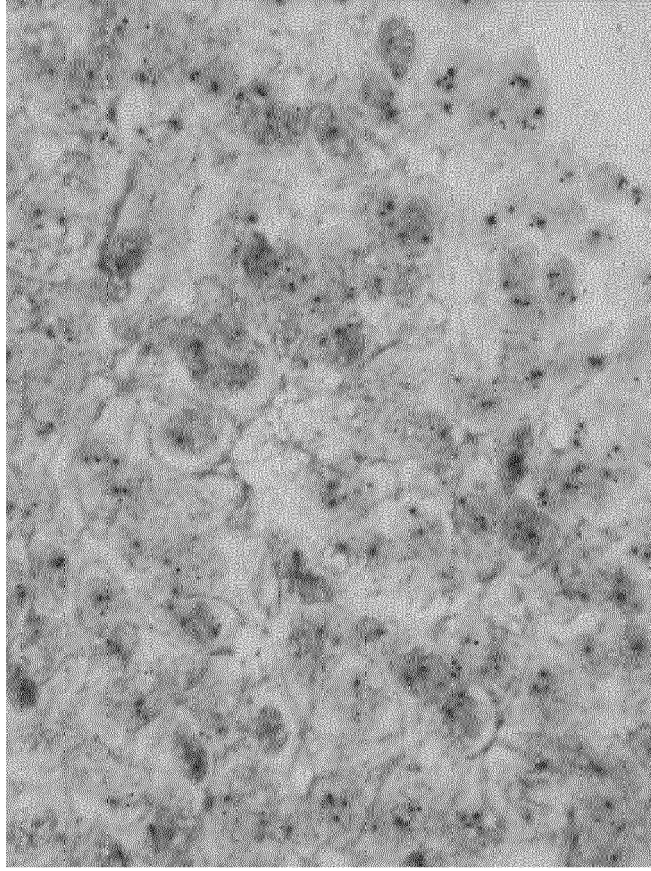


FIG. 11A

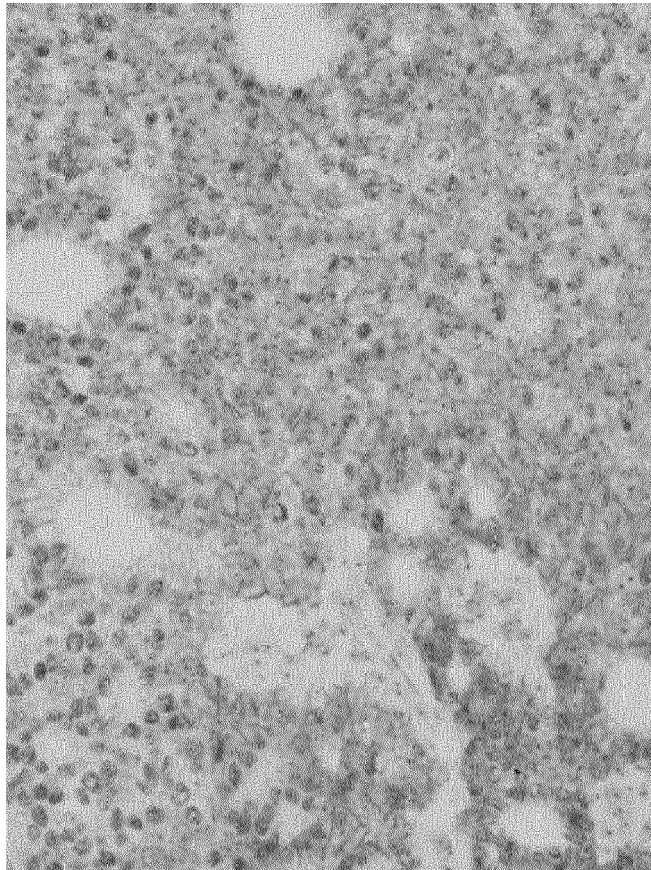
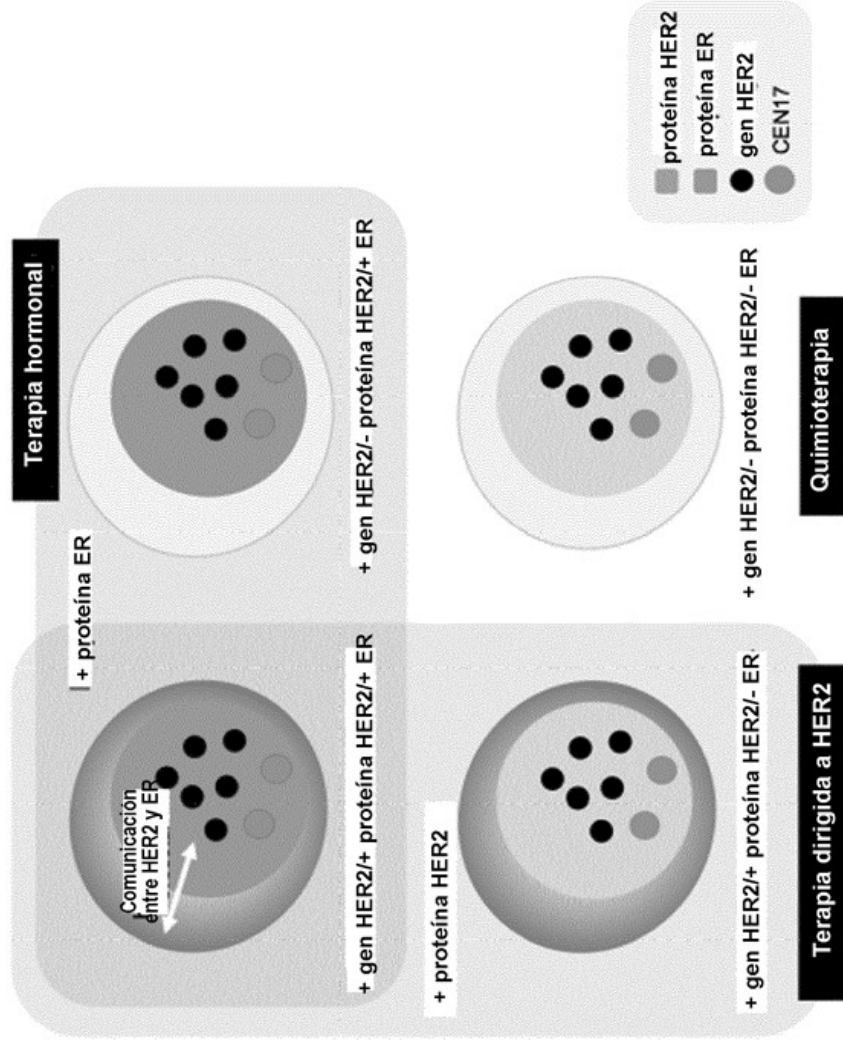


FIG. 12

Tipos de células tumorales en cáncer de mama +HER2/+ER



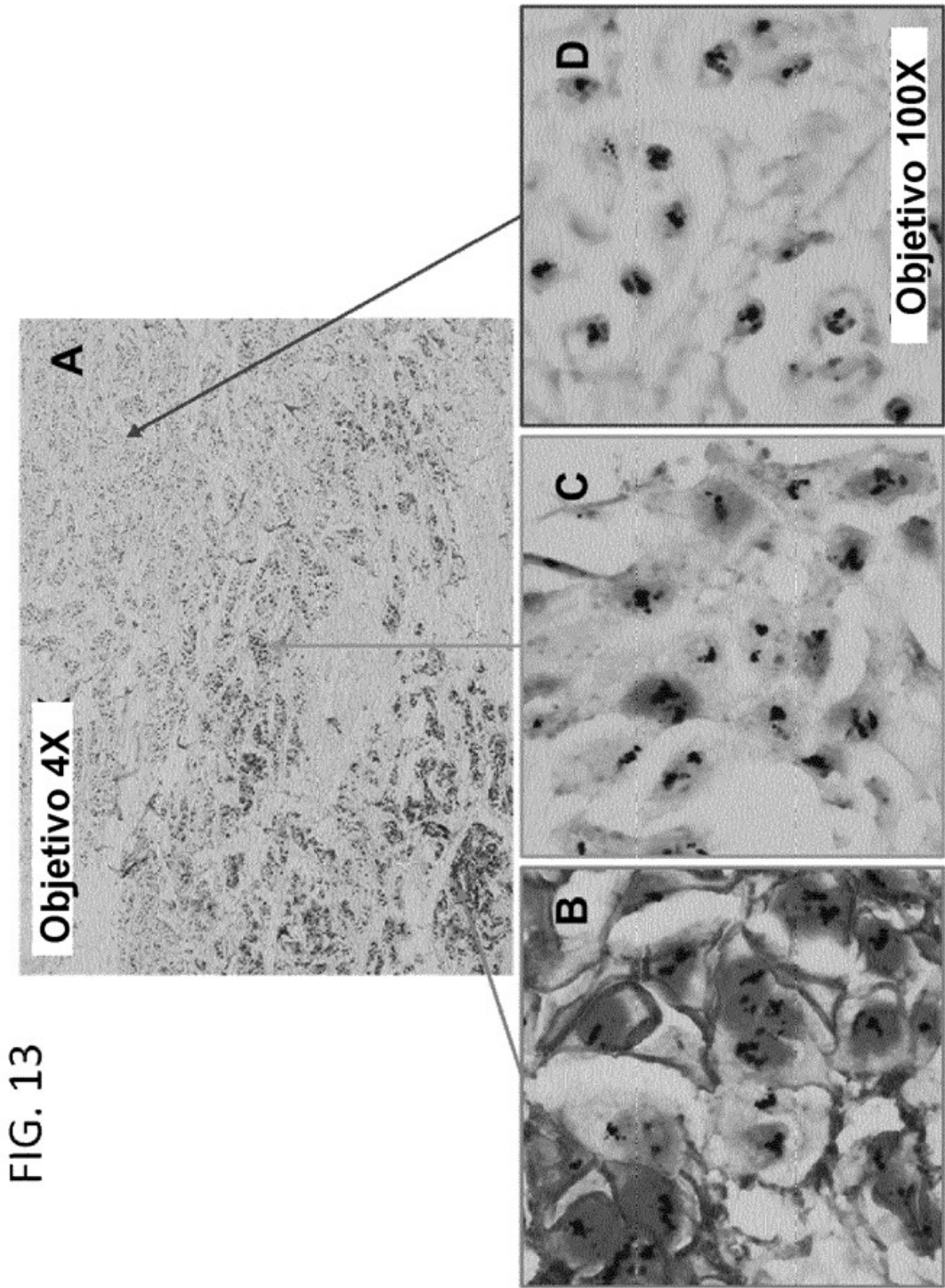


FIG. 13

FIG. 14

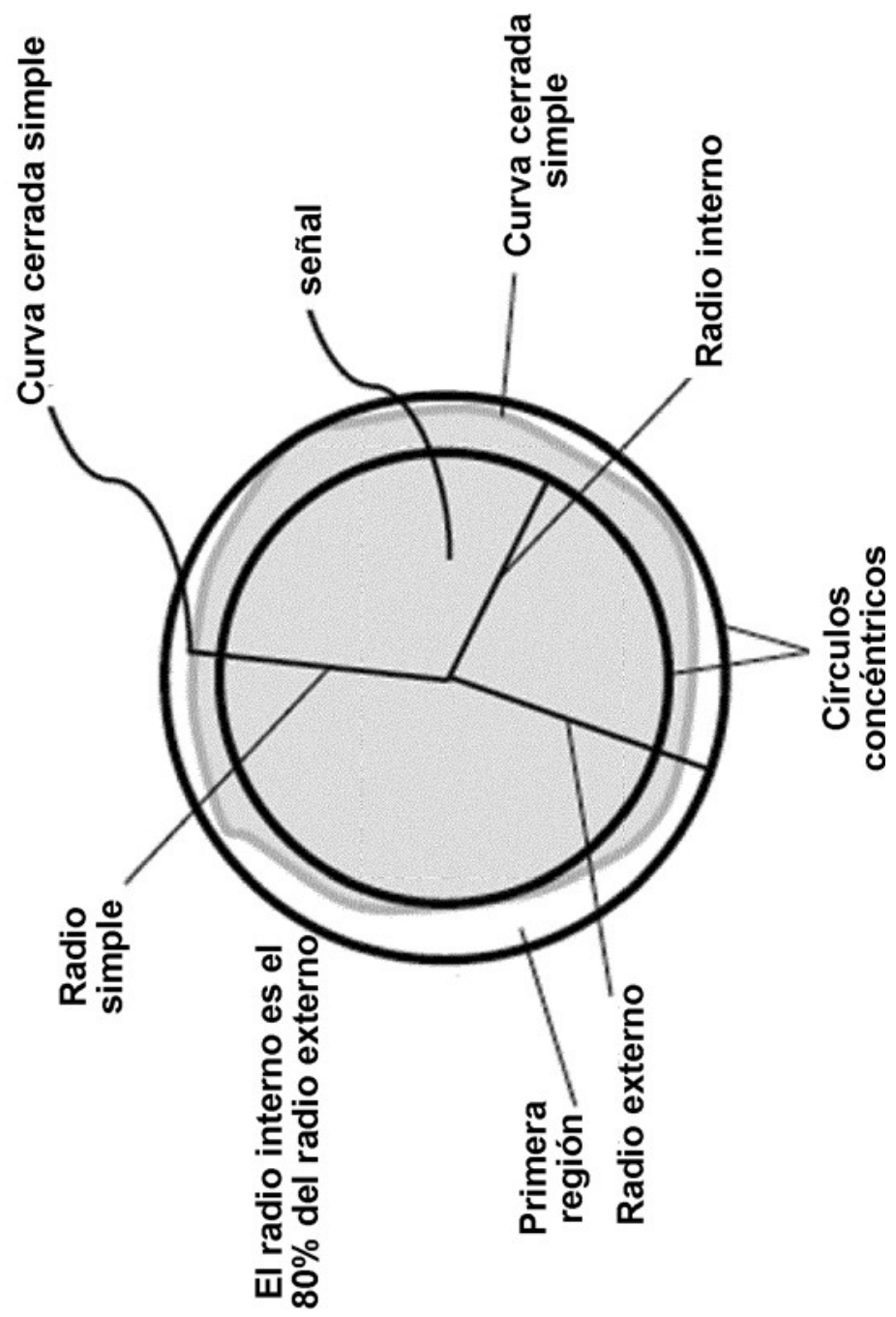


FIG. 15

Desarrollo de GPA de HER2 tricolor

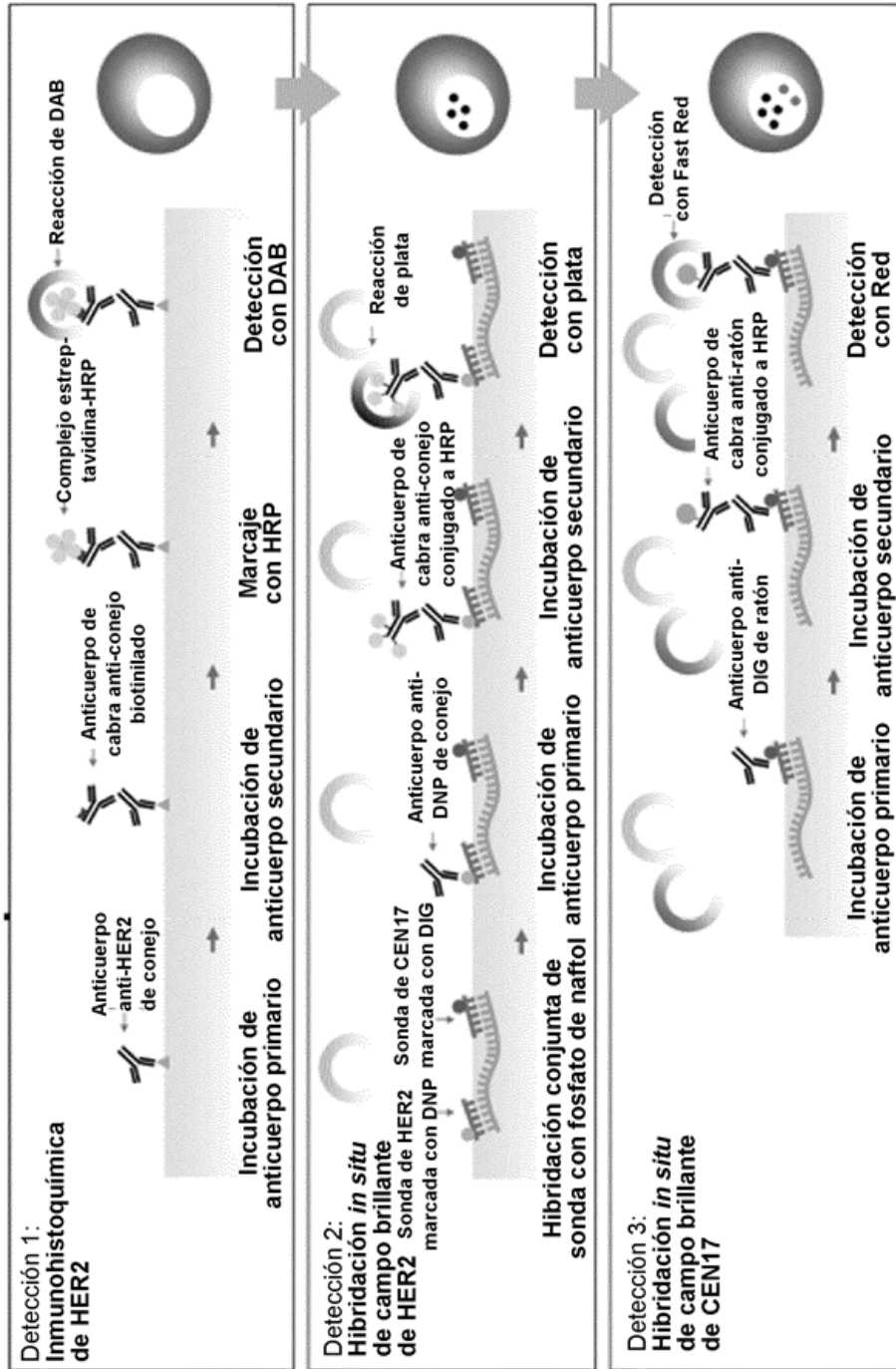
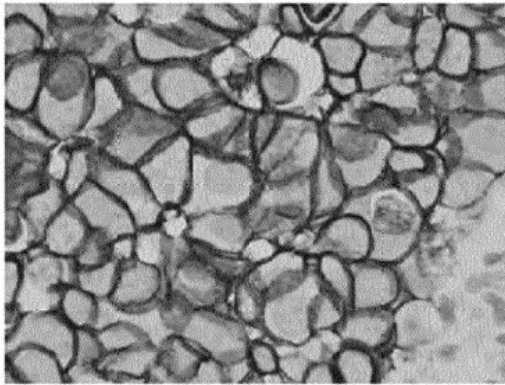


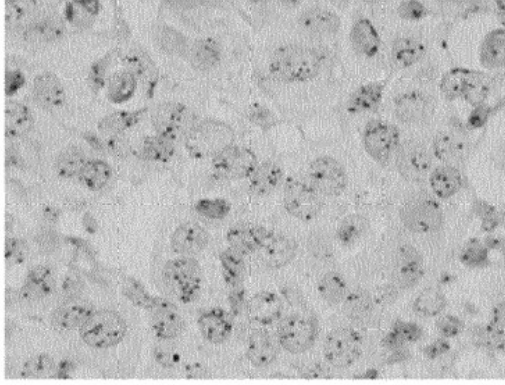
FIG. 16A

**Evaluación técnica de GPA de HER2
en cáncer de mama**

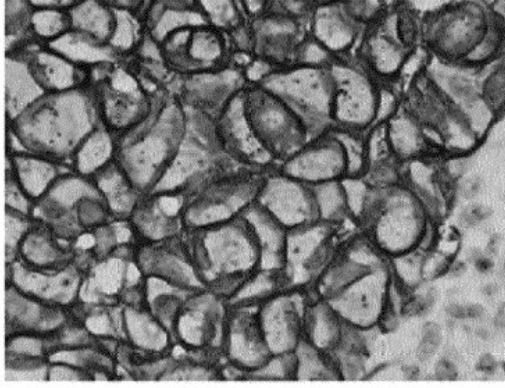
Caso 3+ para IHC de HER2



IHC de HER2



PLACA DE HER2



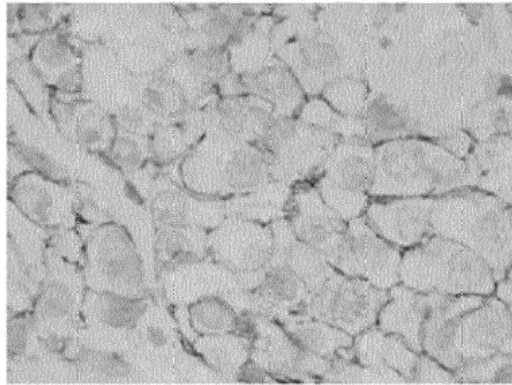
GPA DE HER2

Objetivo 60X

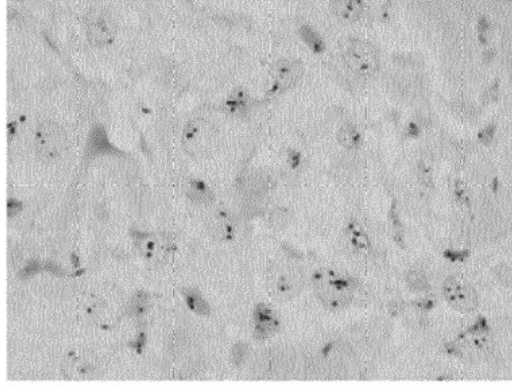
FIG. 16B

**Evaluación técnica de GPA de HER2
en cáncer de mama**

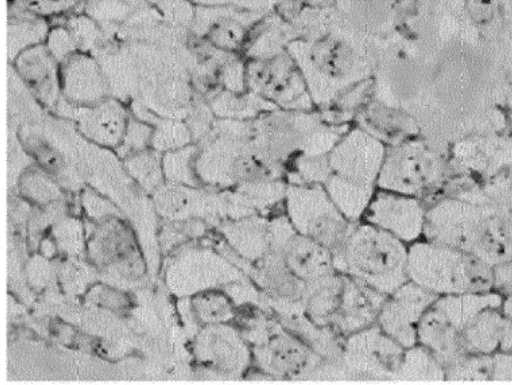
Caso 2+ para IHC de HER2



IHC de HER2



PLACA DE HER2



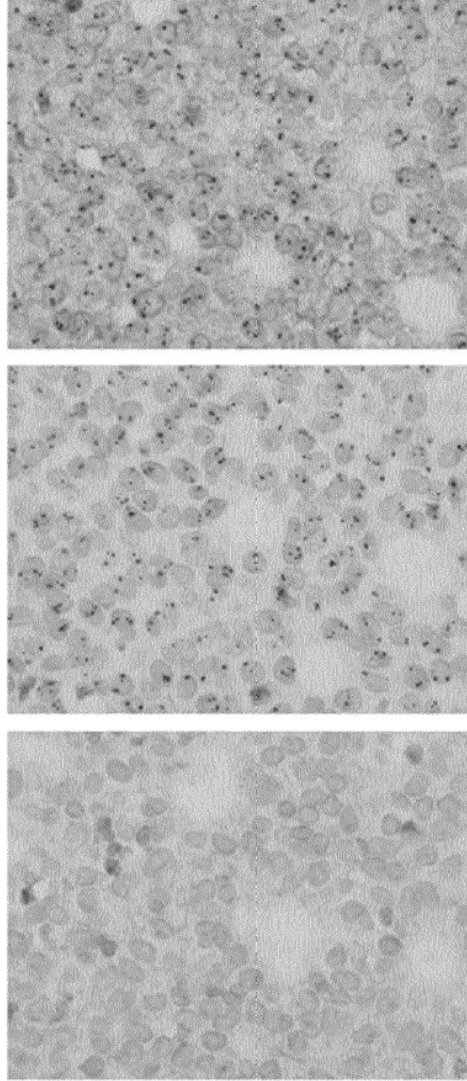
GPA DE HER2

Objetivo 60X

FIG. 16C

**Evaluación técnica de GPA de HER2
en cáncer de mama**

Caso 1+ para IHC de HER2



IHC de HER2

Objetivo 60X

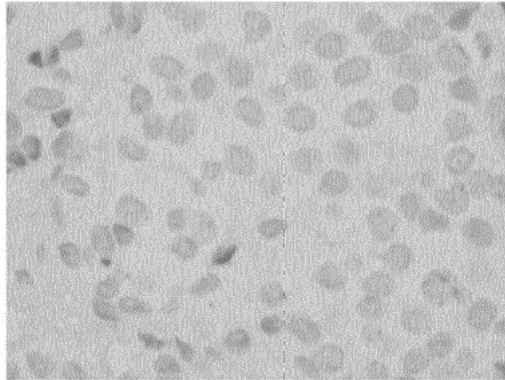
PLACA DE HER2

GPA DE HER2

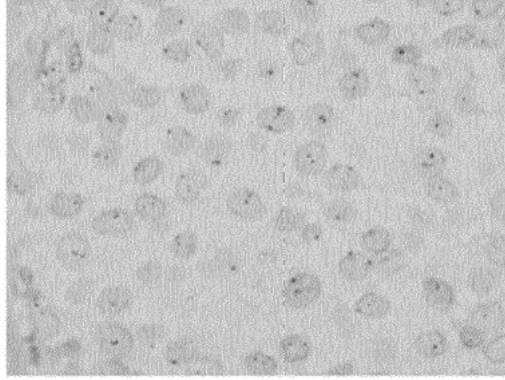
FIG. 16D

**Evaluación técnica de GPA de HER2
en cáncer de mama**

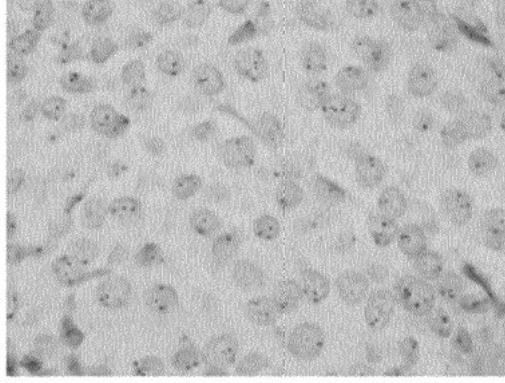
Caso 0 para IHC de HER2



IHC de HER2



PLACA DE HER2



GPA DE HER2

Objetivo 60X

FIG. 17

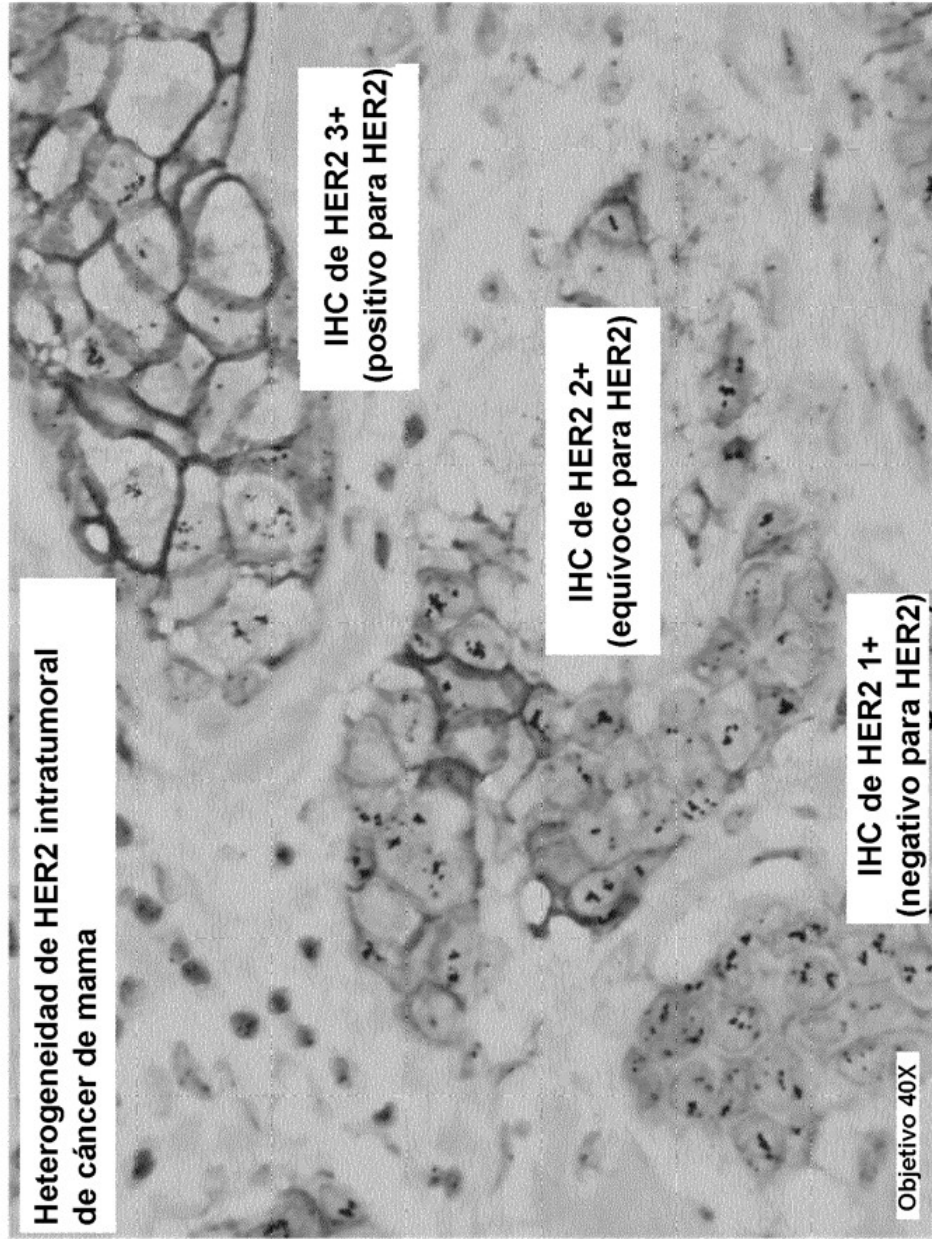


FIG. 18

