



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102439452 B

(45) 授权公告日 2015.04.15

(21) 申请号 201080009544.4

(22) 申请日 2010.01.15

(30) 优先权数据

61/145,029 2009.01.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.08.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/021272 2010.01.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/083463 EN 2010.07.22

(73) 专利权人 美国控股实验室公司

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 M·贝茨 J·W·库克 G·迪德里希

L·古德曼 A·慕克吉 G·帕里

J·斯珀林德 S·J·威廉斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006.01)

(56) 对比文件

EP 1918386 A9, 2008.07.09, 说明书第
12-13 页.

CN 101230390 A, 2008.07.30, 全文.

CN 1928563 A, 2007.03.14, 全文.

US 2008254497 A1, 2008.10.16, 全文.

US 7402398 B2, 2008.07.22, 全文.

US 2007037228 A1, 2007.02.15, 全文.

HUANG W ET AL..Quantitative

measurements of HER2 expression and HER2:
HER2 dimerization identity subgroups of
HER2 positive metastatic breast cancer
patients with different probabilities of
response to trastuzumab treatment..《BREAST
CANCER RESEARCH AND TREATMENT》.2007, 第 106
卷 (第 1 期), S86.

Ali Mukherjee, et al..Correlation of
ErbB activation status and clinical
response in Herceptin treated breast
cancer patients..《Proc Amer Assoc Cancer
Res》.2005, 第 46 卷摘要.

BATES M P ET AL..HER2 expression
and HER2:HER2 dimerization identifies
subpopulations of metastatic breast cancer
patients with different probabilities of
long-term survival following trastuzumab
treatment and with different requirements
forconcomitant chemotherapy.《JOURNAL OF
CLINICAL ONCOLOGY》.2007, 第 25 卷 (第 18S
期), 1-3.

审查员 王晓媛

权利要求书4页 说明书33页 附图8页

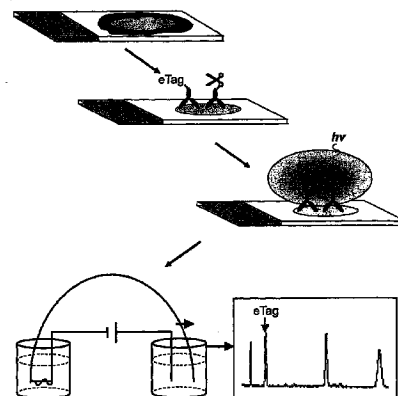
(54) 发明名称

通过测量 HER-2 表达确定患者应答的方法

(57) 摘要

提供用于确定或评定患者对治疗 (尤其是, 对癌治疗) 的应答的方法。所述方法包括: 分析样品中 HER2 种标记物单独或与其他生物标记 (例如 HER3 标记物) 组合的存在或缺乏。在某些实施例中, 可能的进展用时间可通过首先确定 HER2 阳性患者, 然后通过使用第 2 生物标记 (例如 HER3 标记物) 的存在或缺乏进一步分划来测定。此外, 数据可用于追踪患者对治疗方案的应答, 评定使用特定方案治疗患者的期望的成功, 确定治疗方案

的效应或用于分类患者以便创建用于临床试验的同质的组。



1. 用于检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的试剂用于制备将来自受试者的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的相对水平与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联的试剂盒的用途,其中所述关联通过包括下列步骤的方法实施:

(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;以及

(b) 将 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联,

其中如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,受试者的预后是可能响应 Her-2 作用剂,

其中如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平,受试者的预后是不可能响应 Her-2 作用剂;且

其中如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或小于第 1 阈值水平,受试者的预后是欠可能响应 Her-2 作用剂。

2. 权利要求 1 的用途,其中癌是转移性或初始早期阶段乳腺癌中的至少一种。

3. 权利要求 1 的用途,其中 Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白 - 蛋白相互作用的量的测定来测量。

4. 权利要求 1 的用途,其中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量使用 **VERATAG®** 测定来测量。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述方法还包括:

测量生物样品中的至少一种其他生物标记的量,如果所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,且小于第 2 阈值水平,以及

基于所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种和所述生物样品中的至少一种其他生物标记的量指示显著事件的风险。

6. 权利要求 5 的用途,其中至少一种其他生物标记包括下列之至少一种:FOX M1, PRAME, Bcl2, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFR3, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chk1, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG1, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3; CTSB, Her3, DIABLO, VEGF, CD31, KDR 或 p95。

7. 权利要求 1 的用途,其中所述方法还包括测量生物样品中 Her-3 表达的量,如果所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,且小于第 2 阈值水平,其中

所述受试者更可能响应 Her-2 作用剂,如果 Her-3 表达量小于 Her-3 阈值水平,且

所述受试者欠可能响应 Her-2 作用剂,如果 Her-3 表达量大于 Her-3 阈值水平。

8. 权利要求 7 的用途,其中 Her-3 表达包括 Her-3, Her-3 同源二聚体或 Her-3/Her-2 异源二聚体。

9. 权利要求 8 的用途,其中生物样品中 Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-3/Her-2 异源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白 - 蛋白相互作用的量的测定来测量。

10. 权利要求 8 或 9 的用途,其中 Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-3/Her-2 异源二聚体的量使用 **VERATAG®**测定来测量。

11. 用于检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的试剂用于制备用于预测患癌且用 Her-2 作用剂治疗的受试者中与疾病进展相关的时间进程的试剂盒的用途,其中所述预测通过包括下列步骤的方法实施:

(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;以及

(b) 将所述 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量与所述与疾病进展相关的时间进程关联,

其中相比所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量小于第 1 阈值水平、或等于或大于第 2 阈值水平的情况,如果所述 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平、且小于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平,则所述受试者具有更长的与疾病进展相关的时间进程。

12. 权利要求 11 的用途,其中癌是转移性或初始早期阶段乳腺癌中的至少一种。

13. 权利要求 11 的用途,其中所述时间进程作为从用 Her-2 作用剂治疗开始至显著的事件而被测量,其中所述显著的事件包括:癌从一个阶段到更高阶段的进展,到转移性疾病的进展,复发,手术或死亡。

14. 权利要求 11 的用途,其中 Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。

15. 权利要求 11 的用途,其中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量使用 **VERATAG®**测定来测量。

16. 权利要求 11 的用途,其中所述方法还包括:

测量生物样品中的至少一种其他生物标记的量,如果所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量大于第 1 阈值水平,但小于第 2 阈值水平,以及

基于所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种及所述生物样品中的至少一种其他生物标记的量指示显著的事件的风险。

17. 权利要求 16 的用途,其中至少一种其他生物标记包括:FOX M1, PRAME, Bcl2, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFRC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chk1, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG11, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3; CTSB, Her3, DIABLO, VEGF, CD31, KDR 或 p95。

18. 权利要求 16 的用途,

其中所述至少一种其他生物标记包括 Her-3, 且

其中如果所述生物样品中 Her-3 的量大于 Her-3 阈值水平,则所述受试者的显著的事件的风险增加。

19. 用于检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的试剂用于制备将来自受试者的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的相对水平与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联的试

剂的用途,其中所述关联通过包括下列步骤的方法实施:

(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;以及

(b) 将 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联,

其中如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,受试者的预后是可能响应 Her-2 作用剂,

其中如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平,受试者的预后是不可能响应 Her-2 作用剂;且

其中如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或小于第 1 阈值水平,受试者的预后是欠可能响应 Her-2 作用剂。

20. 权利要求 19 的用途,其中癌是转移性或初始早期阶段乳腺癌中的至少一种。

21. 权利要求 19 的用途,其中 Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白 - 蛋白相互作用的量的测定来测量。

22. 权利要求 19 的用途,其中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量使用 **VERATAG®** 测定来测量。

23. 权利要求 19 的用途,其中所述方法还包括:

测量生物样品中的至少一种其他生物标记的量,如果所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,且小于第 2 阈值水平,以及

基于所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种和所述生物样品中的至少一种其他生物标记的量指示显著事件的风险。

24. 权利要求 23 的用途,其中至少一种其他生物标记包括下列之至少一种:FOX M1, PRAME, Bcl2, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFR3, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chk1, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG1, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3; CTSB, Her3, DIABLO, VEGF, CD31, KDR 或 p95。

25. 权利要求 19 的用途,其中所述方法还包括测量生物样品中 Her-3 表达的量,如果所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,且小于第 2 阈值水平,其中

所述受试者更可能响应 Her-2 作用剂,如果 Her-3 表达量小于 Her-3 阈值水平,且

所述受试者欠可能响应 Her-2 作用剂,如果 Her-3 表达量大于 Her-3 阈值水平。

26. 权利要求 25 的用途,其中 Her-3 表达包括 Her-3, Her-3 同源二聚体或 Her-3/Her-2 异源二聚体。

27. 权利要求 25 的用途,其中 Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-3/Her-2 异源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白 - 蛋白相互作用的量的测定来测量。

28. 权利要求 26 或 27 的用途,其中 Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-3/Her-2 异源二聚体的量使用 **VERATAG®** 测定来测量。

29. 用于检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一

种的量的试剂用于制备用于预测患癌且用 Her-2 作用剂治疗的受试者中与疾病进展相关的时间进程的试剂的用途,其中所述预测通过包括下列步骤的方法实施:

(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;以及

(b) 将所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量与所述与疾病进展相关的时间进程关联,

其中相比所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量小于第 1 阈值水平、或等于或大于第 2 阈值水平的情况,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平、且小于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平,则所述受试者具有更长的与疾病进展相关的时间进程。

30. 权利要求 29 的用途,其中癌是转移性或初始早期阶段乳腺癌中的至少一种。

31. 权利要求 29 的用途,其中所述时间进程作为从用 Her-2 作用剂治疗开始至显著的事件而被测量,其中所述显著的事件包括:癌从一个阶段到更高阶段的进展,到转移性疾病的进展,复发,手术或死亡。

32. 权利要求 29 的用途,其中生物样品中 Her-2 同源二聚体的量使用能测量和/或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。

33. 权利要求 29 的用途,其中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量使用 **VERATAG®** 测定来测量。

34. 权利要求 29 的用途,其中所述方法还包括:

测量生物样品中的至少一种其他生物标记的量,如果所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量大于第 1 阈值水平,但小于第 2 阈值水平,以及

基于所述生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种及所述生物样品中的至少一种其他生物标记的量指示显著的事件的风险。

35. 权利要求 34 的用途,其中至少一种其他生物标记包括:FOX1,PRAME,Bcl2,STK15,CEGP1,Ki-67,GSTM1,CA9,PR,BBC3,NME1,SURV,GATA3,TFRC,YB-1,DYPD,GSTM3,RPS6KB1,Src,Chk1,ID1,EstR1,p27,CCNB1,XIAP,Chk2,CDC25B,IGF1R,AK055699,P13KC2A,TGFB3,BAG11,CYP3A4,EpCAM,VEGFC,pS2,hENT1,WISP1,HNF3A,NFKBp65,BRCA2,EGFR,TK1,VDR,Contig51037,pENT1,EPHX1,IF1A,CDH1,HIF1 α ,IGFBP3;CTSB,Her3,DIABLO,VEGF,CD31,KDR 或 p95。

36. 权利要求 34 的用途,

其中所述至少一种其他生物标记包括 Her-3,且

其中如果所述生物样品中 Her-3 的量大于 Her-3 阈值水平,则所述受试者的显著的事件的风险增加。

通过测量 HER-2 表达确定患者应答的方法

【0001】 【相关申请的交叉引用】

【0002】 本申请根据 35USC § 119(e) 要求提交于 2009 年 1 月 15 日的美国临时申请 61/145,029 的权益和优先权,将其通过引用整体并入本文。

【技术领域】

【0003】 本发明提供用于确定是否癌患者可能响应用 Her-2 作用剂治疗的方法。方法通过使用另一生物标记(例如 HER3 标记物)的存在或缺乏进一步分划它们来提供 HER2 阳性患者亚类的可能的进展用时间。

【背景技术】

【0004】 个体细胞表面受体(例如 Her-2)的表达水平已用作生物标记。常规免疫组织化学(IHC)或荧光原位杂交(FISH)分析已用于检测 Her-2 过表达,以测定是否用 Her-2 作用剂(例如,曲妥珠单抗)的治疗被保证。而且,美国专利 4,968,603 说明 Her-2 表达作为癌生物标记。但是,在 2 个不同的研究中,仅 20%或 35%的过表达 Her-2 的患者客观地响应曲妥珠单抗治疗。见 Baselga et al,1996, J. Clin. Oncol. 14 :737-44 ;Cobleigh et al,1999, J. Clin. Oncol. 17 :2639-48 ;和 Vogel et al.,2002, J. Clin. Oncol. 20 :719-26。而且,在转移性乳腺癌环境中曲妥珠单抗加化学治疗的组合的其他研究中,仅约 50%的过表达 Her-2 的患者客观地响应曲妥珠单抗联合治疗。见 Slamon 等人, N Engl J Med 344 :783-92。

【0005】 目前,确定是否患癌受试者可能或不可能响应用 Her-2 作用剂(例如曲妥珠单抗)的治疗成为问题。确定是否所述患者不可能响应曲妥珠单抗和/或其他 Her- 作用剂将避免对那些患者提供耗资但无效的治疗。例如,测定测定患者对 Her-2 作用剂的灵敏度也可用于鉴定患者不可能响应 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂,由此允许受试者避免化学治疗剂的潜在地毒性效应。而且,测定患者对 Her-2 作用剂的灵敏度的测定可用于预测疾病的时间进程或 Her-2 阳性患者的疾病中显著的事件的概率。由此,需要测定是否癌患者会响应 Her-2 作用剂的方法,从而最大化患者治疗。

【0006】 【发明概述】

【0007】 本发明提供用于确定是否患癌受试者可能响应用 Her-2 作用剂治疗的方法。例如,在某些实施方式中,本发明包括将来自受试者的生物学样品中总 Her-2(H2T)或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的相对水平与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联的方法,所述方法包括:(a)检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;及(b)将 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联。

【0008】 在某些实施方式中,本发明也提供基于患者对于 Her-2 作用剂的预测的灵敏度预测疾病的时间进程和/或患癌受试者的疾病的时间进程中的显著的事件的概率的方法。在某些实施方式中,所述方法包括检测与对用本文后述的 Her-2 作用剂的治疗的应答相关的生物标记或生物标记的组合,及确定是否受试者可能响应用 Her-2 作用剂治疗。在某些实

施方式中,所述方法包括检测生物标记或生物标记的组合,以及预测与疾病进展相关的时间进程或患癌受试者的疾病的时间进程中的显著的事件的概率。

[0009] 例如,在某些实施方式中,本发明包括用于预测患癌且用 Her-2 作用剂治疗的受试者是否可能具有显著的事件的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;及(b) 将 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量与受试者会具有显著的事件的可能性关联。

[0010] 在其他方面,本发明针对用于确定是否患癌受试者可能响应用 Her-2 作用剂治疗的方法。在另一方面,本发明针对用于预测疾病的时间进程的方法。在另一方面,方法针对用于预测疾病的时间进程中显著的事件的概率的方法。

[0011] 在本发明的各方法的某些实施方式中,所述方法包括:检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量和确定是否 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体与低或高 Her-2 表达水平关联。

[0012] 在本发明的各方法的某些实施方式中,高 Her-2 表达是 $\log_{10}H2T$ (总 Her-2 的 $\log_{10}$) $\geq$ 约 1.14 ~ 1.125。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,高 Her-2 表达包括非常高和 / 或中等高的表达。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,非常高 Her-2 表达是 $\log_{10}H2T >$ 约 1.84 ~ 2.21。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,中等高 Her-2 表达在约 1.14 ~ 1.25 和 1.84-2.21 之间的 $\log_{10}H2T$ 之间 (即 $\geq 1.14 \sim 1.25$ 及 $\leq 1.84-2.21$)。或者,依赖于监控的患者同群和 / 或显著的事件可使用其他范围。由此,本文所述的各阈值和 / 或阈值范围可当以 $\log_{10}$ 标尺描述时 0.5 个对数单位或在线性标度上以约 25% 变化或更少 (即是 $\leq 25\%$ 大于和 / 或 $\leq 25\%$ 小于本文中公开的特定范围),或以约 20% 或更少,或以约 15% 或更少,或以约 10% 或更少,或以约 5% 或更少。

[0013] 在某些实施方式中,如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。

[0014] 在一些实施方式中,如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。

[0015] 而且,在一些实施方式中,如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是非常高和 / 或低,则患者不可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有短时间进程。

[0016] 由此,在某些实施方式中,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量在第 1 阈值以上水平 (例如, " 高 "),受试者的预后是可能响应 Her-2 作用剂。另外,在某些实施方式中且如本文中更细节讨论,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量在高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平以上 (例如, " 非常高 "),受试者的预后是不可能响应 Her-2 作用剂。

[0017] 在某些实施方式中,癌是乳腺癌。在一些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在一些实施方式中,乳腺癌是早期阶段 (即辅佐性) 乳腺癌。在某些实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,方法用 **VERATAG®** 测定进行。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0018] 在某些实施方式中,预定测量通过将患者样品分成至少 3 个患者亚组来创建。例如,在某些实施方式中,患者被分为的具有低 Her-2 表达的亚组 (即 Her2 总和 / 或 Her-2 二聚体) 和具有高 Her-2 表达的亚组。具有高 Her-2 表达的亚组可再分为具有非常高 Her-2 和

中等高 Her-2 表达的组。由此,在某些实施方式中,亚组数是 3 从而患者样品被分为:Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体非常高的患者亚组,Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体低的亚组,及 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体中等高的亚组。在某些实施方式中,受试者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量相当于任一高亚组或低亚组;如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者可能具有长时间进程。

[0019] 例如,在本文中公开的各方法的某些实施方式中,预定测量通过将多个受试者样品分成至少 3 个亚组来创建,其中第 1 亚组包括以低水平具有 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的样品,其中低水平包括具有等于或小于第 1 阈值水平的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种,且具有等于或大于第 1 阈值的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的样品包括具有高水平的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的样品,以及其中然后将具有高水平的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的样品分成 2 个亚组,非常高亚组包括具有等于或大于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的样品,且中等高亚组包括具有大于或等于第 1 阈值水平和小于或等于第 2 阈值水平的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的样品。

[0020] 在本发明的方法的各实施方式中,其中测量 Her-2, Her-3 表达可包括 Her-2, Her-2 同源二聚体或 Her-2 异源二聚体。例如,在某些实施方式中,总 Her-2, Her-2 同源二聚体和 / 或 Her-2 异源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。

[0021] 在另一实施方式中,Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体中等高的亚组(即中等)进一步亚分为表达另一生物标记的亚组。其他生物标记可为下列中的至少一种:FOX M1, PRAME, Bcl2, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFR3, YB-I, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chk1, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFβ3, BAG1, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFκBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1α, IGFBP3; CTSB, Her3 或 DIABLO。在某些实施方式中,其他生物标记可为 VEGF, CD31, KDR, p95 或 Her3。在其他实施方式中,生物标记可为 Her3。额外的标记物可用于区别 Her-2 亚组。

[0022] 在某些实施方式中,预定测量通过将 Her-2 中等高患者样品分为至少 2 个患者亚组来创建。在某些实施方式中,亚组数是 2,从而患者样品被分为:Her-3 表达高的亚组患者和 Her3 表达低的另一亚组患者。

[0023] 由此,在本发明的各方法的某些实施方式中,其中还基于 Her-3 表达细分中等高亚组,其中高水平包括具有等于或大于第 1 阈值水平的 Her-3,而低水平包括具有第 1 阈值水平以下的 Her-3,且其中具有中等高水平的 Her-2 和 / 或 Her-2 二聚体中的至少一种和低水平的 Her-3 的受试者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或其中具有中等高水平的 Her-2 和 / 或 Her-2 二聚体中的至少一种和高水平的 Her-3 的受试者不可能或欠可能响应 Her-2 作用剂。

[0024] 当测量 Her-3 时,Her-3 表达可包括 Her-3, Her-3 同源二聚体或 Her-3 异源二聚体。例如,在某些实施方式中,总 Her-3, Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-3 异源二聚体(例如, Her2/Her-3)的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。

[0025] 例如,在一实施方式中,Her3 高表达的截止值(相比 Her3 低表达)是 0.158。或

者,可使用约 25%更低和 / 或 25%更高的值。由此,本文所述的各阈值和 / 或阈值范围可在 log10 标尺上以约 0.5 个对数单位变化和 / 或在线性标度上以 25%或更少变化(即 ≤ 25%大于和 / 或 ≤ 25%小于本文中公开的特定范围),或以约 20%或更少,或以约 15%或更少,或以约 10%或更少,或以约 5%或更少。

[0026] Her3 高对比低截止值的实际的值可依赖于监控的患者同群和 / 或显著的事件变化。在某些实施方式中,亚组数大于 3,包括,无限制地,4 个亚组,5 个亚组和 6 个亚组。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。在某些优选的实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0027] 在另一方面,本发明针对用于确定是否患有 Her-2 阳性癌的受试者可能响应用 Her-2 作用剂治疗和 / 或疾病的时间进程长的方法。在另一方面,本发明针对用于预测患有 Her-2 阳性癌的受试者中疾病时间进程的方法。在另一方面,本发明针对用于预测患有 Her-2 阳性癌的受试者中显著的事件的概率的方法。

[0028] 由此,在各公开的方法的某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,且 Her-3 表达低,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。在某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,且 Her-3 表达高,则患者不可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有短时间进程。在某些实施方式中,生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在某些实施方式中,乳腺癌是早期阶段(即辅佐性)乳腺癌。在某些实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0029] 在某些实施方式中,测量 Her-2 的量。在某些实施方式中,测量 Her-2 同源二聚体的量。例如,在某些实施方式中,将总 Her-2 水平与 Her-2 同源二聚体的水平关联,以至于任一测量提供相同的预后指示(即是否患者将响应 Her-2 作用剂)。在某些实施方式中,Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。在某些实施方式中,测定是 **VERATAG®** 测定。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0030] 在另一方面,本发明提供用于确定是否患有 Her2- 阳性癌的受试者不可能响应用 Her-2 作用剂治疗和 / 或患者可能具有短时间进程的方法。在某些实施方式中,所述方法包括检测来自受试者的癌的生物样品中的 Her-2 量,其中如果 Her-2 量低,受试者不可能响应用 Her-2 作用剂治疗和 / 或患者可能具有短时间进程。在某些优选的实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0031] 在另一方面,本发明针对用于确定是否患有 Her-2 阳性癌的受试者不可能响应用至少一种 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂治疗和 / 或患者可能具有短时间进程的方法。在某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的水平高和 / 或非常高,则患者不可能响应至少一种 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂。

[0032] 在某些实施方式中,生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在其他实施方式中,乳腺癌是早期阶段(即

辅佐性) 乳腺癌。在某些实施方式中, Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中, 化学治疗剂是紫杉醇。在某些实施方式中, 测量总 Her-2 量。在某些实施方式中, 测量 Her-2 同源二聚体的量。在某些实施方式中, Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。在某些实施方式中, 测定是 **VERATAG®** 测定。在某些实施方式中, 响应的可能性相应于总体存活率, 进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0033] 再一方面, 本发明提供用于测量 Her-2 的试剂盒和用于关联 Her-2 表达与患者可能响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的使用说明。在某些实施方式中, 本发明也提供用于基于患者对于 Her-2 作用剂的预测的灵敏度预测疾病的时间进程和 / 或患癌受试者的疾病的时间进程中的显著的事件的概率的试剂盒。在某些实施方式中试剂盒包括测量额外的标记物的试剂。其他生物标记可为下列中的至少一种: FOXM1, PRAME, Bcl2, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM11, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFRC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chk1, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG11, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFkBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3; CTSB, Her3 或 DIABLO。在某些实施方式中, 其他生物标记可为 VEGF, CD31, KDR, p95 或 Her3。

[0034] 在本文中公开的各实施方式的其他方面, 本发明提供治疗患癌受试者的方法。一方面, 所述方法包括确定受试者患癌, 根据本发明的方法其可能响应用 Her-2 作用剂的治疗和 / 或具有长时间进程, 及给受试者施用有效量的 Her-2- 作用剂作为所述确定的结果。在另一方面, 所述方法包括确定受试者患癌, 根据本发明的方法其可能响应用 Her-2 作用剂的治疗, 然后给出给受试者施用有效量的 Her-2- 作用剂的治疗选项的医学专业性建议。在另一方面, 所述方法包括确定受试者患癌, 其具有短时间进程和 / 或不可能响应 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂。在某些实施方式中, Her-2- 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中, 化学治疗剂是紫杉醇。在某些实施方式中, 癌是乳腺癌。在某些实施方式中, 乳腺癌是转移性的。

【附图说明】

[0035] 本发明可参考以下非-限制图更好地理解。

[0036] 图 1 显示根据本发明的实施方式的 FFPE **VERATAG®** 测定的概略图。

[0037] 图 2A 和图 2B 显示扩散反应性纯态氧切割 **VERATAG®** 报告分子和根据本发明的替代性实施方式的抗体之间的共价接头的 **VERATAG®** 反应。

[0038] 图 3 随着平行的 Her-2 IHC 显微照片显示对 4 种良好表征的乳腺癌细胞系产生的 **VERATAG®** 信号的代表性的电泳图谱。根据本发明的实施方式, 坐标图左侧表示细胞系, 中间显示相应电泳图谱, 及右侧显示相应 IHC。

[0039] 图 4 显示根据本发明的实施方式的全部 HER2 阳性患者的进展用时间 (TTP)。

[0040] 图 5 显示根据本发明的实施方式的通过 Her2 基因扩增的 FISH 检测测定的 HER2 阴性或阳性患者的 TTP。

[0041] 图 6 显示根据本发明的实施方式的是无关于通过基因扩增的 FISH 测量分类而不响应用曲妥珠单抗治疗的低 HER2 表达者的患者的 TTP。

[0042] 图 7 显示根据本发明的实施方式,是非常高 HER2 表达者 ($H2T \geq 1.84$) 和 / 或低 HER2 表达者 ($H2T < 1.14$, 无关于 FISH) 的患者的 TTP 不响应用曲妥珠单抗治疗以及具有中等高水平 (1.14 和 1.84 之间的 H2T) 的 HER2 表达的患者。

[0043] 图 8 显示根据本发明的实施方式的具有中等高量的 HER2 及通过 FISH 测定为阳性的患者的 TTP,可进一步分划为 HER3 过表达 (H3Thi) 或表达不足 (H3Tlo),其中 HER3 表达不足相比 HER3 过表达,与对用曲妥珠单抗治疗增加的应答相关。

[0044] 图 9 显示根据本发明的实施方式的初始早期阶段 (即辅佐性) Her-2 阳性样品的研究,其中图 B 显示,相比具有不是如图 A 所示非常高的 Her-2 的样品,具有 $H2T > 2.21$ 的截止值的 CISH 阳性,非常高 **VERATAG®** H2T 患者显示少受益于添加曲妥珠单抗到化学治疗。

[0045] 【发明详述】

[0046] 本文中的术语“实施方式”和“方面”互换使用。

[0047] 本文中的术语“约”除非另有说明,指不多于 10% 以上或以下被该术语修饰的值的值。例如,术语“约 $5 \mu\text{g/kg}$ ”是指从 $4.5 \mu\text{g/kg}$ 到 $5.5 \mu\text{g/kg}$ 的范围。作为另一例,“约 1 小时”是指从 48 分钟到 72 分钟的范围。

[0048] “抗体”是指特异性地结合,及由此定义为互补于,另一分子的特定空间和极性组织的免疫球蛋白。抗体可为单克隆,多克隆或重组抗体,且可通过本领域熟知的技术 (例如宿主免疫和血清收集) (多克隆) 或通过制备连续的杂交细胞系和收集分泌的蛋白 (单克隆),或通过克隆和表达编码至少天然的抗体的特异性结合需要的氨基酸序列的核苷酸序列或其经诱变的形式来制备。抗体可包括完全免疫球蛋白或其片段,该免疫球蛋白包括各类和同种型,例如 IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b 和 IgG3, IgM, 等。其片段可包括 Fab, Fv 和 $F(ab')_2$, Fab' , 等。抗体也可作为单链抗体或抗原-结合其片段,嵌合抗体,人源化的抗体或任何本领域技术人员已知保留特异于特定结合位点的结合活性的其他抗体衍生物。此外,只要维持对于特定结合位点的结合亲和性且适当就可使用免疫球蛋白或它们的片段的聚集体,聚合物和缀合物。用于免疫测定的抗体和抗体衍生物的产生和选择,包括所述采用可释放的分子标签的测定 (如以下所述) 的介绍可见于容易得到的文本和手册,例如, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Howard and Bethell, 2001, *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, CRC Press; Wild, ed., 1994, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press, New York。

[0049] “抗体结合组合物”是指包括一种或更多种抗体,或结合分子的抗原-结合片段,及从所述抗体或抗体-结合片段衍生其结合特异性的分子或分子复合物。抗体结合组合物包括,但不限于, (i) 抗体对,其中第 1 抗体特异性地结合到靶分子,而第 2 抗体特异性地结合到第 1 抗体的恒定区;生物素化的抗体,其特异性地结合到靶分子和链霉亲和素蛋白,该蛋白用部分 (例如分子标签或光敏化剂等) 经生物素部分衍生; (ii) 抗体,其特异于靶分子和缀合于聚合物 (例如葡聚糖),其进而,用部分 (例如分子标签或光敏化剂),任一直接通过共价键或间接经链霉亲和素-生物素连接衍生; (iii) 抗体,其特异于靶分子和缀合于珠,或微珠,或其他固相支持物,其进而,任一直接或间接用部分 (例如分子标签或光敏化剂,或含后者的聚合物) 衍生。

[0050] “抗原决定簇”或“表位”是指单个抗体分子结合于其上的分子（通常蛋白）表面上的位点。通常，蛋白具有几种或许多不同的抗原决定簇和与不同特异性的抗体反应。优选的抗原决定簇是蛋白的磷酸化位点。

[0051] “结合化合物”应指抗体结合组合物，抗体，肽，细胞表面受体的肽或非-肽配体，蛋白，寡核苷酸，寡核苷酸类似物（例如肽核酸），凝集素或能特异性结合靶蛋白或分子或与目的分析物（例如蛋白复合物）形成稳定的复合物的任何其他分子实体。一方面，结合化合物，其可通过以下式呈现，包括一种或更多种附接到结合部分的分子标签。

[0052] “结合部分”指分子标签可直接或间接附接于其上，且能特异性结合分析物的任何分子。结合部分包括，但不限于，具有达约 1000Da 的分子量且含选自氢，碳，氧，氮，硫和磷的原子的抗体，抗体结合组合物，肽，蛋白，核酸和有机分子。优选，结合部分是抗体或抗体结合组合物。

[0053] “癌”和“癌性的”指或描述生理条件生物，包括哺乳动物，其一般表征为未经调节的细胞生长。癌的例包括，但不限于，癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤及白血病。所述癌的更特定例包括：鳞状细胞癌，肺癌，例如，小-细胞肺癌或非-小细胞肺癌；消化道癌，胰腺癌，成胶质细胞瘤，子宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，结直肠癌，子宫内膜癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝脏癌和各类型的头和颈癌。

[0054] “化学治疗剂”是指化学物质，主要是用于治疗病情，尤其癌的细胞毒性或细胞生长抑制剂。化学治疗剂应包括所述化合物，例如本文中所示的紫杉醇。

[0055] 本文中的“可切割的连接”指可在不降解结构或影响与结合部分用可切割的连接连接的分子标签的检测特征的条件切割的化学连接基团。

[0056] 本文中的“切割-诱导部分”或“切割剂”是产生能切割（优选通过氧化）可切割的连接的活性物质的基团。优选，活性物质是呈现短-寿命的活性，从而其切割-诱导效应仅在其产生位点附近的化学物质。

[0057] 本文中的“切割探针”指试剂，其包括本文中定义的切割-诱导部分和抗体结合组合物，抗体，肽，细胞表面受体的肽或非-肽配体，蛋白，例如生物素或链霉亲和素，寡核苷酸，寡核苷酸类似物（例如肽核酸），凝集素或能特异性结合靶蛋白或分子或与目的分析物（例如蛋白复合物）形成稳定的复合物的任何其他分子实体。

[0058] **"VERATAG®"** **"VERATAG®"**和**" VERATAG®测定"**互换使用，且指用于进行和利用所述测定的单次和多进行的和多-标记物测定，材料，方法和技术，包括但不限于与那些测定相关的试剂，分析过程和软件。所述测定公开于本申请以及在美国专利 7, 105, 308, 将其通过引用并入本文中，包括任何附图。

[0059] “FFPE”应指一组细胞或一定量的固定的组织，尤其常规福尔马林-固定的石蜡-包埋样品。所述样品一般，无限制地，用于测定封固于显微镜载玻片或相当的表面的薄的切片形式（例如 3 ~ 10 μ m 厚）的固定的组织中的受体复合物。所述样品也一般经历常规再-水合过程，且任选，抗原收回过程作为测定测量的部分，或在测定测量之前。

[0060] 本文中的“危害比”指用于产生相对风险的估计值的统计学方法。“危害比”是一组对比另一组的预测的危害之间的比。例如，可评定用 Her-2 作用剂治疗对比未用 Her-2 作用剂治疗的患者群是否或不 Her-2 作用剂在增加疾病的远处复发用时间中有效。危害比可然后相当于独立性测量，例 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比。在 Her-2 同源二聚体与总

Her-2 比例中,危害比小于 1,用 Her-2 作用剂治疗具有功效的机会更大。在 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 比例中,危害比无法从 1 区别,用 Her-2 作用剂治疗具有功效的机会更低。

[0061] " Her-2" , " ErbB2" , " c-Erb-B2" , " HER2" , " Her2" 和 " neu" 在本文中互换使用,且指天然的 Her-2,及其等位基因变体,如所述,例如,在 Semba 等人,1985, P. N. A. S. USA 82 :6497-650 和 Yamamoto et al,1986, Nature 319 :230-234 和 Genbank 登录号 X03363。除非另有说明,术语 " Her-2" , " ErbB2" , " c-Erb-B2" , " HER2" 和 " Her2" 在本文中指人蛋白。编码 Her2 的基因在本文中表示为 " erbB2" 。本文中的 H2T 应指例如无限制地,通过**VERATAG®**所示的总 Her-2 表达。

[0062] 本文中的 " Her-2- 作用剂" 指可抑制 Her-2 或表达 Her-2 的细胞或 Her-2 阳性癌细胞的生物学活性的化合物。所述生物学活性包括,但不限于,二聚化,自磷酸化,另一受体的磷酸化,信号转导等。生物学活性可包括,无限制地,细胞存活和细胞增值,及所述活性通过 Her-2 作用剂的抑制可为:直接或间接细胞杀伤(例如 ADCC),蛋白复合物破坏或复合物形成,蛋白运输或酶抑制的调节。生物学活性也可包括本申请所示的患者应答。例示 Her-2- 作用剂包括,但不限于,大分子 4D5 和曲妥珠单抗和小分子例如 AEE-788 和拉帕替尼。参考细胞表面 Her-2 膜受体," Her-2 同源二聚体" 指 2 个或更多个膜-结合的 Her-2 蛋白的复合物。二聚体通常由彼此接触的 2 个受体构成。二聚体可通过被动过程(例如范德华相互作用,等)在细胞表面膜中创建,或二聚体可通过活性过程(例如通过配体-诱导的二聚化,共价连接,与细胞内成分的相互作用等)创建。见,例如, Schlessinger,2000, Cell 103 :211-225。本文中的术语 " 二聚体" 理解为指 " 细胞表面膜受体二聚体",除非从上下文看出别的理解。本文中的 H22D 应指例如无限制地,通过**VERATAG®**所示的定量的二聚体。

[0063] " Her-2 同源二聚体与总 Her-2 比" 指根据本领域技术人员可用的任一定量方法的描述来自受试者的组织的样品中 Her-2 同源二聚体的量除以总 Her-2 量的测量。

[0064] 本文中的 " Her-2 阳性" 癌,癌细胞,受试者或患者,指当使用**HercepTest®** (DakoCytomation California Inc., Carpinteria, CA) 时呈现至少 2 的分值的癌,细胞受试者或患者,或已通过 FISH 鉴定的癌,癌细胞,受试者或患者。在某些实施方式中,Her-2 阳性细胞使用 HercepTest 呈现至少 2+ 或 3+ 的分值。

[0065] " 高" 指测量,其大于正常,大于标准(例如预定测量或亚组测量),或其相对大于另一亚组测量。例如,高 Her-2 指大于正常 Her-2 测量的 Her-2 测量。正常 Her-2 测量可根据本领域技术人员可用的任何方法测定。高 Her-2 也可指等于或大于预定测量(例如预定截止值)的测量。高 Her-2 也可指高 Her-2 个亚组相比另一亚组具有相对更大的 Her-2 的水平 Her-2 测量。例如,无限制地,根据本说明书,2 个不同的患者亚组可通过围绕以数学方法测定的点分组样品来创建,例如,无限制地,中位,由此创建测量高(即高于中位)的亚组和测量低的另一亚组。Her-2 可通过本领域技术人员已知的任何方法测量,例如,无限制地,使用**VERATAG®**或使用任何标准免疫组织化学(IHC)方法例如**HercepTest®**。作为另一例,高 Her-2 同源二聚体指在特定组样品或 Her-2 阳性患者中大于正常 Her-2 同源二聚体的测量的 Her-2 同源二聚体的测量。正常 Her-2 同源二聚体测量可根据本领域技术人员可用的任何方法测定。高 Her-2 同源二聚体也可指大于预定测量(例如预定截止值)的测量。高 Her-2 同源二聚体也可指高 Her-2 同源二聚体亚组相比另一亚组具有相对更高

的 Her-2 同源二聚体的水平的 Her-2 同源二聚体的测量。Her-2 同源二聚体可通过本领域已知的任何方法测量,例如荧光共振能量转移 (FRET),生物发光共振能量转移 (BRET),接近连接测定 (PLA),二聚体-特异性抗体或**VERATAG®**或本领域技术人员熟知的任何其他方法。作为另一例,高 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比可指具有大于任一中等或低比亚组的测量的一个或更多亚组 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比例。高 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比例可根据本领域技术人员可用的任何个体定量方法测定。在一些情况中,“高”表达水平可包括非常高的表达范围和“中等高”的表达范围,其中中等高是大于正常,但小于“非常高”的表达水平。本文提供高(包括非常高和中等高)Her-2 表达的范围例。

[0066] 本文中的“中等高”、“中等”或“中等”指大于“低”和小于非常“高”的测量。例如,“中等”可用于描述落入 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比例的测量的中部范围的至少 3 个亚组中的一个或多个。

[0067] 本文中的“可能”指物品,对象,事物或人会发生的增加的概率。由此,在一个实例中,可能响应用曲妥珠单抗治疗的受试者具有相对于参照受试者或受试者组响应用曲妥珠单抗治疗的增加的概率。

[0068] 本文中的“长”指时间测量,其大于正常,大于标准(例如预定测量或亚组测量),且其相比另一亚组测量相对更长。例如,相应于患者的寿命,长时间进展指相比正常时间进展更长的时间进展。是否时间进展长或不长可根据本领域技术人员可用的任何方法测定。长可包括,例如,无进展。在一实施方式中,“长”指大于疾病中显著的事件发生需要的中位时间进程的时间。

[0069] 术语“低”指小于正常,小于标准(例如预定测量或亚组测量),且其相对小于另一亚组测量的测量。例如,低 Her-2 是指 Her-2 阳性患者的特定组样品中小于正常 Her-2 测量的 Her-2 测量。正常 Her-2 测量可根据本领域技术人员可用的任何方法测定。低 Her-2 也可指小于预定测量(例如预定截止值)的方法。低 Her-2 也可指低 Her-2 个亚组相对低于另一亚组的测量。例如,无限制地,根据本说明书,2 个不同的患者亚组可通过围绕以数学方法测定的点分组样品来创建,例如,无限制地,中位,由此创建相应于测量高的另一组测量低(即小于中位)的组。Her-2 可通过本领域技术人员已知的任何方法测量,例如,无限制地,使用**VERATAG®**方法或使用任何标准免疫组织化学(IHC)方法例如**HercepTest®**。作为另一例,低 Her-2 同源二聚体指特定组样品或 Her-2 阳性患者中小于正常 Her-2 同源二聚体的测量的 Her-2 同源二聚体的测量。低 Her-2 同源二聚体也可指小于预定测量(例如预定截止值)的测量。低 Her-2 同源二聚体也可指低 Her-2 同源二聚体亚组相对小于另一亚组的测量。Her-2 同源二聚体可通过本领域已知的任何方法测量,例如荧光共振能量转移 (FRET),生物发光共振能量转移 (BRET),接近连接测定 (PLA),二聚体-特异性抗体或**VERATAG®**或本领域技术人员熟知的任何其他方法。作为另一例,低 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比可指具有小于任一中等或高比亚组的测量的一个或更多亚组 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比例。低 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比例可根据本领域技术人员可用的任何个体定量方法测定。本文提供 Her-2 表达的低值范围例。

[0070] 本文中的“分子标签”指可从其他分子基于分离的分子中的一种或更多种物理,化学或光学差异来区分的分子,包括但不限于,电泳迁移率,分子量,形状,溶解度, pKa,疏

水性,带电性,荷质比,极性。一方面,多种或一组分子标签在电泳迁移率和光学检测特征上不同,并可通过电泳分离。在另一方面,多种或一组分子标签可在分子量,形状,溶解度,pKa,疏水性,带电性,极性上不同,且可通过正相或反相 HPLC,离子交换 HPLC,毛细管电层析,质量光谱学,气相层析等技术分离。

[0071] 本文中的“最佳截止值”指对呈现允许最佳区别属性的 2 个类别之间的某些属性的受试者的预定测量的值。例如,求出允许最佳区别高 H2T 表达和低 H2T 表达的 2 个类别之间的最佳截止值的值,用于确定 OS。最佳截止值用于分离具有低于或高于最佳截止值的值的受试者,以优化预测模型,例如,无限制地,以最大化模型的特异性,最大化模型的灵敏度,最大化结果中的差异,或最小化来自危害比或应答差异的 p- 值。

[0072] “总体存活”或“OS”指如从治疗开始到死亡或潜意识抑制测量的时间。潜意识抑制可来自研究结束或治疗变化。总体存活可指概率,例如,以在特定时间活着的 Kaplan-Meier 图代表的概率,该时间是治疗开始到死亡或潜意识抑制之间的时间。

[0073] “光敏化剂”应指当通过光将分子氧转变成纯态氧活化的光吸收分子。

[0074] “RECIST”应是“实体瘤中的应答评估标准”的简称,是一组定义治疗期间癌患者改善(“响应”),保持相同(“稳定的”)或变差(“进展”)的公开的规则。RECIST 定义的应答标准已公开,例如,在 Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, No. 3, 2000 年 2 月 2 日,且 RECIST 标准可包括其他类似公开定义及规则集。本领域技术人员将了解遵照 RECIST 标准的定义,本文中的例如“PR”、“CR”、“SD”和“PD”。

[0075] “相对荧光单位”或“RFU”互换使用,且应指相比标准,使用任意荧光单位的特定毛细管电泳峰的时间积分。相应于 **VERATAG®**, RFU 与注射进毛细管电泳的 **VERATAG®** 浓度成比例,以及通过,例如,注射和毛细管差异导入一些期望的变异性。

[0076] “相对峰面积”或“RPA”互换使用,且应指特定 **VERATAG®** 的 RFU 和已知的和常数浓度的已知的内部荧光标准的 RFU 之间的比。

[0077] “应答”、“响应”治疗,及其他形式的此动词,在本文中的指受试者对用 Her-2- 作用剂的治疗的反应。作为例,受试者响应用 Her-2 作用剂治疗,如果受试者中的肿瘤生长延迟约 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 或更多。在另一例中,受试者响应用 Her-2 作用剂的治疗,如果受试者肿瘤缩减约 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 或更多,如通过任何适当的测量测定的,例如,通过质量或体积。在另一例中,受试者响应用 Her-2 作用剂治疗,如果受试者经历预期寿命延长约 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 或更多超过在未施用治疗时预测的预期寿命。在另一例中,受试者响应用 Her-2 作用剂的治疗,如果受试者具有增加的无疾病存活,总体存活或增加的进展用时间。几种方法可用于测定是否患者响应治疗包括 RECIST 标准,如以上所示。

[0078] “样品”或“组织样品”或“患者样品”或“患者细胞或组织样品”或“样本”各指从受试者或患者组织获得的一批类似细胞。组织样品的来源可为来自新鲜,冷冻和 / 或保存的器官或组织样品或活组织检查或吸入的固体组织;血或任何血成分;体液例如脑脊液,羊水,腹膜液或间质液;或来自受试者妊娠或发育中的任何时间的细胞。组织样品可含未与天然组织天然地混合的化合物,例如防腐剂,抗凝剂,缓冲液,固定剂,营养剂,抗生素等。细胞可以常规方式固定,例如以 FFPE 方式。

[0079] 本文中的“短”指时间测量,其短于正常,短于标准(例如预定测量或亚组测量),

且其相对短于另一亚组测量。例如,相应于患者的寿命,短时间进展指短于正常时间进展的时间进展。是否时间进展短或不短可根据本领域技术人员可用的任何方法测定。在一实施方式中,“短”指小于疾病中显著的事件发生需要的中位时间进程的时间。

[0080] 本文中的“显著的事件”应指患者的疾病中如由本领域技术人员测定为重要的事件。显著的事件例包括,例如,无限制地,初始诊断,死亡,复发,患者的疾病是转移性的确定,患者的疾病的复发或患者的疾病从以上提及的任一阶段到另一阶段的进展。显著的事件可用于评定 OS, TTP 和 / 或使用 RECIST 等由本领域技术人员测定的其他应答标准的任何重要的事件。

[0081] 本文中的术语“受试者”和“患者”互换使用。本文中的术语“受试者”和“受试者”指动物,优选哺乳动物包括非-灵长类动物(例如,牛,猪,马,驴,山羊,骆驼,猫,狗,豚鼠,大鼠,小鼠,羊)和灵长类动物(例如,猴,例如短尾猴,大猩猩,黑猩猩和人)。

[0082] 本文中的“时间进程”应指初始事件和随后事件之间的时间量。例如,相应于患者的癌,时间进程可涉及患者的疾病和可通过计量在疾病过程中的显著的事件来测量,其中第 1 事件可为诊断,而随后事件可为转移,例如。

[0083] “进展用时间”或“TTP”指如从治疗开始到进展或癌或潜意识抑制测试的时间。潜意识抑制可来自研究结束或来自治疗中的变化。进展用时间也可表示为概率,例如,在 Kaplan-Meier 图中,其中进展用时间可代表经特定时间无进展的概率,该时间是治疗开始到进展或潜意识抑制之间的时间。

[0084] “治疗(treat)”、“治疗(treatment)”和此词的其他形式指施用 Her-2- 作用剂,以防止癌生长,以导致癌的重量或体积缩减,以延长受试者的期望的存活时间和 / 或肿瘤进展用时间等。

[0085] “不可能”指相应于参照,事件,物品,对象,事物或人会发生的降低的概率。由此,不可能响应除了曲妥珠单抗之外用紫杉醇治疗的受试者相对于参照受试者或受试者组具有响应用紫杉醇和曲妥珠单抗治疗的降低的概率。

[0086] 由此,本发明的实施方式提供用于确定是否患癌受试者可能响应用 Her-2 作用剂的治疗和 / 或用于预测疾病的时间进程和 / 或患癌受试者的疾病的时间进程中的显著的事件的概率的方法。在某些实施方式中,所述方法包括:检测与对用本文所述的 Her-2- 作用剂的治疗的应答相关的生物标记或生物标记的组合,及确定是否受试者可能响应用 Her-2 作用剂治疗。在某些实施方式中,所述方法包括检测生物标记或生物标记的组合,以及预测与疾病进展相关的时间进程或患癌受试者的疾病的时间进程中的显著的事件的概率。

[0087] 一方面,本发明针对用于确定是否患癌受试者可能响应用 Her-2 作用剂的治疗的方法。在另一方面,本发明针对用于预测疾病的时间进程的方法。在另一方面,方法针对用于预测疾病的时间进程中显著的事件的概率的方法。

[0088] 在某些实施方式中,时间进程通过确定患者的疾病过程中显著的事件之间的时间来测量,其中测量预测是否患者具有长时间进程。例如,在优选的实施方式中,显著的事件是从初始诊断到死亡的进展。在优选的实施方式中,显著的事件是从初始诊断到转移性疾病的进展。在优选的实施方式中,显著的事件是从初始诊断到复发的进展。在优选的实施方式中,显著的事件是从转移性疾病到死亡的进展。在优选的实施方式中,显著的事件是从转移性疾病到复发的进展。在优选的实施方式中,显著的事件是从复发到死亡的进展。在

某些实施方式中,时间进程相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0089] 在某些实施方式中,所述方法包括检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。

[0090] 由此,在某些实施方式中,本发明包括将来自受试者的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量的相对水平与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联的方法,所述方法包括:(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;及 (b) 将 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量与对于受试者会响应用 Her-2 作用剂治疗的可能性的预后关联。

[0091] 在某些实施方式中,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于第 1 阈值水平,受试者的预后是可能响应 Her-2 作用剂。另外,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平,受试者的预后是不可能响应 Her-2 作用剂。

[0092] 而且,在某些实施方式中,预定测量通过将多个受试者样品分成至少 3 个亚组来创建,其中第 1 个亚组包括以低水平具有 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的样品,其中低水平包括具有 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或小于第 1 阈值水平,且具有等于或大于第 1 阈值的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的样品包括具有高水平的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的样品,以及其中然后将具有高水平的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的样品分成 2 个亚组,非常高亚组包括具有等于或大于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的样品,且中等高亚组包括具有大于或等于第 1 阈值水平和小于或等于第 2 阈值水平的量的 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的样品。

[0093] 如本文中讨论,在某些实施方式中,Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。

[0094] 在本发明的各方法的某些实施方式中,高 Her-2 表达是 $\log_{10}H2T \geq$ 约 1.14 ~ 1.125。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,高 Her-2 表达包括非常高和 / 或中等的表达。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,非常高 Her-2 表达是 $\log_{10}H2T \geq$ 约 1.84 ~ 2.21。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,中等高表达在 1.14 ~ 1.25 和 1.84 ~ 2.21 之间。或者,可依赖于监控的患者同群和 / 或显著的事件使用其他范围(即达本文所述的约 25%左右)。

[0095] 在某些实施方式中,癌是乳腺癌。在一些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在一些实施方式中,乳腺癌是早期阶段(即辅佐性)乳腺癌。或者,可监控可敏感于 Her-2 作用剂的任何癌。Her-2 作用剂可为任何 Her-2 作用剂。在某些实施方式中,Her-2 作用剂是本文所述的制剂之一。例如,在某些实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0096] 在本发明的各方法的某些实施方式中,中等高 Her-2 个亚组进一步亚分为表达至少一种其他生物标记的亚组。例如,在一些实施方式中,预定测量通过基于至少一种其他生物标记的水平将 Her-2 介质和 / 或 Her-2 高样品分为至少 2 个亚组来产生。

[0097] 至少一种其他生物标记可,在替代性实施方式中,包括下列之至少一种:FOXMI,

PRAME, Bcl2, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFRC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chk1, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG11, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3; CTSB, Her3, DIABLO, VEGF, CD31, KDR 或 p95。

[0098] 例如,在某些实施方式中,还基于 Her-3 表达细分中等高亚组,其中高水平包括具有等于或大于第 1 阈值水平的 Her-3,而低水平包括具有第 1 阈值水平以下的 Her-3,且其中具有中等高水平的 Her-2 和 / 或 Her-2 二聚体中的至少一种和低水平的 Her-3 的受试者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或其中具有中等高水平的 Her-2 和 / 或 Her-2 二聚体中的至少一种和高水平的 Her-3 的受试者不可能或欠可能响应 Her-2 作用剂。其中测量 Her-3, Her-3 表达包括 Her-3, Her-3 同源二聚体或 Her-3 异源二聚体 (例如, Her-2/Her-3)。

[0099] 在某些实施方式中,测定用 **VERATAG®** 测定进行。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0100] 在某些实施方式中,所述方法包括检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高 (例如,中等),则患者组可为进一步亚分为高 Her-3 表达者及低 Her-3 表达者。在此实施方式中,具有中等高 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体和低 Her-3 的患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。在替代性实施方式中, Her-3 表达者可表达 Her-3, Her-3 同源二聚体或 Her-2/Her3 异源二聚体。

[0101] 在某些实施方式中测量 Her2 和 Her3 二者,癌是乳腺癌。在一些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在其他实施方式中,乳腺癌是早期阶段 (即辅佐性) 乳腺癌。或者,可监控其他 Her-2 敏感性癌。Her-2 作用剂可为任何 Her-2 作用剂。在某些实施方式中, Her-2 作用剂是本文所述的制剂之一。例如,在某些实施方式中, Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,测定用 **VERATAG®** 测定进行。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0102] 在某些实施方式中,预定测量通过将患者样品分为至少 2 个患者亚组来创建。在某些实施方式中,亚组数是 3 从而患者样品被分为: Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体非常高的患者亚组, Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体低的亚组, 及 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体中等高的亚组 (即中等)。各亚 - 组可然后进一步亚分为 Her-3 高或中等的亚组。

[0103] 可将 Her-2 同源二聚体的水平与总 Her-2 水平紧密关联。由此,在本发明的各方法某些实施方式中,受试者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量相当于非常高亚组,中等高亚组,或低亚组中的至少一个。如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,及 Her-3 表达者低,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者可能具有长时间进程。如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,及 Her-3 表达者高,则患者不可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者可能具有短时间进程。在某些实施方式中,亚组数大于 2, 包括,无限制地, 3 个亚组, 4 个亚组, 5 个亚组和 6 个亚组。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准测量。在某些优选的实施方式中, Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0104] 在某些实施方式中,预定测量是最佳截止值。本文中公开了所述最佳截止值,及某

些本发明的实施方式旨在包括与本文中提及和公开的量近似的量。在某些实施方式中,受试者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量相当于最佳截止值,如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高(例如,之间约 1.14 ~ 1.25 和 1.84 ~ 2.21H2T),则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者的时间进程可能长。在另一实施方式中,如果 Her-2 量高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或时间进程可能长。在另一实施方式中,如果 Her-2 量高,及 Her-2 同源二聚体的量和 / 或 Her-2 同源二聚体与 Her-2 的比低,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或时间进程可能长。在另一实施方式中,如果 Her-2 量高和 Her-2 量二聚体高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或时间进程可能长。

[0105] 在另一方面,本发明针对用于确定是否患有 Her-2 阳性癌的受试者可能响应用 Her-2 作用剂的治疗和 / 或疾病的时间进程长的方法。在另一方面,本发明针对用于预测患有 Her-2 阳性癌的受试者中疾病时间进程的方法。在另一方面,本发明针对用于预测患有 Her-2 阳性癌的受试者中显著的事件的概率的方法。

[0106] 例如,本发明可包括用于预测患癌且用 Her-2 作用剂治疗的受试者是否可能具有显著的事件的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量;及(b) 将 Her-2 或 Her-2 同源二聚体的量与受试者会具有显著的事件的可能性关联。

[0107] 在一个实施方式中,显著的事件是:诊断与癌之间减少的时间和下列之至少一种:初始诊断,癌从一个阶段到更高阶段的进展,到转移性疾病的进展,复发,手术或死亡。也在某些实施方式中,方法可还包括预测期间可发生显著的事件的时间进程。

[0108] 在一个实施方式中,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或小于第 1 阈值水平,显著的事件是受试者欠可能响应 Her-2 作用剂。另外,如果 Her-2 或 Her-2 同源二聚体中的至少一种的量等于或大于高于第 1 阈值水平的第 2 阈值水平,受试者的预后是不可能响应 Her-2 作用剂。

[0109] 在优选的实施方式中,时间进程通过确定患者的疾病过程中显著的事件之间的时间来测量,其中测量预测是否患者具有长时间进程。在一实施方式中,显著的事件是从初始诊断到死亡的进展。在另一实施方式中,显著的事件是从初始诊断到转移性疾病的进展。再一实施方式中,显著的事件是从初始诊断到复发的进展。在另一实施方式中,显著的事件是从转移性疾病到死亡的进展。在另一实施方式中,显著的事件是从转移性疾病到复发的进展。在另一实施方式中,显著的事件是从复发到死亡的进展。在某些实施方式中,时间进程相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 或其他应答标准测量。

[0110] 在某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量高和 / 或中等高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。在某些实施方式中,生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在其他实施方式中,癌是早期阶段(即辅佐性)乳腺癌。或者,可监控敏感于 Her-2 作用剂的其他癌。如本文中提及,Her-2 作用剂可为已知的制剂之一。在某些实施方式中,Her-2- 作用剂是曲妥珠单抗。或可使用其他 Her-2 作用剂。

[0111] 在某些实施方式中,测量 Her-2 的量。在某些实施方式中,测量 Her-2 同源二聚体的量。在某些实施方式中,Her-2 同源二聚体的量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白 - 蛋

白相互作用的量的测定来测量。在某些实施方式中,测定是**VERATAG®**测定。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准测量。

[0112] 在某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-3 量和 / 或 Her-3 同源二聚体以及 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-3 量和 / 或 Her-3 同源二聚体高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。在某些实施方式中,生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的。或乳腺癌可为早期阶段(即辅佐性)乳腺癌。或者,可监控敏感于 Her-2 作用剂的其他癌。如本文中提及,Her-2 作用剂可为已知的和 / 或本文所述的制剂之一。在某些实施方式中,Her-2- 作用剂是曲妥珠单抗。

[0113] 在某些实施方式中,测量 Her-3 同源二聚体量。在某些实施方式中,Her-3 同源二聚体量使用能测量和 / 或定量样品中蛋白-蛋白相互作用的量的测定来测量。在某些实施方式中,测定是**VERATAG®**测定。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准测量。

[0114] 在某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高(即中等),然后还分析生物样品的 Her-3 表达量,其中 Her-3 表达者可表达 Her-3, Her-3 同源二聚体或 Her-2/Her3 异源二聚体。如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高和 Her-3 表达量高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。反过来,如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高和 Her-3 表达量低,则患者不可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有短时间进程。在某些实施方式中,生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的。或者,乳腺癌可为早期阶段(即辅佐性)乳腺癌。或者,可监控响应 Her-2 作用剂的任何其他癌。如本文中提及,Her-2 作用剂可为已知的和 / 或本文所述的制剂之一。在某些实施方式中,Her-2- 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,测定是**VERATAG®**测定。在某些实施方式中,响应的可能性相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准测量。

[0115] 在某些实施方式中,预定测量通过将患者样品分为至少 2 个患者亚组来创建。在某些实施方式中,亚组数是 3 从而患者样品被分为: Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体高的亚组患者,及 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体低的亚组。在某些实施方式中,高 Her-2 亚组被分为: Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体非常高的亚组,及 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体中等高的亚组(即中等)。在实施方式中;受试者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量相当于任一非常高亚组,中等高亚组,或低亚组。如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者可能具有长时间进程。如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量非常高或低,则患者不可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者可能具有短时间进程。

[0116] 在另一实施方式中,如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高和 Her-3 表达量高,则患者不可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有短时间进程。在另一实施方式中,如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高和 Her-3 表达量低,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。在某些实施方式中,亚组数大于 3,

包括,无限制地,4 个亚组,5 个亚组和 6 个亚组。在某些实施方式中,响应的可能性或时间进程相应于总体存活率,进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准测量。在某些优选的实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0117] 在某些实施方式中,预定测量是最佳截止值。本文中公开了所述最佳截止值,及某些本发明的实施方式旨在包括与本文中提及和公开的量近似的量。在某些实施方式中,受试者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量相当于最佳截止值;如果患者中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量高或中等高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者的时间进程可能长。在另一实施方式中,如果 Her-2 量高,及 Her-2 同源二聚体的量和 / 或 Her-2 同源二聚体与 Her-2 的比低,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或时间进程可能长。在另一实施方式中,如果 Her-2 量高和 Her-2 同源二聚体的量和 / 或 Her-2 同源二聚体与 Her-2 的比例高,则患者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或时间进程可能长。

[0118] 在另一方面,本发明提供用于确定是否患有 Her2- 阳性癌的受试者不可能响应用 Her-2 作用剂治疗和 / 或患者可能具有短时间进程的方法。在某些实施方式中,所述方法包括检测来自受试者的癌的生物样品中的 Her-2 量,其中如果 Her-2 量低,受试者不可能响应用 Her-2 作用剂治疗和 / 或患者可能具有短时间进程。在某些优选的实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。

[0119] 本领域技术人员已知的任何方法有用对于确定 Her-2 表达量和 / 或 Her-2 同源二聚体,和 / 或 Her-3 表达和 / 或 Her-3 同源二聚体,和 / 或 Her-2/Her-3 异源二聚体可根据本发明使用。例如,测定所述表达或二聚体量任何定量测定可用于测定细胞或癌产生多少信号,然后将信号与 VERATAG 测定中产生的信号相比,以测定 2 个测定之间的对应。所述方法可包括但不必限于 FRET, BRET, 生物分子荧光互补和接近连接测定。

[0120] 在某些实施方式中,量通过使来自患癌受试者的生物样品与分子标签通过可切割的连接和具有切割诱导 - 部分的切割探针附接于其上的结合化合物接触,并检测是否及哪个分子标签释放来测定。图 1 提供所述 FFPE **VERATAG®**测定的概略,其中将组织切片固定(最上或第 1 图),然后允许具有切割 - 诱导剂的第 1 抗体(描绘为切割工具)和连接到可检测的部分(**ETAG®**)的第 2 抗体结合(第 2 图),通过光(hv)的切割 - 诱导剂的光 - 诱导(第 3 图),e- 标签的电泳分离(第 4 图)和读出数据(最下或第 5 图)。

[0121] 在某些实施方式中,结合化合物和切割探针各特异性地结合 Her-2 或 Her-3。在某些实施方式中,切割探针和结合探针不结合相同的表位。在某些实施方式中,如果结合化合物在切割探针的切割 - 诱导部分的有效接近距离内,切割 - 诱导部分切割可切割的接头从而释放分子标签。在某些实施方式中,如果 Her-2 同源二聚体,Her-3 同源二聚体或 Her-2/Her-3 异源二聚体存在,释放的分子标签与 Her-2 单体和 / 或 Her-3 单体存在时释放的分子标签可区分。通过用于总 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的检测的测定检测 Her-2 的例由共同所有的美国专利申请公开 No. 2009/0191559 提供,其通过引用整体并入本文中。类似策略可用于测量其他生物标记,例如 Her-3, p-95 等。

[0122] 在某些实施方式中,活化切割 - 诱导部分切割可切割的接头。在某些实施方式中,结合化合物特异性地结合 Her-2 或 Her-3 表位。在某些实施方式中,结合化合物包括抗体或抗原 - 结合片段。在某些实施方式中,结合化合物特异性地结合 Her-2 配体结合位点或 Her-3 配体结合位点。在某些实施方式中,结合化合物包括 Her-2 配体和 / 或 Her-3 配体。

在某些实施方式中,结合化合物和切割探针结合相同的 Her-2 表位和 / 或 Her-3 表位。

[0123] 在某些实施方式中,及如显示使用 2 种不同的抗体(一种有切割剂及一种有标签)的 Her-2 总的测量的图 2A,及显示使用交替附接到切割剂或结合部分的单个抗体的 Her-2 二聚体测量的图 2B 中所示,测量一种或更多种 Her-2 同源二聚体,Her-3 同源二聚体或 Her-2/Her-3 异源二聚体的量的步骤包括以下步骤:(i) 在每一种 Her-2 同源二聚体中,给一种或更多种 Her-2 同源二聚体中的每一种提供特异于第 1Her-2 蛋白的切割探针(例如,在图 2A 中为抗体 15,及在图 2B 中为抗体 8),各切割探针含具有有效接近距离的切割-诱导部分;(ii) 提供特异于各一种或更多种 Her-2 同源二聚体的第 2 蛋白的一种或更多种结合化合物(例如,在图 2A 和 2B 中为抗体 8),以至于各结合化合物具有通过可切割的连接各附接于其上的一种或更多种分子标签,及以至于附接到不同的结合化合物的一种或更多种分子标签具有不同的分离特征,从而从不同的结合化合物分离分子标签之后形成分离特征不同的峰;(iii) 混合切割探针,结合化合物,及一种或更多种复合物,以至于切割探针特异性地结合 Her-2 同源二聚体的第 1 蛋白,而结合化合物特异性地结合 Her-2 同源二聚体的第 2 蛋白,以及以至于结合化合物的可切割的连接在切割探针的切割-诱导部分的有效接近距离内,从而释放分子标签;及(iv) 分离和鉴定释放的分子标签,以测定 Her-2 同源二聚体的存在或缺失或量。

[0124] 在某些实施方式中,测量一种或更多种 Her-2 同源二聚体,Her-3 同源二聚体或 Her-2/Her-3 异源二聚体的量的步骤包括以下步骤:(i) 在每一种 Her-2 同源二聚体中,给各一种或更多种 Her-2 同源二聚体提供特异于第 1Her-2 蛋白的切割探针,各切割探针含具有有效接近距离的切割-诱导部分;(ii) 提供特异于各一种或更多种 Her-3 同源二聚体的第 2 蛋白的一种或更多种结合化合物,以至于各结合化合物具有通过可切割的连接各附接于其上的一种或更多种分子标签,及以至于附接到不同的结合化合物的一种或更多种分子标签具有不同的分离特征,从而从不同的结合化合物分离分子标签之后形成分离特征不同的峰;(iii) 混合切割探针,结合化合物,及一种或更多种复合物,以至于切割探针特异性地结合 Her-3 同源二聚体的第 1 蛋白,而结合化合物特异性地结合 Her-3 同源二聚体的第 2 蛋白,以及以至于结合化合物的可切割的连接在切割探针的切割-诱导部分的有效接近距离内,从而释放分子标签;及(iv) 分离和鉴定释放的分子标签,以测定 Her-3 同源二聚体的存在或缺失或量。

[0125] Her-2/Her-3 异源二聚体可使用特异于 Her-2 和 Her-3 的切割探针和结合探针类似地测定,例如,特异于 Her-2 的切割探针和特异于 Her-3 的结合探针和 / 或特异于 Her-3 的切割探针和特异于 Her-2 的结合探针。

[0126] 本发明涉及 Her-2- 作用剂。Her-2- 作用剂可为本领域技术人员已知的任何所述制剂。在某些实施方式中 Her-2 作用剂选自:4D5,曲妥珠单抗,AEE-788 和拉帕替尼。在优选的实施方式中,Her-2- 作用剂是曲妥珠单抗(赫赛汀®)。见,例如,Goldenberg,1999, Clin Ther. 21 :309-18 ;and Shak,1999, Semin Oncol. 26 :71-7。而且,其他 Her-2 作用剂可使用本文所述的方法评价。

[0127] 可适于用作生物标记的含 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体和 / 或 Her-3 和 / 或 Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-2/Her-3 异源二聚体的样品可来自广泛的来源,包括细胞培养,动物或植物组织,患者活组织检查等。优选,样品是人患者样品。使用常规技术制

备用于本发明的测定的样品,其可取决于获取样品的来源。对于活组织检查和医学样本,介绍见于以下参考文献:Bancroft JD & Stevens A, eds.1977, Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, Edinburgh, ;Pearse,1980, Histochemistry. Theory and applied. 4th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh。

[0128] 在癌性的疾病状态领域,可使用的患者组织样品例包括,但不限于,乳腺,前列腺,卵巢,结肠,肺,子宫内膜,胃,唾液腺或胰腺。组织样品可通过各种过程(包括手术切除,抽取或活组织检查)得到。组织可为新鲜或冷冻的。在一实施方式中,本发明的测定在已固定和包埋进石蜡的组织样品上进行,并进行脱蜡步骤。组织样品可通过常规方法固定(即保存)。见,例如, Lee G. Luna, HT (ASCP) Ed., 1960, Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology 3rd edition, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; Ulreka V. Mikel, Ed., 1994, The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D. C. 本领域技术人员将认同,固定剂的选择由将组织组织学染色或别样分析的目的确定。本领域技术人员将也认同,固定的长度依赖于组织样品的尺寸和使用的固定剂。

[0129] 通常,首先固定组织样品,然后通过递升的系列的醇脱水,用石蜡或其他切片介质浸润和包埋,从而可切片组织样品。或者,可切片组织和固定得到的切片。例如,可将组织样品通过常规方法根据由以上提供的参考文献描述的常规技术在石蜡中包埋和处理。可使用的石蜡例包括,但不限于, Paraplast, Brolloid 和 Tissuemay。一旦包埋组织样品,样品可通过切片机根据常规技术切片。切片可具有跨约 $3\mu\text{m}$ ~ 约 $12\mu\text{m}$ 的厚度,及优选,厚度在约 $5\mu\text{m}$ ~ 约 $10\mu\text{m}$ 范围内。一方面,切片可具有约 10mm^2 ~ 约 1cm^2 的面积。一旦切割,切片可通过几种标准方法附着于载玻片。载玻片粘合剂例包括,但不限于,硅烷,明胶和聚-L-赖氨酸。石蜡包埋切片可附着到带正电的载玻片和/或用聚-L-赖氨酸包被的载玻片。

[0130] 如果石蜡已用作包埋材料,组织切片通常在检测生物标记之前脱蜡及再水化到水。组织切片可通过几种常规标准方法脱蜡。例如,可根据由以上提供的参考文献描述的常规技术使用二甲苯和逐渐降低的系列的醇。或者,可使用可商购的脱蜡非-有机试剂例如 Hemo-De® (CMS, Houston, Tex.)。

[0131] 哺乳动物组织培养细胞,或新鲜或冷冻的组织可通过常规细胞裂解技术制备(例如, 0.14M NaCl, 1.5mM MgCl_2 , 10mM Tris ~ Cl (pH8.6), 0.5% Nonidet P-40, 及蛋白酶和/或磷酸酶抑制剂,根据需要)。对于新鲜哺乳动物组织,样品制备也可包括组织解聚步骤,例如压碎,切碎,磨碎或超声处理。

[0132] 通过使用可释放的分子标签测量二聚体群提供许多优势,包括(1)从测定混合物分离释放的分子标签提供大大降低的背景和显著获得灵敏度;及(2)特别设计用于容易分离和检测的分子标签的使用提供方便的多次进行能力,从而可容易在相同的测定中同时测量多种受体复合物成分。采用所述标签的测定可具有各种形式及公开于下列参考文献:美国专利号 No. 7,105,308 和 6,627,400;公开的美国专利申请 No. 2002/0013126, 2003/0170915, 2002/0146726 和 2009/0191559;及国际专利公开 No. WO 2004/011900, 将它们各通过引用整体并入本文中。例如,可采用广泛的分离技术,其可基于分离的分子中的一种或更多种物理,化学或光学差异区别分子,所述差异包括电泳迁移率,分子量,形状,溶

解度, pKa, 疏水性, 带电性, 荷质比或极性。一方面, 多种或一组分子标签在电泳迁移率和光学检测特征上不同, 并将通过电泳分离。在另一方面, 多种或一组分子标签可在分子量, 形状, 溶解度, pKa, 疏水性, 带电性, 极性上不同, 且通过正相或反相 HPLC, 离子交换 HPLC, 毛细管电子层析, 质量光谱学或气相层析分离。

[0133] 提供可在从结合化合物释放后通过分离技术分成不同的条带或峰的多组分子标签。所述峰的鉴定和定量提供受体二聚体的存在和 / 或量的测量或特征。一组之内的分子标签可为化学多样的; 但是, 为了方便, 通常使多组分子标签化学关联。例如, 它们可全部是肽或它们可由相同的基础构建或单体的不同的组合构成或它们可使用具有用于附加不同的分离特征的不同的取代基的相同的基础支架合成。多个分子标签的数可依赖于几个因素变化, 包括采用的分离模式, 分子标签上使用的用于检测的标记物, 结合部分的灵敏度和可切割的连接切割的效率。

[0134] 直接对组织样品的测量可通过包括对细胞或组织靶的测量标准化, 其为样品中总细胞数的代表和 / 或样品中特定亚型的细胞数。额外的测量可优选, 或甚至必需, 因为患者样品 (尤其肿瘤样品, 其可包括正常细胞的实质性级分) 的细胞和组织异质性。

[0135] 如上所述, 可提供含多种不同的结合化合物的混合物, 其中各不同的结合化合物具有通过可切割的连接衔接的一种或更多种分子标签。结合化合物, 可切割的连接和分子标签的性质可广泛变化。结合化合物可包括抗体结合组合物, 抗体, 肽, 细胞表面受体的肽或非 - 肽配体, 蛋白, 寡核苷酸, 寡核苷酸类似物 (例如肽核酸), 凝集素或能特异性结合靶蛋白或分子或与目的分析物 (例如 Her-2 同源二聚体) 形成稳定的复合物的任何其他分子实体。一方面, 结合化合物可以下式表示:



[0137] 其中 B 是结合部分; L 是可切割的连接, 而 E 是分子标签。在同源测定中, 可切割的连接, L, 可为氧化 - 不稳定的连接, 及更优选地, 其为可通过纯态氧切割的连接。部分 " $-(L-E)_k$ " 表示可具有经可切割的连接衔接的多种分子标签的单个结合化合物。一方面, k 是大于或等于 1 的整数, 但在其他实施方式中, k 可大于几百, 例如 100 ~ 500 或 k 大于几百至几千, 例如 500 ~ 5000。通常各多种不同类型的结合化合物具有不同的分子标签, E。可切割的连接, 例如氧化 - 不稳定的连接, 及分子标签, E, 通过常规化学方式附接到 B。

[0138] 优选, B 是特异性地结合靶 (例如 Her-2 上的抗原决定簇) 的抗体结合组合物。本文中所示实施例中提供特异于 Her-2 表位的抗体。抗体组合物由广泛的可商购的抗体 (单克隆或多克隆) 容易形成。尤其是, 特异于表皮生长因子受体的抗体公开于美国专利 No. 5, 677, 171 ; 5, 772, 997 ; 5, 968, 511 ; 5, 480, 968 ; 5, 811, 098, 各通过引用整体并入本文。美国专利 5, 599, 681, 通过引用整体并入本文, 公开了特异于蛋白的磷酸化位点的抗体。供应商, 例如 Cell Signaling Technology (Beverly, MA), Biosource International (Camarillo, CA) 和 Upstate (Charlottesville, VA) 也提供单克隆和多克隆抗体。

[0139] 可切割的连接, L, 可实际上是可在不降解结构或影响释放的分子标签, E 的检测特征的条件切割的任何化学连接基。无论何时在同源测定形式中使用切割探针, 可切割的连接, L, 通过由切割探针产生的切割试剂切割, 所述切割探针短距离作用, 从而仅切割比邻切割探针的可切割的连接。一般, 所述试剂必需通过使反应混合物经物理或化学变化来活

化,从而制剂产生扩散到可切割的连接而实现切割的短寿命的活性物质。在同源形式中,切割制剂优选附接到结合部分,例如抗体,在活化之前将切割制剂靶向具有可释放的分子标签的结合化合物附近的特定位点。在所述实施方式中,切割制剂在本文中成为“切割-诱导部分”。

[0140] 在非-同源形式中,因为将特异性地结合的结合化合物从未结合的结合化合物分离,可用可切割的连接和切割制剂的更宽的选择。可切割的连接可不仅包括对于与局部作用反应性物质(例如过氧化氢,纯态氧等)反应不稳定的连接,但也对于在整个反应混合物操作的制剂不稳定的连接,例如碱不稳定的连接,光切割性连接,可通过还原切割的连接,通过氧化切割的连接,酸-不稳定的连接和可通过特异性蛋白酶切割的肽连接。描述许多所述连接的参考文献包括:Greene and Wuts,1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, John Wiley & Sons, New York; Hermanson,1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York; 及美国专利 No. 5,565,324。

[0141] 一方面,本发明可采用可商购的可切割的试剂系统。例如,可使用异官能制剂将二硫键导入抗体结合组合物和分子标签之间,所述异官能制剂,例如 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫代)甲苯(SMPT)等,可获自供应商,例如 Pierce 化学公司(Rockford, IL)。通过所述连接导入的二硫键可通过用还原剂处理而断裂,所述还原剂例如二硫苏糖醇(DTT),二硫赤藓糖醇(DTE),2-巯基乙醇或硼氢化钠。实现二硫键切割的还原剂的典型的浓度在 10~100mM 范围内。可使用同双官能 NHS 酯交联试剂(含对于用高碘酸钠(例如,生理 pH 的 15mM 高碘酸盐,处理 4 小时)切割灵敏的中心顺式-二醇的双琥珀酰亚胺基酒石酸盐(DST)(获自 Pierce))将氧化性不稳定的连接导入抗体结合组合物和分子标签之间。含酯化的间隔物成分的连接可于 37°C 用强亲核的制剂,例如羟胺,例如,0.1N 羟胺,pH8.5 切割 3~6 小时。所述间隔物可通过同双官能交联剂导入,例如获自 Pierce(Rockford, IL)的乙二醇双(琥珀酰亚胺基琥珀酸盐)(EGS)。碱不稳定的连接可用砷基导入。可用于将砷基导入可切割的连接的同双官能交联剂包括:双[2-(琥珀酰亚胺基氧基羰基氧基)乙基]砷(BSOCOES),及 4,4-二氟-3,3-二硝基苯基砷(DFDNPS)。用于切割的例示碱性条件包括:0.1M 磷酸钠,通过添加 Tris 碱调至 pH11.6,含 6M 脲,0.1% SDS 和 2mM DTT,于 37°C 温育 2 小时。光切割性连接也包括公开于美国专利 No. 5,986,076 的那些。

[0142] 当 L 氧化不稳定时,L 可为硫醚或其硒类似物;或烯烃,其含碳-碳双键,其中双键切割成桥氧基,释放分子标签,E。例示氧化不稳定的连接公开于美国专利 No. 6,627,400 和 5,622,929 及公开的美国专利申请 No. 2002/0013126 和 2003/0170915;各通过引用整体并入本文。

[0143] 当多种分子标签的分离通过气相色谱或质量光谱法进行时,分子标签,E,在本发明中可包括如以下参考文献中所述的电泳标签:见,例如,Zhang et al,2002, *Bioconjugate Chem.* 13:1002-1012; Giese,1983, *Anal. Chem.* 2:165-168; 及美国专利 No. 4,650,750;5,360,819;5,516,931;及 5,602,273,各通过引用整体并入本文。

[0144] 分子标签,E,优选为水溶性有机化合物,其相应于活性物质,尤其纯态氧稳定,且包括检测或报告基团。另外,E可在尺寸和结构上变化广泛。一方面,E具有约 50~约 2500Da 范围的分子量,更优选地,约 50~约 1500Da。E 可包括用于产生电化学,荧光或发色信号的

检测基团。在采用通过质量检测的实施方式中, E 可不具有用于检测目的分离部分。优选, 检测基团产生荧光信号。

[0145] 选择多数中的分子标签, 从而各相应于相同多数的其他成员具有独特分离特征和/或独特光学性质。一方面, 层析或电泳分离特征是在本领域常规的一组标准分离条件, 例如, 电压, 柱压力, 柱类型, 移动相或电泳分离介质下的滞留时间。在另一方面, 光学性质是荧光性质, 例如发射光谱, 荧光寿命或给定波长或波长带的荧光强度。优选, 荧光性质是荧光强度。例如, 多数的各分子标签可具有相同的荧光发射性质, 但各将在独特滞留时间上彼此不同。另一方面, 1 种或 2 种或更多种多数分子标签可具有相同的迁移或滞留时间, 但它们将具有独特荧光性质, 例如光谱可分辨的发射波谱, 从而多数的全部成员通过分子分离及荧光测量的组合可区分。

[0146] 优选, 释放的分子标签通过电泳分离及检测基团的荧光检测。在所述实施方式中, 具有基本上相同的荧光性质的分子标签具有不同的电泳迁移率, 从而在分离条件下在电泳图谱中形成不同的峰。优选, 将本发明的多种分子标签通过常规毛细管电泳设备, 任意在常规筛模的存在或缺乏分离。电泳分离期间或后, 分子标签通过记录分离的化合物的荧光信号和迁移时间(或迁移距离)或通过构建相对荧光的表和分子标签的迁移顺序(例如, 作为电泳图谱)检测或鉴定。优选, 分子标签的存在, 缺失和/或量通过使用如公开的美国专利申请 No. 2003/0170734A1 公开的一种或更多种标准测量, 将其通过引用整体并入本文。图 3 显示根据本发明的实施方式的 Her-2 标签的电泳分离例。

[0147] 多种分子标签也可设计用于通过基于一种或更多种物理特征的层析分离, 所述物理特征包括: 分子量, 形状, 溶解度, pKa, 疏水性, 带电性, 极性等, 例如公开于公开美国专利申请 No. 2003/0235832, 将其通过引用整体并入本文。层析分离技术基于参数(例如柱类型, 固相, 移动相等)选择, 然后是可在单次操作中分离形成不同的峰或条带的多种分子标签的选择。几个因素决定选择哪种 HPLC 技术用于发明, 包括待检测的分子标签数(即多数的大小(size of the plurality)), 测定中会产生的各分子标签的估计的量, 作为一组待在多次进行的测定中使用的候选物的合成分子标签的利用度和容易性, 采用的检测模式和 HPLC 仪表, 柱和溶剂的操作的利用度, 稳健性, 成本和容易性。通常, 柱和技术偏好可适于分析有限的量的样品及其提供最高分辨率分离。进行所述选择的介绍可见于文献, 例如, Snyder et al, 1988, Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons, New York; Millner, 1999, High Resolution Chromatography: A Practical Approach, Oxford University Press, New York; Chi-San Wu, 1999, Column Handbook for Size Exclusion Chromatography, Academic Press, San Diego; and Oliver, 1989, HPLC of Macromolecules: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, England.

[0148] 一方面, 分子标签, E, 是 (M, D), 其中 M 是迁移率-修饰部分, 而 D 是检测部分。标记“(M, D)”用于表示, M 和 D 部分的排序可为任一部分可与可切割的连接, L 相邻。这是说, “B-L-(M, D)”表示 2 种形式的结合化合物: “B-L-M-D”或“B-L-D-M”之任一。

[0149] 检测部分, D, 可为荧光标记物或染料, 发色标记物或染料或电化学标记物。优选, D 是荧光染料。用于本发明的例示荧光染料包括: 水溶性若丹明染料, 荧光素, 4, 7-二氯荧光素, 苯并吨染料和能量转移染料, 如公开于下列参考文献: 无名氏, 2002, Handbook of Molecular Probes and Research Reagents, 8th ed., Molecular Probes, Eugene, OR; 美

国专利 No. 6, 191, 278, 6, 372, 907, 6, 096, 723, 5, 945, 526, 4, 997, 928 和 4, 318, 846 ; 及 Lee et al, 1997, *Nucleic Acids Research* 25 : 2816-2822。优选, D 是荧光素或荧光素衍生物。

[0150] 一旦各结合化合物通过不同的分子标签独立地衍生, 将其与其他结合化合物合并, 以形成多种结合化合物。通常, 各不同的类型的结合化合物以相同的比例存在于组合物; 但是, 比例可作为设计选择变化, 从而一种或一个亚组的特定结合化合物取决于特定实施方式或测定的期望或需求而以更大的或更低比例存在。可影响所述设计选择的因素包括, 但不限于, 对于特定靶的抗体亲和性和亲合力, 靶的相对流行, 分子标签的检测部分的荧光特征等。

[0151] 切割-诱导部分, 或切割剂, 是产生能切割 (优选通过氧化) 可切割的连接活性物质的基团。优选, 活性物质是呈现短-寿命的活性, 从而其切割-诱导效应仅在其产生位点附近的化学物质。任一活性物质是固有地短寿命的, 从而其将不创建超过其创建接近距离的显著的背景, 或采用有效清除活性物质的清除剂, 从而其不可与超过从其产生位点短距离的可切割的连接反应。例示活性物质包括纯态氧, 过氧化氢, NADH 和羟基自由基, 苯氧基自由基, 超氧化物等。例示用于导致氧化的活性物质的猝灭剂包括聚烯, 类胡萝卜素, 维生素 E, 维生素 C, 酪氨酸, 组氨酸和谷胱甘肽的氨基酸-吡咯 N-缀合物。见, 例如 Beutner et al, 2000, *Meth. Enzymol.* 319 : 226-241。

[0152] 采用切割-诱导部分和可切割的连接的设计测定中的一种考虑是当结合到受体复合物时它们不彼此远离, 通过切割-诱导部分产生的活性物质不可有效切割可切割的连接。一方面, 可切割的连接优选在结合的切割-诱导性部分的约 1000nm 之内和优选约 20 ~ 200nm 之内。更优选地, 对于产生纯态氧的光敏化剂切割-诱导部分而言, 可切割的连接在受体复合物中光敏化剂的约 20 ~ 100nm 之内。切割-诱导部分可有效切割可切割的连接 (即为切割足够的分子标签以产生可检测的信号) 的范围在本文中称为其“有效接近距离”。本领域普通技术人员将认可, 特定敏化剂的有效接近距离可取决于特定测定设计的细节, 且可通过常规实验测定或修饰。

[0153] 敏化剂是可经诱导产生反应性中间体, 或物质, 通常为纯态氧的化合物。优选, 根据本发明使用的敏化剂是光敏化剂。其他包括在本发明的范围内的敏化剂是通过热, 光照, 电离辐射或化学活化激发会释放纯态氧分子的化合物。此类化合物的最佳已知的成员包括内过氧化物, 例如 1,4-双羧乙基-1,4-萘内过氧化物, 9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物和 5,6,11,12-四苯基萘 5,12-内过氧化物。由这些化合物的加热或直接光吸收释放纯态氧。其他敏化剂公开于 Di Mascio et al, 1994, *FEBS Lett.* 355 : 287 ; and Kanofsky, 1983, *J. Biol. Chem.* 258 : 5991-5993 ; Pierlot et al, 2000, *Meth. Enzymol.* 319 : 3-20。

[0154] 光敏化剂可直接或间接, 经共价或非-共价连接附接于类型特异性试剂的结合剂。构建所述组合物的介绍, 尤其对于抗体作为结合剂的可见于文献, 例如在光动力学治疗, 免疫诊断学, 等领域。例示介绍可见于 Ullman et al, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5426-5430 ; Strong et al, 1994, *Ann. New York Acad. Sci.* 745 : 297-320 ; Yarmush et al, 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.* 10 : 197-252 ; 及美国专利 No. 5, 709, 994, 5, 340, 716, 6, 251, 581 和 5, 516, 636。

[0155] 各种光源可用于光-活化光敏化剂, 以产生纯态氧。只要足够强, 可将多色及单色光源用作光源, 以在实践时间持续时间产生足够的纯态氧。照射长度取决于光敏化剂的性

质,可切割的连接的性质,照射光源功率和其从样品的距离。一般而言,照射时间可从小于约 $1\mu\text{s}$ 至约 10 分钟,通常在约 1ms ~ 约 60s 的范围。强度和照射长度应足以激发至少约 0.1% 的光敏化剂分子,通常至少约 30% 的光敏化剂分子和优选,基本上全部光敏化剂分子。例示光源包括激光器,例如,氦-氖激光器,氩激光器,YAG 激光器,He/Cd 激光器及红宝石激光器;光电二极管;汞,钠和氙蒸汽灯;白炽灯,例如,钨和钨/卤素及闪光灯。可适用于本发明中的方法的例示光活化装置公开于国际专利公开 No. WO 03/051669。在所述实施方式中,光活化装置是安装在允许同时照射 96 孔板的全部孔的外壳的发光二极管(LED) 阵列。

[0156] 可在本发明中利用的光敏化剂例具有以上性质和公开于美国专利 No. 5, 536, 834, 5, 763, 602, 5, 565, 552, 5, 709, 994, 5, 340, 716, 5, 516, 636, 6, 251, 581 和 6, 001, 673; 公开的欧洲专利申请 No. 0484027; Martin et al, 1990, Methods Enzymol. 186 :635-645; 及 Yarmush et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst. 10 :197-252。说道敏化剂,在某些实施方式中,光敏化剂可通过共价或非-共价附接到支持物表面或合并入支持物体部与固相支持物关联。一般而言,光敏化剂以对于达到必需量的纯态氧必需的量与支持物关联。通常,光敏化剂的量根据常规方法依经验测定。

[0157] 在一实施方式中,将光敏化剂合并入胶乳粒子,以形成光敏化剂珠,例如公开于美国专利 No. 5, 709, 994 和 6, 346, 384; 及国际专利公开 No. WO 01/84157。或者,光敏化剂珠可通过利用胶乳上的氯甲基将光敏化剂(例如玫瑰红)共价附接于 $0.5\mu\text{m}$ 胶乳珠而提供酯连接基来制备,如 J. Amer. Chem. Soc, 97 :3741 (1975) 中所述。此反应可,例如,在具有允许试剂通过施加真空除去而形成孔的一个壁(例如底部)的过滤膜的常规 96 孔或 384-孔微孔板,等中进行。如果结合化合物的特异性结合需要的缓冲液不同于任一纯态氧产生或分离需要的缓冲液,此允许缓冲液的方便的交换。例如,在基于抗体的结合化合物的情况中,需要高盐缓冲液。如果采用释放的标签的电泳分离,则通过将缓冲液更换为具有可适于电泳的更低盐浓度的缓冲液来实现更佳表现。

[0158] 作为例,切割探针可包括用多种光敏化剂分子衍生的第一半抗原化的抗体和第二抗-半抗原结合蛋白。优选的第一半抗原化的抗体是生物素化的抗体,而优选的第二抗-半抗原结合蛋白可为任一抗-生物素抗体或链霉亲和素。其他所述第一及第二试剂的组合为本领域熟知。例示的所述试剂的组合教导于 Haugland, 2002, Handbook of Fluorescent Probes and Research Reagents, Ninth Edition, Molecular Probes, Eugene, OR。以下描述例示的所述试剂的组合。具有可释放的标签("mT₁" 和 "HiT₂") 的结合化合物,及用生物素衍生的第一抗体特异性地结合到膜中受体二聚体的不同的表位。将生物素-特异性结合蛋白(例如链霉亲和素)附接到将多种光敏化剂带到结合化合物的有效接近距离的生物素。生物素-特异性结合蛋白也可为抗-生物素抗体,且光敏化剂可通过常规偶联化学(例如, Hermanson (supra)) 经游离的胺基团附接到蛋白。所述用途的例示光敏化剂是如公开于公开的欧洲专利申请 0510688 的制备的亚甲蓝的 NHS 酯。

[0159] 以下方法和特定条件和材料的一般讨论旨在阐释,而非限制。本领域技术人员将了解本文所述的方法如何可适于其他应用,尤其使用不同的样品,细胞类型和靶复合物。

[0160] 在进行本发明的方法的过程中,进行测定成分的组合,包括所测样品,结合化合物和任选切割探针。通常,测定成分可以任何顺序合并。但是,在某些应用中,添加顺序可相

关。例如,可希望,例如在定量测定中监控竞争性结合。或可希望监控组装的复合物的稳定性。在所述应用中,反应可依阶段组装。

[0161] 各试剂的量可通常依经验测定。测定中使用的样品量通过预测的数的存在的靶复合物和用于监控测定信号的分离和检测装置来测定。一般而言,结合化合物和切割探针量可以超过相对于样品中靶分子的期望的量的摩尔提供,通常以超过至少约 1.5 的摩尔,更期望超过约 10 倍,或更多。在特定应用中,使用的浓度可更高或更低,取决于单细胞上存在的结合剂和期望的量的靶分子的亲和性。当确定化合物对寡聚体细胞表面复合物的形成的效应时,可在添加探针之前,同时或后将化合物添加到细胞,取决于监控的效应。

[0162] 测定混合物可在提供探针与细胞表面分子的结合的条件下合并和温育,通常在含水培养基中,通常以生理 pH(可相当于培养细胞时的 pH),通过以约 10 ~ 200mM 范围内的浓度的缓冲液维持。可使用常规缓冲液,以及根据需要而使用其他常规添加剂,例如盐,生长培养基,稳定剂,等。正常采用生理和恒定温度。温育温度正常跨约 4° ~ 70°C,通常约 15° ~ 45°C,更通常约 25° ~ 37°C。

[0163] 集合测定混合物以及允许探针结合细胞表面分子的温育后,可处理混合物,以活化切割剂,切割来自在切割剂的有效接近距离内的结合化合物的标签,从细胞表面将相应标签释放到溶液。此处理的性质将取决于切割剂的作用机理。例如,其中采用光敏化剂作为切割剂时,切割的活化可包括以对于使用的特定敏化剂适当的光的波长照射混合物。

[0164] 切割后,然后可分析样品,以测定已释放的标签性质。当采用采用多种结合化合物的测定时,释放的标签的分离将通常先于它们的检测。分离和检测的方法在设计用于测定的标签的过程中确定。优选的分离模式采用电泳,其中各标签将基于已知的它们的电泳迁移率的差异分离。

[0165] 如上所述,在一些实施方式中,如果测定反应条件可干扰采用的分离技术,需要在分子标签的切割和分离之前去除,或更换,测定反应缓冲液。例如,当基于电泳迁移率分离分子标签时,测定条件可包括降低分离表现的盐浓度(例如特异性结合需要的)。由此,例如,在切割分子标签之前,可除去所述高盐缓冲液,及通过过滤,抽吸,稀释或其他方法用可适于电泳分离的另一缓冲液取代。

[0166] 在某些实施方式中,可给受试者施用包括曲妥珠单抗的联合治疗。联合治疗可包括曲妥珠单抗与本领域技术人员已知的(无限制地)一种或更多种任何化学治疗剂的组合。优选,化学治疗剂具有来自曲妥珠单抗的不同的作用机理。例如,化学治疗剂可为抗-代谢物(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU),甲氨喋呤(MTX),氟达拉滨,等.),抗微管制剂(例如,长春新碱;长春碱;紫杉烷例如紫杉醇和多西他赛;等.),烷基化剂(例如,环磷酰胺,美法仑,双氯乙基亚硝基脲,等.),铂制剂(例如,顺铂,卡铂,奥沙利铂, JM-216, CI-973, 等.),蒽环类抗生素(例如,多柔比星,柔红霉素,等.),抗生素制剂(例如,丝裂霉素-C,放线菌素 D,等.),拓扑异构酶抑制剂(例如,依托泊苷,喜树碱,等.)或本领域技术人员已知的任何其他化学治疗剂。

[0167] 可在本发明的各实施方式中使用的化学治疗剂的特定例,包括本发明的药物组合物,剂型和试剂盒,包括,无限制地,阿糖胞苷,美法仑,托泊替康,氟达拉滨,依托泊苷,伊达比星,柔红霉素,米托蒽醌,顺铂紫杉醇,及环磷酰胺。

[0168] 可使用的其他化学治疗剂包括:阿巴瑞克,阿地白介素,阿仑珠单抗,阿利维 A 酸,

别嘌醇,六甲蜜胺,氮磷汀,阿那曲唑,三氧化二砷,天冬酰胺酶,BCG 活,贝伐珠单抗,贝沙罗汀,博来霉素,硼替佐米,白消安,卡普罗酮,喜树碱,卡培他滨,卡铂,卡莫司汀,塞来考昔,西妥昔单抗,苯丁酸氮芥,西那卡塞,顺铂,克拉屈滨,环磷酰胺,阿糖胞苷,达卡巴嗪,更生霉素,达贝泊汀 α , 柔红霉素,地尼白介素 2,右雷佐生,多西他赛,多柔比星,屈他雄酮,埃利奥特 B 溶液,表柔比星,依泊汀 α , 雌莫司汀,依托泊苷,依西美坦,非格司亭,氟尿苷,氟达拉滨,氟尿嘧啶,氟维司群,吉西他滨,吉妥珠单抗、奥加米星,吉非替尼,戈舍瑞林,羟基脲,替伊莫单抗,伊达比星,异环磷酰胺,伊马替尼,干扰素 α -2a,干扰素 α -2b,伊立替康,来曲唑,甲酰四氢叶酸,左旋咪唑,洛莫司汀,甲氯乙胺,甲地孕酮,美法仑,疏嘌呤,美司钠,甲氨喋呤,甲氧沙林,甲泼尼龙,丝裂霉素 C,米托坦,米托蒽醌,诺龙,诺非单抗,奥利美生,奥普瑞白介素,奥沙利铂,紫杉醇,帕米膦酸二钠,培加酶,培天冬酶,培非司亭,培美曲塞,喷司他丁,哌泊溴烷,普卡霉素,聚苯丙生,吡菲尔钠,丙卡巴肼,米帕林,拉布立酶,利妥昔单抗,沙格司亭,链佐星,滑石粉,他莫昔芬,塔西法,替莫唑胺,替尼泊苷,睾内酯,硫鸟嘌呤,塞替派,托泊替康,托瑞米芬,托西莫单抗,曲妥珠单抗,维 a 酸,乌拉莫司汀,戊柔比星,长春碱,长春新碱,长春瑞滨及唑来膦酸盐。

[0169] 在另一方面,本发明针对用于确定是否患有 Her-2 阳性癌的受试者不可能响应用至少一种 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂治疗和 / 或患者可能具有短时间进程的方法。在某些实施方式中,所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的水平高或非常高,则患者不可能响应至少一种 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂。

[0170] 在某些实施方式中,可包括将具有高 Her-2 的患者分划微 2 组:非常高和中等高。分划可包括使用本文所述的 Her-2 水平。在一些实施方式中,方法可还包括检测来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量,其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等高,则将患者组进一步亚 - 分 (即分划) 为高 Her-3 表达者及低 Her-3 表达者。在一些实施方式中,相比具有中等高 (即中等) Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体和低 Her-3 的患者,具有中等高 (即中等) Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体和高 Her-3 的患者欠可能响应 Her-2 作用剂和 / 或患者具有长时间进程。在本发明的各方法某些实施方式中,高 Her-2 表达是 $\log_{10}H2T \geq \text{约 } 1.14 \sim 1.125$ 。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,高 Her-2 表达包括非常高和 / 或中等高的表达。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,非常高 Her-2 表达是 $\log_{10}H2T \geq \text{约 } 1.84 \sim 2.21$ 。在本文中公开的各方法的某些实施方式中,中等高表达在之间 $1.14 \sim 1.25$ 和 $1.84 \sim 2.21$ 。或者,依赖于监控的患者同群和 / 或显著的事件可使用其他范围。

[0171] 在某些实施方式中,生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的。在一些实施方式中,乳腺癌是早期阶段 (即辅佐性) 乳腺癌。或者,可监控可敏感于 Her-2 作用剂的任何癌。Her-2 作用剂可为任何 Her-2 作用剂。在某些实施方式中,Her-2 作用剂是本文所述的制剂之一。例如,在某些实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,化学治疗剂是紫杉醇。

[0172] 在某些实施方式中,测量 Her-2 的量。在某些实施方式中,测量 Her-2 同源二聚体的量。在某些实施方式中,如果 Her-2 是中等,则测量 Her-3 量。在某些实施方式中,如果 Her-2 是中等高 (即中等),则测量 Her-3 同源二聚体和 / 或 Her-2/Her-3 异源二聚体的量。

在某些实施方式中, Her-2 量和 / 或 her-3 使用能测量和 / 或定量样品中蛋白 - 蛋白相互作用的量的测定来测量。在某些实施方式中, 测定是 **VERATAG®** 测定。在某些实施方式中, 响应的可能性相应于总体存活率, 进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准或其他应答标准测量。

[0173] 在另一方面, 本发明针对用于确定是否患有 Her-2 阳性癌的受试者可能响应用至少一种 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂治疗的方法。在某些实施方式中, 所述方法包括测量来自受试者的癌的生物样品中 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量, 其中如果 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的水平低, 则患者可能响应至少一种 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂。在某些实施方式中, 生物样品包括 FFPE。在某些实施方式中, 受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中, 乳腺癌是转移性的。在一些实施方式中, 乳腺癌是早期阶段 (即辅助性) 乳腺癌。或者, 可监控可敏感于 Her-2 作用剂的任何癌。Her-2 作用剂可为任何 Her-2 作用剂。在某些实施方式中, Her-2 作用剂是本文所述的制剂之一。例如, 在某些实施方式中, Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中, 额外的化学治疗剂是紫杉醇。或者, 可评价本领域已知的和 / 或本文中公开的其他额外的化学治疗剂。在某些实施方式中, 响应的可能性或时间进程相应于总体存活率, 进展用时间和 / 或使用 RECIST 标准测量。

[0174] 在另一方面, 本发明针对用于确定是否患有 Her-2 阳性癌的受试者可能响应 Her-2 作用剂和 / 或预测是否疾病的时间进程长和 / 或预测是否受试者将具有显著的事件的方法, 所述方法包括: 检测来自受试者的癌的生物样品中的 Her-2 量和 Her-2 同源二聚体, 和确定 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比, 其中确定受试者的比在至少 3 个亚组之一, 且如果受试者的比在低, 或高亚组, 则受试者可能响应 Her-2 作用剂, 受试者可能具有长时间进程和 / 或受试者不可能具有显著的事件。在优选的实施方式中, 通过比较 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比和用对比不用 Her-2 作用剂治疗的群的危害比来测定至少 3 个亚组, 其中如果危害比小于 1, 则受试者更可能响应 Her-2 作用剂, 患者更可能具有长时间进程和 / 或患者欠可能具有显著的事件。

[0175] 在 FIN HER 临床试验中也相应于曲妥珠单抗应答检查例如, H2D/H2T 比, Her-2 表达 (H2T) 和 Her-2 同源二聚体水平 (H2D), 其设计为测试曲妥珠单抗在早期阶段 (即辅助性) 环境中的有效性。在研究中, 将 H2T, H2D 和 H2D/H2T 与 IHC, CISH 和临床结果相比。由于通过 IHC 或 FISH 的 Her-2 阳性已显示与用曲妥珠单抗的不利的预后和改善的临床结果相关, 预期了用定量测定 (例如 HERMark 测定) 区别可能应答者和非应当者的能力。但是, 如通过多变量 Cox 比例危险度分析所示, 既非 H2T 也非 H2D 与结果显著相关。另一方面, H2D/H2T 与任何复发用时间 (TAR) 独立地相关, 并与远处复发用时间 (TDR) 几乎显著相关。因为这些发现, 进行 STEPP (亚群治疗效果图) 分析来检查跨 H2T, H2D 和 H2D/H2T 分布的治疗对比对照患者的危害比例。80 个患者的亚群用于这些分析。而既非 H2D 也非 H2T 鉴定出不受益于曲妥珠单抗的任何组患者, 显示 H2D/H2T 来区别之间响应曲妥珠单抗的患者组和不响应曲妥珠单抗的患者组。此后来的组具有落入低 H2D/H2T 比组和高 H2D/H2T 比组之间的中等 H2D/H2T 比例。而申请人不希望限于机械理论, 对此观察的一种可能的解释是 H2D/H2T 是乳腺肿瘤中 Her-2 活化的测量, 且因此, 当在早期阶段 (即辅助性) 环境中用曲妥珠单抗治疗时, 是早期阶段 (即辅助性) 环境中未接受曲妥珠单抗的 Her-2- 阳性患者的预后生物标记, 和患者经历的临床益处的程度的预测性生物标记。

[0176] 在某些实施方式中,受试者的癌是乳腺癌。在某些实施方式中,受试者的癌是转移性的或初始早期阶段(即辅助性)。在某些实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,Her-2, Her-2 同源二聚体, Her-3, Her-3 同源二聚体,及 Her-2/Her-3 异源二聚体检测使用**VERATAG®**测定。在某些实施方式中,响应的可能性,具有长时间进程的可能性和/或具有显著的事件的可能性测量为总体存活率,进展用时间,远处复发用时间和无疾病存活,和/或应答或临床益处使用 RECIST 标准测量。在某些实施方式中,是否癌是 Her-2 阳性通过 IHC 或 FISH 或 CISH 测定。在其他实施方式中,本发明针对包括通过将受试者的癌的 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比与最佳截止值比较来确定是否 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比低,中等或高的方法。再一个实施方式中,如果 Her-2 同源二聚体与总 Her-2 的比是中等和/或危害比等于或大于 1,则患者欠可能响应 Her-2 作用剂和/或患者欠可能具有长时间进程和/或患者更可能具有显著的事件。

[0177] 再一方面,本发明提供治疗患癌受试者的方法。一方面,所述方法包括根据本发明的方法确定受试者患癌,且其可能响应用 Her-2 作用剂治疗和/或具有长时间进程,并给受试者施用有效量的 Her-2 作用剂作为所述确定的结果。在另一方面,所述方法包括根据本发明的方法确定受试者患癌,其可能响应用 Her-2 作用剂治疗和/或具有长时间进程,然后提供给受试者施用有效量的 Her-2 作用剂的医学专业性的治疗选项。在另一方面,所述方法包括确定受试者患癌,其具有短时间进程和/或不可能响应 Her-2 作用剂之外的化学治疗剂。本发明的这些方面各包括各种实施方式(例如,通过本文中公开的 Her-2 和其他标记物的表达分划;评估各种 Her-2 作用剂和/或其他化学治疗剂;分析各种癌类型)。在某些实施方式中,Her-2 作用剂是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,化学治疗剂是紫杉醇。在某些实施方式中,癌是乳腺癌。在某些实施方式中,乳腺癌是转移性的或初始早期阶段(即辅助性)。

【实施例】

[0178] 【实施例 1:抗体、**VERATAG®**-抗体,生物素和分子剪刀】

[0179] 单克隆抗体,针对 HER2 的细胞质结构域的 Ab8 和针对 HER2 的 C-末端的 Ab 15,购自 Lab Vision。根据之前描述的流程合成和纯化**VERATAG®**报告子(Pro11 和 Pro14)和缀合链霉亲和素的亚甲蓝("分子剪刀")(见,例如,以上和美国专利 7,105,308,将其通过引用并入本文中,包括任何附图)。抗体-**VERATAG®**和抗体-生物素缀合物,即 Ab8-Pro11 和 Ab15-生物素使用硫-NHS-LC-LC-生物素(Pierce)作为接头根据生产商的流程制造,并通过 HPLC(Agilent)纯化缀合产物。

[0180] 【实施例 2:细胞培养,固定,处理和石蜡包埋】

[0181] 4 种乳腺癌细胞系,MDA-MB-468, MCF-7, MDA-MB-453 和 SKBR-3,购自美国典型细胞培养物保藏中心。全部细胞系于 37°C 和 5% CO₂ 保持在 Dulbecco 修饰的 Eagle 培养基(DMEM):F12(50:50),10% FBS,1% PSQ(10% 胚胎牛血清,1% 青霉素-链霉素)和 2mM L-谷氨酰胺中。使细胞在对于各细胞系至少 10 个 150mm 培养板上生长至接近汇合。去除培养基后,将细胞用冷 1×PBS 洗涤一次,并将 15mL 的 10% NBF(中性缓冲的福尔马林)添加到各板。将细胞于 4°C 固定过夜(>16 小时)。去除固定剂溶液后,将细胞通过用残留的固定剂溶液刮下来收获,并以 3200×g 离心 15min。将细胞沉转移到橡胶 O-环,用过滤纸

包装和放入处理盒。用自动组织 -Tek 处理器处理。简言之,将细胞沉淀暴露于增加浓度的醇, Clear-rite(二甲苯替代品)和石蜡。处理后,使用石蜡包埋站将沉淀包埋成块。用于细胞沉淀处理的全部溶剂获自 Richard-Allen Scientific。

[0182] 【实施例 3:乳腺组织,固定,处理和石蜡包埋】

[0183] 具有不同的 Her-2 表达水平的冷冻的乳腺组织购自 Biooptions。将组织块 (0.9 ~ 1.9g) 于 4℃ 在 10% NBF 中固定 ~ 24 小时,及如对细胞系沉淀所述处理和石蜡 - 包埋。

[0184] 【实施例 4:显微切片术】

[0185] 将 7 μm 厚度的切片用切片机 (LEICA) 切片,并放在带正电的玻璃载玻片 (VWR) 上,并标记系列号。将载玻片风干 30min,然后在设于 60℃ 的加热炉中烘烤 1 小时。全部样品载玻片保存于 4℃ 用于将来测定。

[0186] 【实施例 5:免疫组织化学和 H&E 染色】

[0187] 在 Ventana Discovery XT 系统上根据生产商的使用说明进行对于 Her-2 的免疫组织化学。针对 Her-2 的第一抗体 (CB 11) 和其他试剂购自 Ventana。根据标准流程进行 FFPE 乳腺组织的 H&E 染色。

[0188] 【实施例 6:在福尔马林固定的,石蜡包埋的细胞系和乳腺组织中的 Her-2 VERATAG®测定】

[0189] 将 FFPE 样品使用一系列溶剂脱蜡 / 再水化。简言之,将载玻片依次浸入二甲苯 (2×, 5min), 100% 乙醇 (2×, 5min), 70% 乙醇 (2×, 5min) 和去离子水 (2×, 5min)。在含 250mL 的 1× 柠檬酸盐缓冲液 (pH6.0) (Lab Vision) 的皿中使用微波炉 (Spacemaker II, GE): 功率 10 持续 3min 于然后是在功率 3 持续 10min 来进行再水化样品的热 - 诱导的表位回收。于室温冷却 20min 后,将载玻片用去离子水润洗一次。在载玻片上使用疏水笔 (Zymed) 画疏水圈,以在载玻片上保留试剂。然后将样品用 1×PBS 中含 1% 小鼠血清, 1.5% BSA 和蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Roche) 的混合剂的封闭缓冲液封闭 1hr。用抽吸去除封闭缓冲液后,添加在封闭缓冲液中制备的 VERATAG® - 及缀合生物素的抗体 (二者均 4 μg/mL 的浓度) 的混合物,将结合反应在湿润的室内于 4℃ 伴着摇动温育过夜。吸入抗体混合剂,并将样品用在 1×PBS 中含 0.25% TritonX-100 的洗涤缓冲液洗涤,并添加 1×PBS 中 2.5 μg/mL 浓度的缀合链霉亲和素的亚甲蓝。抗体和链霉亲和素 - 光敏化剂缀合物的浓度全部基于信号特异性和测定读出值动态范围使用细胞系和乳腺组织样品优化。于室温温育 1 小时后,吸去链霉亲和素亚甲蓝试剂,并将样品以洗涤缓冲液洗涤一次,然后是改成去离子水洗涤 3 次。将在 0.01×PBS 中含 3pM 荧光素和 2CE 内部标记物 (MF 和 ML) 的照射缓冲液添加到样品切片。结合的 VERATAG® 于 ~ 4℃ 通过光活化的切割使用配备电子冰块的室内 LED 阵列照明灯 (Torrey Pine Scientific) 释放。从以上载玻片上的组织切片收集含释放的 VERATAG® 报告子的 CE 样品,并将 CE 样品中的释放的 VERATAG® 报告子分离,并用 ABI3100CE 仪器 (22cm 毛细管阵列) (Applied Biosystems) 在下 6kV 的 CE 注射条件下且于 30℃ 检测 50s。

[0190] 【实施例 7:数据分析】

[0191] VERATAG® 的鉴定和定量使用 VERATAG® Informer 软件 (见,例如,美国公开号 2007/0203408-A1,将其通过引用并入本文中,包括任何附图) 进行。为分析原始 CE 电泳图谱中的 VERATAG® 信号,2CE 内部标记物, MF (第 1 标记物) 和

ML(最后标记物),用于根据它们的相对于2种标记物的电泳迁移率或迁移时间, t 鉴定 **VERATAG®** 峰, 即 $[t(\text{VERATAG®})-t(\text{MF})]/[t(\text{ML})-t(\text{MF})]$ 。鉴定的 **VERATAG®**峰然后通过对于各**VERATAG®**的峰面积计算定量。为校正从组织切片**VERATAG®**恢复中的变异性,及整个毛细管阵列的CE注射效率和/或检测灵敏度中的运行变异性,使荧光素(3pM)包括于照射和**VERATAG®**恢复缓冲液,及在各样品运行中作为内部参比对照共电泳。然后将各**VERATAG®**峰的面积通过**VERATAG®**峰(**VERATAG®**峰面积)到内部荧光素峰(荧光素峰面积/1pM)的面积标准化而报道为RFU或RPA,且具有浓度单位(pM)。通过**VERATAG®**测定检测的靶蛋白的最终定量术语可为任一对于类似样品的RPA(pM)或对于可变异的肿瘤样品的 $\text{RPA} \times \text{IB vol}/\text{TA}$ (=相对峰面积乘以装载到样品切片的照射缓冲液体积(IB);除以以 mm^2 的肿瘤面积($\text{RPA} \times \text{IB vol}/\text{TA} = \text{pmole}/\text{L} \times \text{L}/\text{mm}^2 = \text{pmole}/\text{mm}^2$))。

【0192】 【实施例8:样品切片尺寸的测量(titration)和肿瘤面积的估计】

【0193】 为评估**VERATAG®**测定定量相同的样品样本中靶蛋白的能力,将载玻片上的以 $7\mu\text{m}$ 切割的细胞系样品的切片尺寸使用剃刀刀片连续测量,并对于组织材料的各测量,在一个载玻片上捕获乳腺组织的不同的数的切片机-切割的切片。**VERATAG®**测定后,将细胞系载玻片风干并光扫描。对扫描的图像使用ImageJ软件测试和计算以 mm^2 的样品切片面积。对于乳腺组织样品,将**VERATAG®**测定后载玻片经H&E染色并用封固介质封固(Richard-Allan Scientific)。组织样品的肿瘤含量由经认证的病理学家使用笔标记确定,并用ImageJ软件以关于细胞系样品的相同的方式测试和计算以 mm^2 的肿瘤含量面积。

【0194】 【实施例9:对于FFPE细胞的**veratag®**测定的显色】

【0195】 FFPE **VERATAG®**测定的模式图显示于图1。在测定开始之前,从人乳腺癌细胞系或肿瘤组织产生FFPE切片机切片,并如以上所述烘烤到玻璃载玻片上。将FFPE细胞系或肿瘤组织切片通过标准二甲苯/乙醇/水流程脱蜡及再水化,然后经历热-诱导的抗原收回,然后是**VERATAG®**测定。通过添加缀合**VERATAG®**的和缀合生物素的抗体对来起始**VERATAG®**测定,然后是洗涤,并与缀合链霉亲和素的光-敏化剂(即SA-亚甲蓝,或SA-MB)温育。使细胞系和肿瘤切片暴露于在670nm处的光照射,期间结合到生物素抗体的光-敏化剂将溶解的氧转变为更具有反应性,单态氧(O_2)在缓冲溶液中。此经吸收,体系间交叉和 O_2 产生发生。

【0196】 O_2 分子是短-寿命的(在水中 $\sim 4\mu\text{s}$),并由此具有有限的平均扩散距离,例如,产生的50%的 O_2 将扩散 $\sim 80\text{nm}$,且将在促灭之前 $< 0.1\%$ 扩散250nm(Latch,科学,2006)。随后,扩散 O_2 与**VERATAG®**报告分子和抗体之间的共价接头反应,导致硫-醚键的基于接近的切割和结合到组织细胞的**VERATAG®**报告分子的释放(见例如图2A和2B)。施加到常规毛细管电泳(CE)仪,将释放的**VERATAG®**报告子根据其迁移性质分离,并检测为电泳图谱中的荧光峰,其可使用**VERATAG®** Informer软件作为峰面积鉴定和定量。因此,**VERATAG®**荧光报告分子峰面积与存在于细胞的靶抗原量成正比。**VERATAG®**峰面积以RFU开始计算。为校正对于从组织切片的可变异的恢复和注射到CE的**VERATAG®**信号,峰面积(RPA)相对于已知的浓度的内部标准荧光素的峰面积计算。

[0197] 为鉴定可适于**VERATAG®**测定显色的 1 个接近对 Her-2 抗体, 将 5 种抗体与任一**VERATAG®**荧光报告子基团或生物素缀合, 及对 FFPE- 制备的人乳腺癌肿瘤细胞系以每 $1 \mu\text{g/mL}$ 测试 10 个接近对。通过它们平行相对 Her-2 蛋白表达水平的能力评估各抗体对的表现, 所述相对 Her-2 蛋白表达水平通过 FACS 分析和其他独立性方法在 SK-BR-3 (6×10^5 / 细胞), MDA-MB-453 (1.5×10^5 / 细胞); BT-20 (6×10^4 / 细胞); MCF-7 (2×10^4 / 细胞), 及 MDA-MB-468 细胞 (阴性对照; $< 10^4$ / 细胞) 中测定。Her-2 抗体对 Ab15 和 Ab8 产生最大动态信号范围, 与通过其他方法定量的相对 Her-2 表达水平一致。对于 4 种良好表征的 FFPE 乳腺癌细胞系产生的**VERATAG®**信号的代表性的电泳图谱显示于图 3, 随着利用 DAB 显色的平行 Her-2 IHC 显微照片。从 Her-2 **VERATAG®**测定产生的**VERATAG®**的峰面积与 IHC 信号强度平行, 并与接受的 Her-2 表达水平的 IHC 测试类别一致 (即 HercepTest: SK-BR-3 = 3+; MDA-MB-453 = 2+; MCF-7 = 0-1+; MDA-MB-468 = 0)。

[0198] 【实施例 10: **VERATAG®**抗体和测定最优化】

[0199] 已鉴定了可以接近形式适于**VERATAG®**测定显影的抗体对, 在非-近端, 直接**VERATAG®**释放条件下, 以及 $K_{1/2}$ 及饱和浓度在近端条件下, 对个体抗体测定相对亲和性和特异性。抗体滴定用缀合**VERATAG®**的 Ab8-Pro11 或 Ab15-Pro11 在阳性 (SKBR-3) 和阴性 (MDA-MB-468) Her-2- 表达 FFPE 细胞系上利用对于**VERATAG®**释放饱和浓度 (200uM) 的 O_2 敏化剂亚甲蓝进行。此 Pro 11 **VERATAG®**从增加浓度的结合抗体的非-近端释放反映抗体的相对亲和性。拟合 Ab8-Pro11 的结果的多-参数曲线与 $K_D = 6 \sim 8 \mu\text{g/mL}$ ($40 \sim 50\text{nM}$) 的单个结合位点最一致, 并类似于具有 $2 \sim 3 \mu\text{g/mL}$ ($12 \sim 18\text{nM}$) 的 K_D 的 Ab 15-Pro 11 的单个位点结合。可从阴性对照 MDA-MB-468 估计 Ab8-Pro11 的非-特异性结合为总 SK-BR-3 信号的百分率的 $< 4\%$, 然 Ab 15-Pro11 的非-特异性结合估计为 $\sim 10\%$ 。

[0200] 总 Her-2 的接近测定的最佳 Ab8-Pro11 和 Ab15- 生物素浓度通过对 FFPE 乳腺癌细胞系和人乳腺癌样品的抗体滴定测定。两种抗体的浓度在从 $0.25 \mu\text{g/mL}$ 到 $8 \mu\text{g/mL}$ 滴定期间保持相等。对两种抗体观察等于约 $2 \mu\text{g/mL}$ 的最大**VERATAG®**信号的 $K_{1/2}$, 及饱和浓度达到 $3 \sim 4 \mu\text{g/mL}$ 。在此和其他类似滴定研究中, $100 \sim 200$ 的最佳信号对背景比是对于 Ab8-Pro11 和 Ab15- 生物素是 $2 \sim 4 \mu\text{g/mL}$ 。额外的最优化实验确定, $2.5 \mu\text{g/mL}$ 的 O_2 - 致敏试剂 SA-MB 的浓度在多数条件下饱和, 且最佳照射时间是 2 小时。给定这些结果, 对 Ab8-Pro 11 和 Ab15- 生物素选择 $4 \mu\text{g/mL}$ (26nM) 的浓度, 及对 SA-MB 选择 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 的浓度, 用于进一步测定最优化和表现表征。

[0201] 以 $4 \mu\text{g/mL}$ 抗体浓度比较 3 种 Her-2 **VERATAG®**测定形式, 以鉴定导致最佳测定表现的条件。这些是 2 种接近形式, 由 Ab15- 生物素加 Ab8-Pro11 和 Ab8- 生物素加 Ab15-Pro 11 构成, 及在饱和亚甲蓝存在下**VERATAG®**从 Ab8-Pro 11 的非-接近直接释放。尽管亚甲蓝直接释放形式提供最高总体信号, 两种接近测定方法导致更低背景, 更高信号与背景比和动态范围, 及最接近地追踪通过独立性方法测定的期望的受体数 / 细胞。使用 Ab15- 生物素和 Ab8-Pro 11 的接近形式导致最佳信号与背景比, 并选定为用于进一步研究的最终测定形式。

[0202] 使用以上描述的方法进一步分析 Her-2 和 / 或 Her-2 同源二聚体的量是中等的生

物学样品的 Her-3 表达。由此,通过 Her-3 水平表达者是高或低将中等 Her-2 表达者进一步分划或分类。

[0203] 【实施例 11 :患有转移性乳腺癌的患者中 Her-2 和 Her-3 分类的应用】

[0204] **VERATAG®**测定在患有 MBC 的患者同群中进行。此同群 (N = 103) 源于国际血清 Her2/neu 研究组 (ISHSG),并称为 Lipton 同群。对在中心位置 (奥地利维也纳大学) 的患者由单个病理学家进行 IHC,其中患者是 IHC 3+ 或 2+/FISH 阳性。自 103 患者中,99 个具有中心 FISH 测量,98 个具有 H2T 测量,及 79 个具有 H3T 测量。在由此选定的 79 个患者中,排除具有 $H2T \geq 1.14$ 的 FISH 阴性的 3 个。由此,最终测试 76 个患者的测试组。

[0205] 如下测试 5 个组 :

[0206]

组 1	FISH 阴性	$H2T < 1.14$
组 2	FISH 阳性	$H2T < 1.14$
组 3	FISH 阳性	$H2T \geq 1.84$
组 4	FISH 阳性	$H2T \geq 1.14, < 1.84$ H3T 高
组 5	FISH 阳性	$H2T \geq 1.14, 1.84$, H3T 低

[0207] 如图 4 所示,Her-2 阳性患者总组具有 7.9 个月的中位进展用时间 (TTP)。组 1 中的患者数据显示于图 5,及显示 4.4 个月的中位 TTP。

[0208] 是 FISH 阳性且低 HER-2 表达者的组 2 中患者的数据显示于图 6,及显示中位 TTP, 4.4 个月的 FISH 阴性和 $H2T < 1.14$, 3.2 个月的 FISH 阳性和 $H2T < 1.14$, 及 11.3 个月的 FISH 阳性及 $H2T \geq 1.14$ 。相对于 FISH 阳性, $H2T \geq 1.14$ 组, FISH 阴性, $H2T < 1.14$ 组 ($HR = 2.7 ; p = 0.0002$) 和 FISH 阳性, $H2T < 1.14$ 组 ($HR = 2.9 ; p = 0.004$) 经历更差的结果。

[0209] 是 FISH 阳性且高 HER-2 表达者的组 3 中的患者的数据显示于图 7,及对于 FISH 阳性及 $H2T \geq 1.14 < 1.84$ 显示 12.21 个月的中位 TTP。由此,此数据显示,具有中等高 $H2T$ 的 FISH 阳性患者 (例如,具有 $H2T \geq 1.14$ 及 < 1.84 的患者) 表现好于具有低 $H2T$ 的 FISH 阳性患者 (例如, $H2T < 1.14$) ($HR = 4.0 ; p = 0.0002$), 具有低 $H2T$ 的 FISH 阴性患者 ($HR = 3.5 ; p < 0.0001$) 或具有高 $H2T$ 的 FISH 阳性患者 (例如, $H2T > 1.84$) ($HR = 3.0 ; p = 0.0005$)。

[0210] 是 FISH 阳性且高 HER-2 表达者,且被进一步分划为任一高或低 Her-3 表达的组 4 和 5 中的患者的数据显示于图 8,及对于 FISH 阳性的,及 $H2T \geq 1.14, < 1.84$ (例如,中等高 $H2T$) 和高 Her-3 表达显示 7.4 个月的中位 TTP,和对于 FISH 阳性,及 $H2T \geq 1.14 < 1.84$ (例如,中等高 $H2T$) 的中位 TTP 和对于低 Her-3 表达的 15.0 个月的中位 TTP。

[0211] 对于 5 组,相对于 FISH 阴性, $H2T < 1.14$ 的中位 TTP (月) 和危害比如下给予 :

[0212]

	中位 TTP (月)	危害比 (p-值) 对比组 1	危害比 (p-值) 对比组 5
--	------------	-----------------	-----------------

组 1	4.4	N/A	4.9(< 0.0001)
组 2	3.2	1.1(0.84)	5.7(< 0.0001)
组 3	4	1.3(0.53)	4.2(< 0.0001)
组 4	7.4	0.53(0.051)	3.1(0.0003)
组 5	15	0.2(< 0.0001)	N/A

[0213] 由此数据表示,显著的数的用基于 IHC 的曲妥珠单抗治疗的患者是 FISH- 阴性及不响应治疗。具有如通过 HERmark 所测的低 Her-2 表达的 FISH- 阳性患者亚组不响应用曲妥珠单抗治疗,而具有如通过 HERmark 所测的非常高 Her-2 表达的 FISH- 阳性患者的另一亚组也不响应用曲妥珠单抗治疗。具有如通过 HERmark 所测的中等高(例如,中等)Her-2 表达的 FISH- 阳性患者的第 3 亚组显示对用曲妥珠单抗治疗的最佳应答。

[0214] 具有中等高(例如,中等)Her-2 表达的 FISH- 阳性患者的第 3 亚组可还基于 Her-3 表达水平亚分。数据显示,在第 3 亚组,具有高 Her-3 表达的患者(组 4)相比 FISH 阴性,低 Her-2 表达患者(组 1)具有显著更长的 TTP($p = 0.051$),且具有约一半的进展风险。相反,具有低 Her-3 表达的第 3 亚组的患者(组 5)具有任何亚组的最佳应答,有相比 FISH- 阴性,低 Her-2 表达患者(组 1)的风险的 5 倍降低,且相比中等 Her-2 和高 Her-3 表达者具有显著更佳的应答($p = 0.0003$)。

[0215] 数据由此显示,可能测定是否患有 Her-2 阳性癌的患者可能响应用 Her-2 作用剂治疗和/或用于通过测量 Her-2 和/或 Her-2 同源二聚体的量来预测疾病的时间进程,其中如果 Her-2 和/或 Her-2 同源二聚体的量是中等高(例如,中等),则通过测量 Her-3 量进一步对患者分类。用 Her-2 作用剂治疗,且具有中等 Her-2 表达但高 Her-3 表达的患者将具有更长 TTP,而具有中等 Her-2 表达但低 Her-3 表达的患者将最佳响应。

[0216] 【实施例 12:患有早期阶段(即辅佐性)环境中的乳腺癌的患者中 Her-2 和 Her-3 分类的应用】

[0217] FinHer(Joensuu et al, N Engl J Med 2006, J Clin Oncol 2009) 是显示来自添加到早期阶段(即辅佐性)化学治疗的曲妥珠单抗的临床益处的几种预期随机化的临床试验之一。我们研究了来自曲妥珠单抗的临床益处和如通过 HERmark 测定测定的定量 HER2 蛋白表达(H2T)之间的关系。包括来自具有对于 HERmark 测定的充足的侵袭性肿瘤组织的 FinHer 研究的 899 例侵袭性乳腺癌病例的福尔马林-固定的,石蜡-包埋(FFPE)的组织。这些中的 196 例通过 CISH 是 HER2- 阳性。在此研究中,使具有 HER2- 阳性癌的患者($n = 232$)随机分配到接受任一伴随化学治疗施用的曲妥珠单抗 9 周或化学治疗单独。在此研究中,我们着眼于随机化于曲妥珠单抗治疗或对照的患有 HER2- 阳性癌的患者。进行位置扫描分析,以鉴定区分非常高 H2T 组的最佳截止值。如图 9 所示,具有非常高 H2T 值的患者($\log H2T \geq 2.21$; ≥ 125.9 HERmark 单位)相对于对照不受益于曲妥珠单抗加化学治疗处理($HR = 1.23$, $P = 0.75$, 对于 TDR; $HR = 1.05$, $P = 0.95$, 对于 OS),而具有 H2T 值 < 125.9 的患有则是($HR = 0.52$, $P = 0.05$, 对于 TDR; $HR = 0.48$, $P = 0.1$, 对于 OS)。

[0218] 本申请提到的全部打印的专利和出版物通过应用整体并入本文。

[0219] 尽管已例证和描述了本发明的优选的实施方式,可进行各种变化而不脱离本发明的精神和范围也是显而易见的。

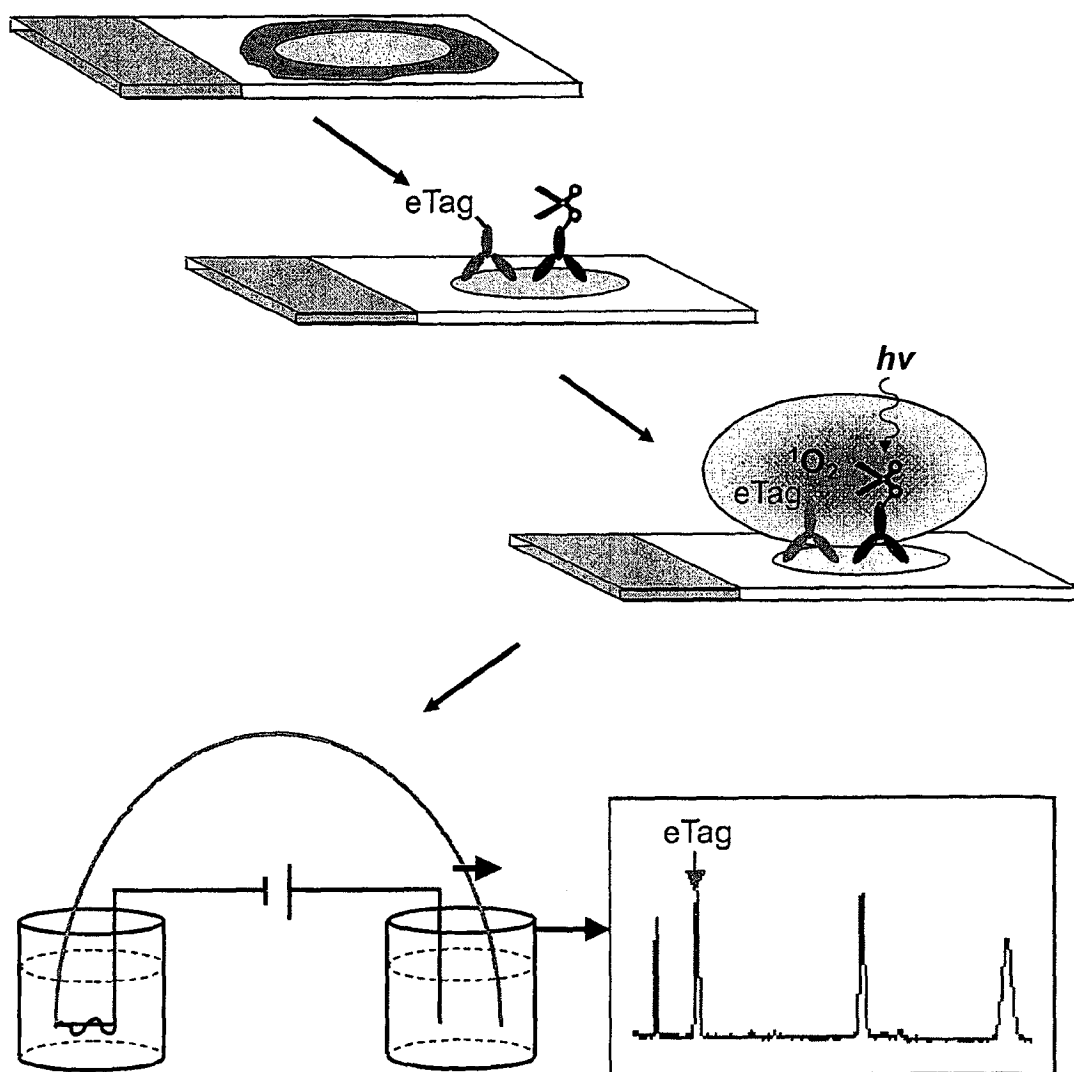


图 1

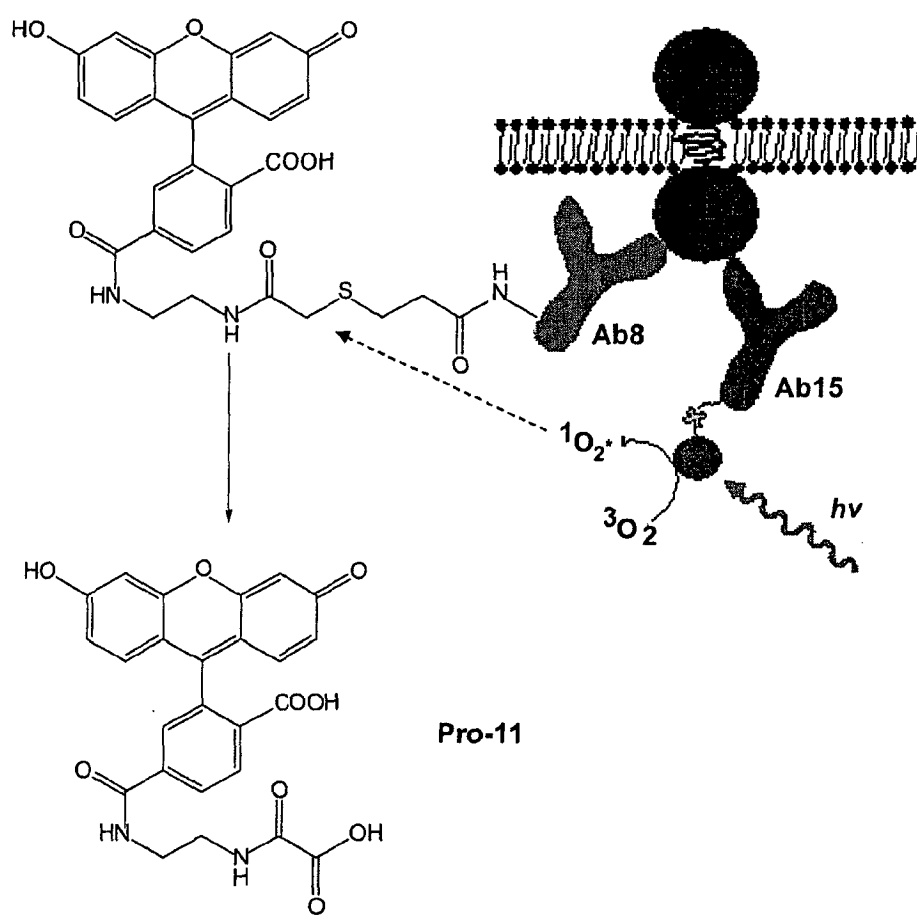


图 2A

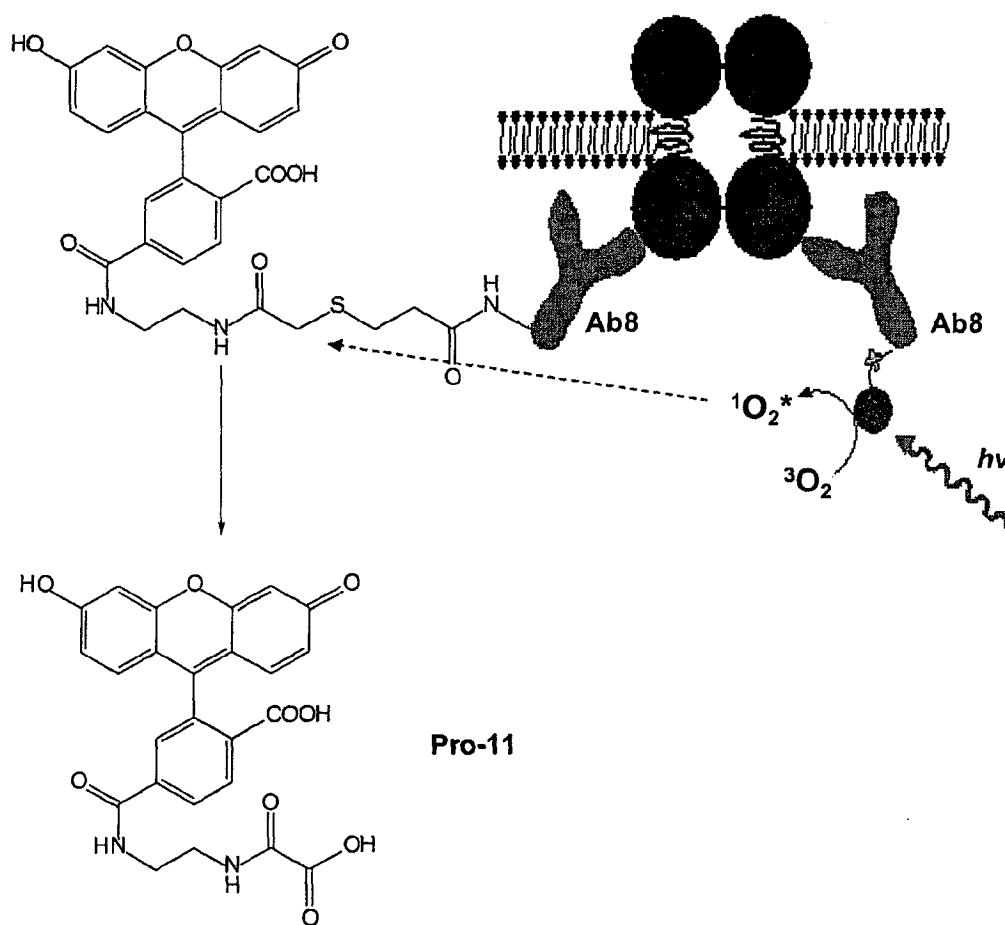


图 2B

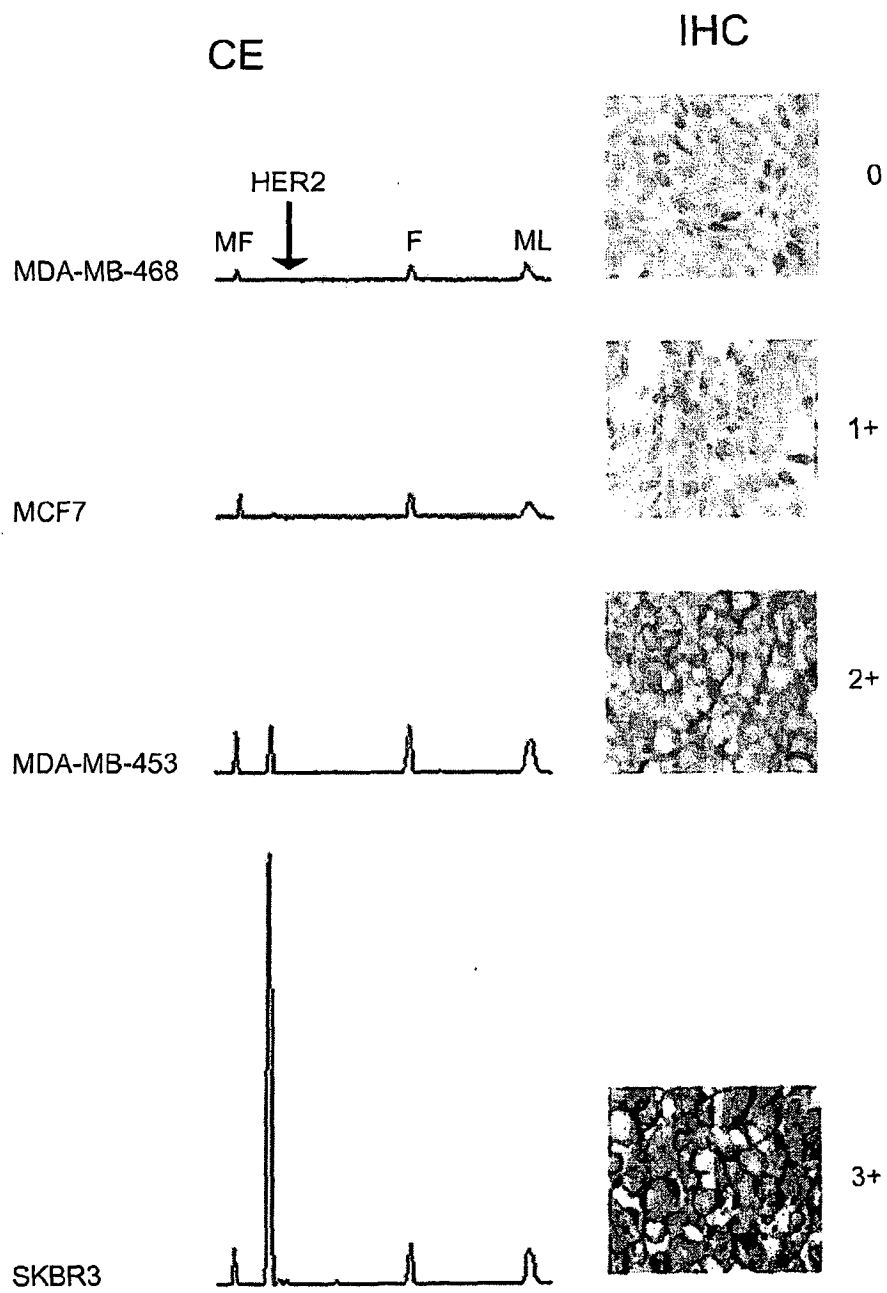


图 3

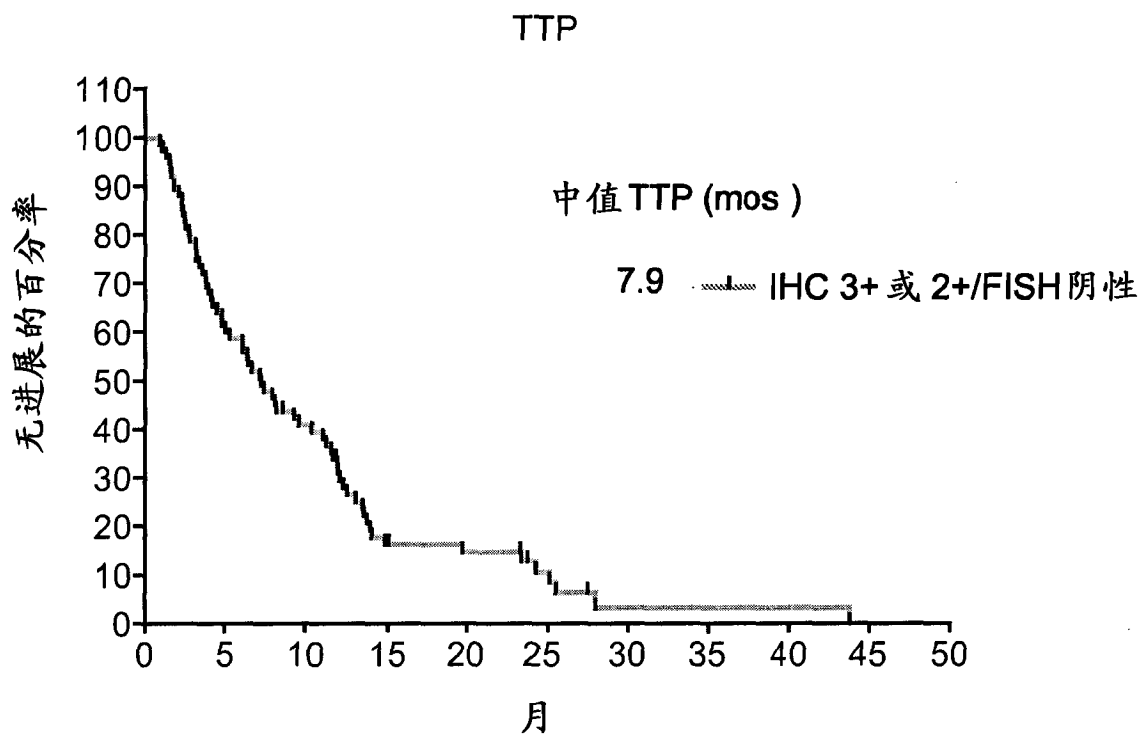


图 4

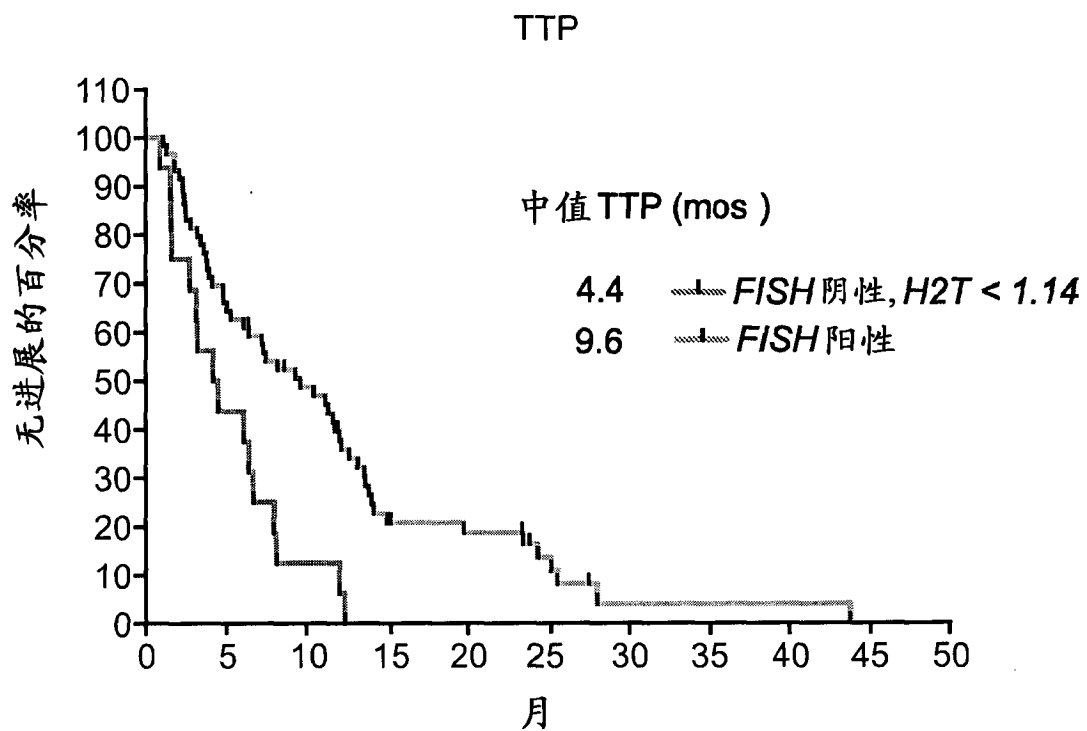


图 5

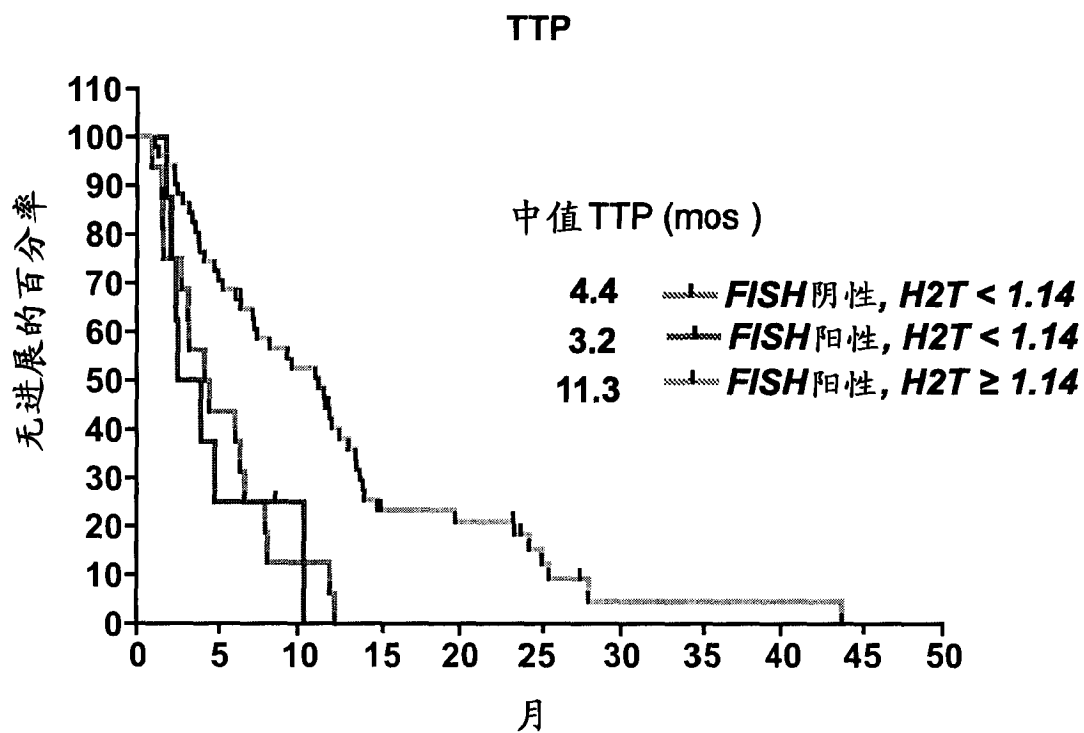


图 6

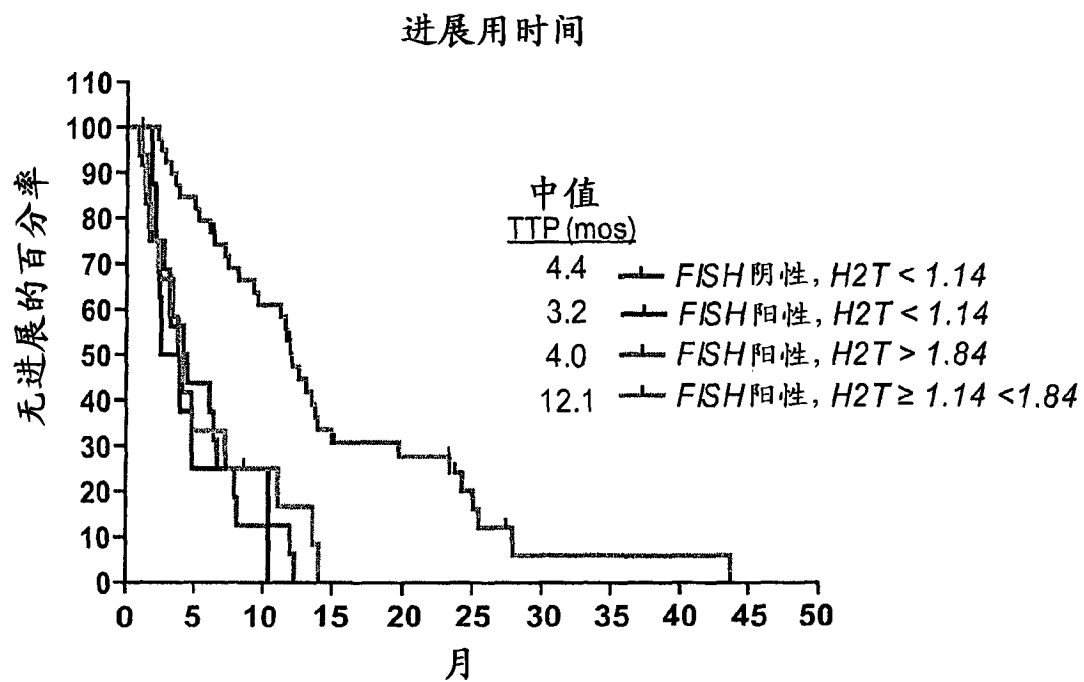


图 7

进展用时间

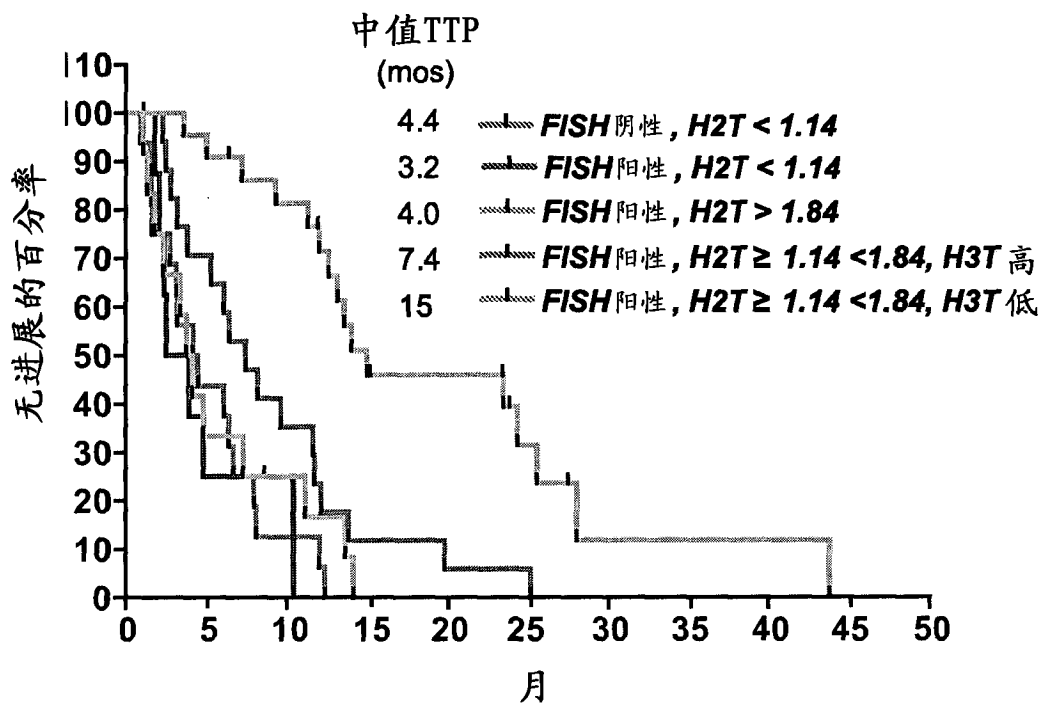


图 8

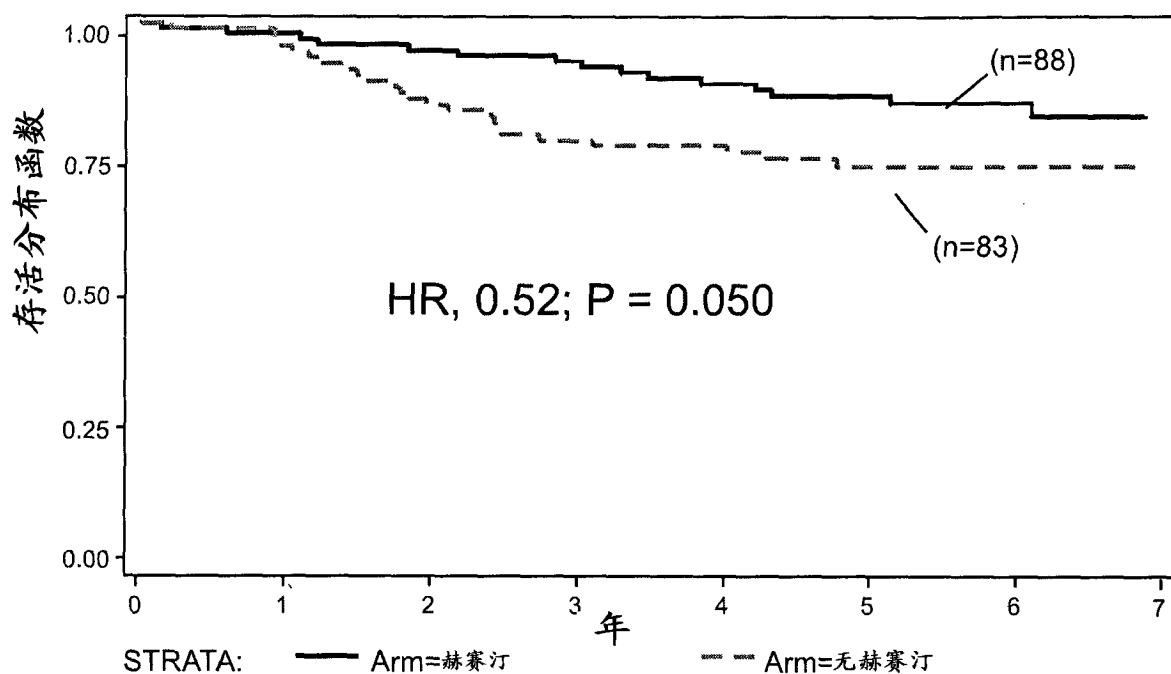
具有 $\log H2T < 2.1$ 的HER2阳性患者的远处复发用时间

图 9A

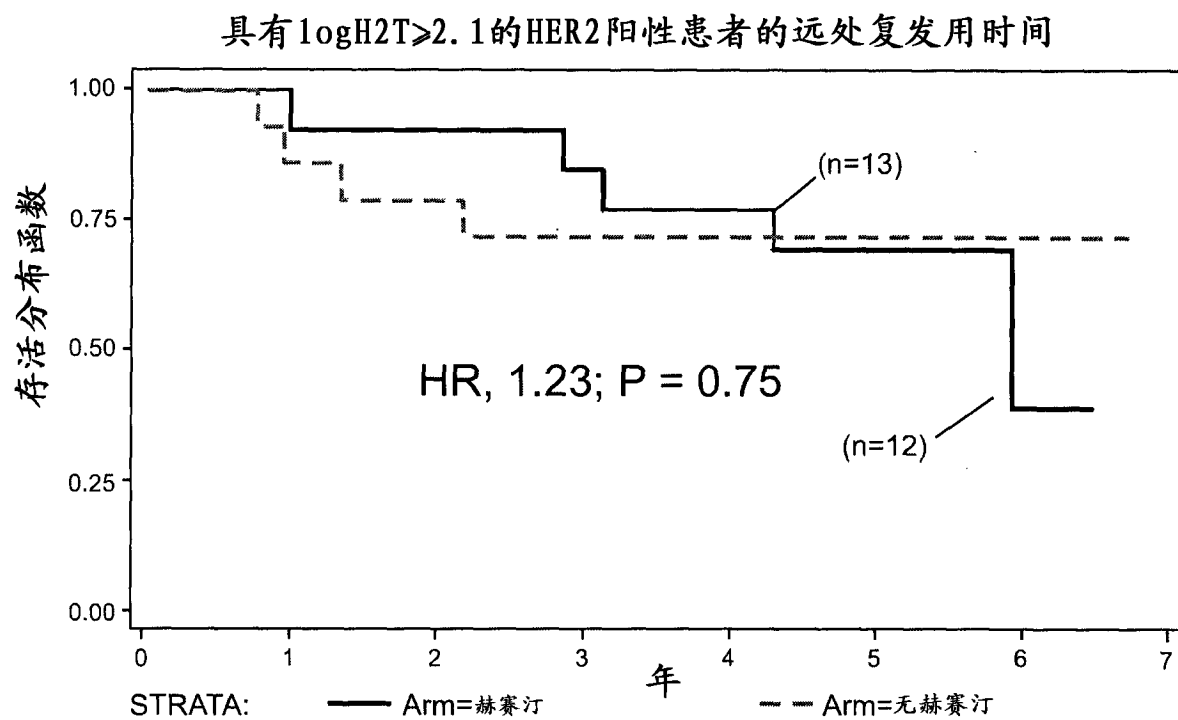


图 9B