



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 738**

51 Int. Cl.:

C12N 1/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04715133 .7**

96 Fecha de presentación : **26.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1597353**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54

Título: **Células tumorales circulantes (CTC): evaluación temprana del tiempo de evolución, de la supervivencia y la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer metastásico.**

30

Prioridad: **27.02.2003 US 450519 P**
25.11.2003 US 524759 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2011

73

Titular/es: **VERIDEX, L.L.C.**
1001 Us Highway Route 202
North Raritan, New Jersey 08869, US

72

Inventor/es: **Allard, Jeffrey, W.;**
Cristofanilli, Massimo y
Terstappen, Leon, W., M., M.

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 738 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

AntecedentesCampo de la invención

5 La presente invención se refiere de manera general al pronóstico del cáncer y a la supervivencia en pacientes de cáncer metastásico, basándose en la presencia de células cancerígenas circulantes (CTC) morfológicamente intactas en sangre. Más específicamente, se describen procedimientos diagnósticos, reactivos y aparatos que correlacionan la presencia de células cancerígenas circulantes en 7,5 ml de sangre de pacientes con cáncer de mama metastásico con el tiempo de evolución de la enfermedad y la supervivencia. Las células tumorales circulantes se determinan mediante metodologías muy sensibles capaces de aislar y tomar imágenes de 1 ó 2 células cancerígenas en de 5 a 50 ml aproximadamente de sangre periférica, el nivel del recuento de células tumorales y el incremento en el número de células tumorales durante el tratamiento se correlacionan con el tiempo de evolución, el tiempo hasta la muerte y la respuesta a la terapia.

Antecedentes de la técnica

15 A pesar de los esfuerzos para mejorar el tratamiento y la gestión de pacientes con cáncer, la supervivencia en pacientes con cáncer no ha aumentado en las dos últimas décadas para muchos tipos de cáncer. Por consiguiente, la mayoría de pacientes con cáncer no mueren a causa de su tumor primario, sino que sucumben por metástasis: múltiples colonias tumorales muy extendidas establecidas por células malignas que se desprenden del tumor original y viajan por el cuerpo, a menudo a sitios distantes. La estrategia terapéutica de mayor éxito en el cáncer es la detección temprana y la extracción quirúrgica del tumor mientras aún está confinado en el órgano. La detección temprana del cáncer ha demostrado ser factible para algunos cánceres, particularmente donde existen pruebas diagnósticas apropiadas tales como frotis de PAP en cáncer cervical, mamografía en cáncer de mama, y antígeno sérico específico de la próstata (PSA) en cáncer de próstata. No obstante, muchos cánceres detectados en fases tempranas ya han establecido micrometástasis antes de la resección quirúrgica. Así, es importante la determinación temprana y precisa del potencial maligno del cáncer para la selección de la terapia adecuada.

25 La terapia óptima estará basada en una combinación de información diagnóstica y del pronóstico. Es necesaria una prueba diagnóstica precisa y reproducible para proporcionar información específica con respecto a la naturaleza metastásica de un cáncer particular, junto con una evaluación del pronóstico que proporcionará información específica con respecto a la supervivencia.

30 Una prueba de pronóstico bien diseñada proporcionará información a los médicos sobre el riesgo y la probabilidad de supervivencia, que a su vez beneficia al paciente al no tener que soportar un tratamiento innecesario. También se estimulará el ánimo del paciente al saber que una terapia seleccionada será eficaz basándose en una prueba de pronóstico. El ahorro asociado a esa prueba puede ser significativo puesto que proporciona al médico una justificación para la sustitución de terapias ineficaces. Obviamente, un banco de datos diagnósticos y pronósticos bien desarrollado en el tratamiento y la detección de cáncer metastásico centrado en la supervivencia sería un beneficio enorme para la medicina (documento de EE.UU. 6.063.586).

35 Si un tumor primario se detecta suficientemente temprano, a menudo se puede eliminar por cirugía, radiación, o quimioterapia o alguna combinación de estos tratamientos. Desafortunadamente, las colonias metastásicas son difíciles de detectar y eliminar y a menudo es imposible tratarlas a todas ellas con éxito. Por tanto, desde un punto de vista clínico, la metástasis se puede considerar el acontecimiento concluyente en la progresión natural del cáncer. Además, la capacidad para metastatizar es una propiedad que caracteriza de manera única a un tumor maligno.

Antígeno tumoral soluble:

Basándose en la complejidad del cáncer y a la metástasis del cáncer y la frustración en el tratamiento de pacientes con cáncer a lo largo de los años, se han llevado a cabo numerosos intentos para desarrollar pruebas diagnósticas que quíen el tratamiento y controlen los efectos de ese tratamiento sobre la metástasis o la recidiva.

45 Uno de los primeros intentos para desarrollar una prueba útil para la oncología diagnóstica fue la formulación de un inmunoensayo para el antígeno carcinoembrionario (CEA). Este antígeno aparece en células fetales y reaparece en células tumorales en ciertos cánceres. Se han llevado a cabo esfuerzos exhaustivos para evaluar la utilidad de pruebas para el CEA, así como muchos otros antígenos "tumorales", tales como el antígeno específico de la próstata (PSA), CA 15.3, CA 125, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), CA 27.29, p27 que se encuentran en muestras de tejido o en sangre como restos celulares solubles. Se cree que éstos y otros antígenos de restos celulares proceden de la destrucción de las células tumorales circulantes y no circulantes, y por lo tanto su presencia no siempre refleja el potencial metastásico, especialmente si la ruptura de las células se produce mientras están en un estado de apoptosis.

Pruebas adicionales usadas para predecir la progresión del tumor en pacientes con cáncer se han centrado en la correlación de índices enzimáticos como la actividad de la telomerasa en muestras tumorales obtenidas por biopsia con una indicación de un pronóstico favorable o desfavorable (documento de EE.UU. 5.693.474; documento de EE.UU. 5.639.613). La evaluación de la actividad enzimática en este tipo de análisis puede suponer el uso de procedimientos de laboratorio que requieren mucho tiempo, tales como electroforesis en gel y análisis de transferencia de Western. Además, hay variaciones en la relación señal a ruido y en la sensibilidad en el análisis de muestras basándose en el origen del tumor. A pesar de estas deficiencias, los marcadores tumorales específicos solubles en sangre pueden proporcionar una aproximación rápida y eficaz para el desarrollo de una estrategia terapéutica al comienzo del tratamiento. Por ejemplo, la detección de HER-2/neu sérico y CA 15-3 sérico en pacientes con cáncer de mama se ha demostrado que son factores pronósticos del cáncer de mama metastásico (Ali S.M., Leitzel K., Chinchilli V.M., Engle L., Demers L., Harvey H.A., Carney W., Allard J.W. y Lipton A., Relationship of Serum HER-2/neu and Serum CA 15-3 in Patients with Metastatic Breast Cancer, *Clinical Chemistry*, 48(8):1314-1320 (2002)). El aumento de HER-2/neu da lugar a una disminución de la respuesta a la terapia hormonal, y es un factor pronóstico significativo en la predicción de respuestas a cáncer de mama metastásico positivo para el receptor de la hormona. Así, en las neoplasias malignas donde está asociado el producto del oncogén HER-2/neu, se han descrito procedimientos para supervisar la terapia o evaluar los riesgos basándose en niveles elevados (documento de EE.UU. 5.876.712). Sin embargo, en ambos casos, los niveles iniciales durante la remisión, o incluso en individuos sanos, son relativamente altos y pueden solaparse con las concentraciones que se encuentran en los pacientes, por lo que requieren múltiples pruebas y vigilancia para establecer niveles iniciales y niveles límite que dependen del paciente.

En el cáncer de próstata, los niveles de PSA en suero han demostrado ser útiles en la detección temprana. Cuando se utiliza con un examen de seguimiento físico (tacto rectal) y biopsia, la prueba del PSA ha mejorado la detección del cáncer de próstata en una etapa temprana, cuando se trata mejor.

Sin embargo, las pruebas del PSA, o del PSMA relacionado, dejan mucho que desear. Por ejemplo, niveles elevados de PSA se correlacionan débilmente con el estadio de la enfermedad y no parecen ser un indicador fiable del potencial metastásico del tumor. Esto puede deberse en parte al hecho de que el PSA es un componente del tejido normal de la próstata y del tejido de la hiperplasia prostática benigna (BHP). Por otra parte, aproximadamente el 30% de los pacientes con presunto cáncer de próstata localizado y bajas concentraciones correspondientes de PSA sérico, pueden presentar enfermedad metastásica (Moreno y col., *Cancer Research*, 52:6110 (1992)).

Marcadores genéticos:

Una aproximación para determinar la presencia de células malignas del tumor de próstata ha sido la prueba para la expresión de ARN mensajero de PSA en sangre. Esto se hace a través de un procedimiento de aislamiento laborioso de todo el ARNm de la muestra de sangre y la realización de PCR de transcriptasa inversa. No se ha descrito correlación significativa entre la presencia de células tumorales diseminadas en sangre y la capacidad de identificar qué pacientes se beneficiarían de un tratamiento más vigoroso (Gomella LG., *J of Urology*, 158:326-337 (1997)). Además, a menudo se observan falsos positivos con esta técnica. Hay un inconveniente añadido, y es que hay un límite práctico y finito en cuanto a la sensibilidad de esta técnica basado en el tamaño de la muestra. Por lo general, la prueba se realiza en 10^5 a 10^6 células separadas de los glóbulos rojos que interfieren, lo que corresponde a un límite práctico de sensibilidad más bajo de una célula tumoral/0,1 ml de sangre (alrededor de 10 células tumorales en un ml de sangre) antes de que se detecte una señal. Se ha sugerido una mayor sensibilidad para detectar ARN de hK2 en células tumorales aisladas de la sangre (documento de EE.UU. 6.479.263; documento de EE.UU. 6.235.486).

Se han utilizado estudios basados en RT-PCR cualitativa con marcadores de nucleótidos en la sangre para indicar que el potencial de supervivencia libre de enfermedad para pacientes con ARNm de CEA positivo en sangre antes de la operación es peor que la de los pacientes negativos para ARNm de CEA (Hardingham J.E., Hewett P.J., Sage R.E., Finch J.L., Nuttal J.D., Kotasel D. y Dovrovic A., Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease, *Int. J. Cancer* 89:8-13 (2000); Taniguchi T., Makino M., Suzuki K., Kaibara N., Prognostic significance of reverse transcriptase-polymerase chain reaction measurement of carcinoembryonic antigen mRNA levels in tumor drainage blood and peripheral blood of patients with colorectal carcinoma, *Cancer* 89:970-976 (2000)). El valor pronóstico de este parámetro depende de los niveles de ARNm de CEA, que también se inducen en individuos sanos por G-CSF, citocinas, esteroides, o factores ambientales. Por lo tanto, el marcador ARNm de CEA carece de especificidad y claramente no es exclusivo de células de cáncer colorrectal circulantes. Otros informes han implicado al ARNm de tirosinasa en sangre periférica y médula ósea como marcador para melanoma maligno en pacientes en fase II-IV (Ghossein R.A., Coit D., Brennan M., Zhang Z.F., Wang Y., Bhattacharya S., Houghton A., y Rosai J., Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma, *Clin Cancer Res.*, 4(2):419-428 (1998)). Una vez más, el uso del ARNm de tirosinasa como marcador tumoral soluble está sujeto a las limitaciones antes citadas de los antígenos tumorales solubles como indicadores del potencial metastásico y la supervivencia del paciente.

Los estudios antes mencionados y otros, aunque en principio parecen pronósticos en condiciones experimentales, no proporcionan datos consistentes con un período de seguimiento prolongado o con una

especificidad satisfactoria. En consecuencia, estos esfuerzos han demostrado ser un tanto inútiles puesto que la aparición de ARNm para antígenos en sangre en general no ha sido predictivo para la mayoría de los cánceres y a menudo se detectan cuando hay pocas esperanzas para el paciente.

A pesar de ello, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR) ha sido el único procedimiento publicado que correlaciona la detección cuantitativa de células tumorales circulantes con el pronóstico del paciente. La RT-PCR en tiempo real se ha utilizado para cuantificar el ARNm de CEA en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal (Ito S., Nakanishi H., Hirai T., Kato T., Kodera Y., Feng Z., Kasai Y., Ito K., Akiyama S., Nakao A., y Tatematsu M., Quantitative detection of CEA expressing free tumor cells in the peripheral blood of colorectal cancer patients during surgery with real-time RT-PCR on a Light Cycler, *Cancer Letters*, 183:195-203 (2002)). Utilizando análisis de tipo Kaplan-Meier, la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con ARNm de CEA positivo en sangre después de la operación fue significativamente más corta que en los casos que fueron negativos para ARNm de CEA. Estos resultados sugieren que las células tumorales se diseminaron en el torrente sanguíneo (posiblemente durante los procedimientos quirúrgicos o de las micrometástasis ya existentes en el momento de la operación), y dio lugar a pobres resultados en pacientes con cáncer colorrectal. La sensibilidad de este ensayo proporciona un rango reproducible detectable similar en sensibilidad a la RT-PCR convencional. Como se ha mencionado, estos rangos de detección se basan en conversiones poco fiables de producto amplificado en número de células tumorales. El recuento extrapolado de células puede incluir CTC dañadas incapaces de producir proliferación metastásica. Además, los análisis basados en la PCR están limitados por la posible contaminación de la muestra, junto con la incapacidad de cuantificar las células tumorales. Más importante aún, los procedimientos basados en la PCR, citometría de flujo, enzimas citoplasmáticas y antígenos tumorales circulantes no pueden proporcionar información morfológica esencial que confirme el potencial metastásico que subyace en la integridad estructural de las supuestas CTC y por lo tanto constituyen ensayos sustitutos funcionalmente menos fiables que los procedimientos de obtención de imágenes de alta sensibilidad incorporados, en parte, en esta invención.

Evaluación de las células tumorales intactas en la detección y el pronóstico del cáncer:

La detección de células tumorales intactas en la sangre proporciona una conexión directa a la enfermedad metastásica recurrente en pacientes con cáncer que han sido sometidos a resección del tumor primario. Por desgracia, la propia difusión de las células malignas se sigue pasando por alto en los procedimientos convencionales de estadificación de tumores. Estudios recientes han demostrado que la presencia de una sola célula de carcinoma en la médula ósea de pacientes con cáncer es un factor pronóstico independiente de recidiva metastásica (Dial JJ, Kaufman M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol*, 10:1534-1539, 1992). Pero estas técnicas invasivas se consideran poco deseables o inaceptables para ensayos clínicos rutinarios o múltiples en comparación con la detección de células epiteliales tumorales diseminadas en la sangre.

Un enfoque alternativo incorpora tecnología de separación inmunomagnética y proporciona una mayor sensibilidad y especificidad en la detección inequívoca de células cancerosas circulantes intactas. Esta herramienta de diagnóstico simple y sensible, tal como se describe (documentos de EE.UU. 6.365.362; EE.UU. 6.551.843; EE.UU. 6.623.982; EE.UU. 6.620.627; EE.UU. 6.645.731, WO 02/077604; WO03/065042; y WO 03/019141) se utiliza en la presente invención para correlacionar la supervivencia estadística de un paciente individual basándose en un nivel umbral superior o igual a 5 células tumorales en 7,5 a 30 ml de sangre (1 a 2 células tumorales corresponden a cerca de 3000 a 4000 células tumorales totales en circulación para un individuo determinado).

Con esta herramienta de diagnóstico, una muestra de sangre de un paciente de cáncer (documento WO 03/018757) se incuba con perlas magnéticas, recubiertas con anticuerpos dirigidos contra un antígeno de la superficie de una célula epitelial, como por ejemplo EpCAM, como se describe en los documentos WO99/41613, US 2002/0172987, Kagan y col., *J. Clin. Ligand Assay* 25: 104-110 (2002) y Witzig y col., *Clin. Canc. Res.* 8: 1085-1091 (2002). Después del marcaje con nanopartículas magnéticas recubiertas con anti-EpCAM, las células marcadas magnéticamente se aíslan usando un separador magnético. La fracción inmunomagnéticamente enriquecida se procesa para su análisis inmunocitoquímico aguas abajo o para citometría de imagen, por ejemplo, en el sistema Cell Spotter[®] System (Immunicon Corp., PA). La fracción magnética también se puede utilizar para el análisis inmunocitoquímico aguas abajo, RT-PCR, PCR, FISH, citometría de flujo, u otros tipos de citometría de imagen.

El sistema Cell Spotter[®] System utiliza la selección y separación inmunomagnética para enriquecer y concentrar mucho todas las células epiteliales presentes en muestras de sangre completa. Las células capturadas se marcan de manera detectable con un marcador específico de leucocitos y con uno o más anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos de células tumorales para permitir la identificación y el recuento de las CTC capturadas, así como la diferenciación instrumental o visual inequívoca de la contaminación de células no objetivo. Con una sensibilidad extraordinaria de 1 ó 2 células epiteliales por 7,5 a 30 ml de sangre, este ensayo permite la detección de células tumorales, incluso en las primeras etapas de poca masa tumoral. La forma de realización de la invención no se limita al sistema Cell Spotter[®] System, sino que incluye todos los protocolos de aislamiento y de obtención de imágenes de sensibilidad y especificidad comparables.

5 Los protocolos pronósticos disponibles en la actualidad no han demostrado ser un medio consistentemente fiable para la correlación de las CTC para predecir la supervivencia libre de progresión o la supervivencia global en pacientes con cánceres como cáncer de mama metastásico (MBC). Por lo tanto, existe una clara necesidad de una detección precisa de las células cancerosas con potencial metastásico, no sólo en el MBC, sino también en cánceres metastásicos en general. Por otra parte, esta necesidad se ve acentuada por la necesidad de seleccionar la terapia más eficaz para un paciente determinado.

Resumen de la invención

10 La presente invención es un procedimiento para el pronóstico del cáncer, tal como se define en la reivindicación 1. Utiliza herramientas de diagnóstico, tales como el sistema Cell Spotter[®] System, para evaluar el tiempo de evolución de la enfermedad, la supervivencia, y la respuesta a la terapia basándose en el número absoluto de células cancerosas circulantes (CTC) en pacientes con cáncer metastásico. El sistema concentra inmunomagnéticamente las células epiteliales, marca las células con fluorescencia, identifica y cuantifica las CTC para el recuento positivo. El análisis estadístico del recuento de células predice la supervivencia. La predicción de la supervivencia se basa en una comparación del umbral del número de células tumorales circulantes en sangre con el tiempo de evolución de la enfermedad y la muerte. El análisis estadístico de estudios de seguimiento de larga duración de pacientes diagnosticados con cáncer establece un umbral para el número de CTC que se encuentran en la sangre y la predicción de la supervivencia. La ausencia de CTC se define como menos de 5 CTC morfológicamente intactas. La presencia o ausencia de CTC para predecir la supervivencia es útil en la elección del tratamiento. Por ejemplo, la ausencia de CTC en una mujer no tratada previamente por cáncer de mama metastásico se pudo usar para seleccionar la terapia hormonal frente a la quimioterapia con menos efectos secundarios y una mayor calidad de vida. Por el contrario, la presencia de CTC se podría usar para seleccionar la quimioterapia, que tiene mayores efectos secundarios, pero puede prolongar la supervivencia con mayor eficacia en una población de alto riesgo. Así, la invención tiene un papel pronóstico en la detección de CTC en mujeres con cáncer de mama metastásico.

Breve descripción de los dibujos

25 **Figura 1:** Perfil de análisis de fluorescencia Cell Spotter[®] utilizado para confirmar los objetos capturados como células tumorales. Las marcas de verificación significan una célula tumoral positiva basada en la imagen compuesta. Las imágenes compuestas proceden de la selección positiva del marcador de células epiteliales (EC-PE) y del colorante nuclear (NADYE). También es necesaria una selección negativa para el marcador de leucocitos (L-APC) y para el control (CNTL).

30 **Figura 2:** Comparación de los procedimientos diagnósticos para medir los cambios en el estado del tumor. Se muestra el patrón actual de la medición física de lesiones discretas usando la obtención de imágenes radiográficas (Grupo A). Se muestra un modelo que ilustra la capacidad de evaluar los cambios en la carga del cáncer metastásico contando el número de CTC en sangre (Grupo B).

Figura 3: Falta de correlación entre el número de CTC y el tamaño del tumor en 69 pacientes.

35 **Figura 4:** Cambios en el número de CTC en pacientes con respuesta parcial a la terapia o con un estado de enfermedad estable. Las CTC se redujeron o permanecieron indetectables en todos los casos.

Figura 5: Cambios en el número de CTC en pacientes con progresión de la enfermedad. Las CTC aumentaron o permanecieron indetectables con la progresión de la enfermedad.

40 **Figura 6:** Evolución en los pacientes del número de CTC. El Grupo A muestra un paciente tipo con menos de 5 CTC por 7,5 ml de sangre. El Grupo B muestra un paciente tipo con una disminución de las CTC en el transcurso de la terapia. El Grupo C muestra un paciente tipo con una disminución de las CTC, seguido de un aumento. El Grupo D muestra un paciente tipo con un aumento de las CTC.

45 **Figura 7:** Determinación de un límite óptimo de las CTC para distinguir los pacientes de MBC con progresión rápida. El análisis se realizó utilizando los números de CTC obtenidos al inicio del estudio de los 102 pacientes incluidos en el grupo de entrenamiento. La mediana de la SLP de pacientes con mayor o igual al número seleccionado de CTC en 7,5 ml de sangre está indicada por la línea continua y la mediana de la SLP de pacientes por debajo del nivel de CTC seleccionado está indicada por la línea discontinua. La mediana de la SLP se reducía a medida que las CTC aumentaban y llegó a un nivel que se estabilizó en 5 CTC (indicado por la línea vertical). El punto negro indica la mediana de la SLP de ~ 5,9 meses para los 102 pacientes. El límite seleccionado de ≥ 5 CTC/7,5 ml se utilizó en todos los análisis posteriores.

50 **Figura 8:** El valor predictivo de las CTC al inicio para la SLP y la SG. Se muestran las probabilidades de SLP y SG de pacientes con MBC con < 5 (línea de color negro) y ≥ 5 (línea gris) de CTC en 7,5 ml de sangre usando la extracción de sangre inicial antes del comienzo de una nueva línea de terapia. La SLP y la SG se calcularon a partir del momento de extracción de la sangre al inicio. Grupo A: la probabilidad de SLP usando el recuento inicial de CTC ($n =$

177, log-rank $p = 0,0001$, CoxHR = 1,95, $\chi^2 = 15,33$, $p = 0,0001$). Grupo B: la probabilidad de SG usando el recuento inicial de CTC (n = 102, log-rank $p = 0,0003$, CoxHR = 3,98, $\chi^2 = 12,64$, $p = 0,0004$).

Figura 9: El valor predictivo de las CTC en el primer seguimiento para la SLP y la SG. Se muestran las probabilidades de SLP y SG de pacientes con MBC con < 5 (línea de color negro) y ≥ 5 (línea gris) de CTC en 7,5 ml de sangre en el primer seguimiento después del comienzo de una nueva línea de terapia. La SLP y la SG se calcularon a partir del momento de extracción de la sangre de sangre al inicio. Grupo A: la probabilidad de SLP usando el primer seguimiento de extracción de sangre (n = 163, log-rank $p < 0,0001$, CoxHR = 2,73, $\chi^2 = 25,25$, $p < 0,0001$). Grupo B: la probabilidad de SG usando el primer seguimiento de extracción de sangre (n = 68, log-rank $p = 0,0001$, CoxHR = 6,12, $\chi^2 = 13,24$, $p = 0,0003$).

Figura 10: Una reducción en el recuento de CTC por debajo de 5 en el primer seguimiento de extracción de sangre después del comienzo de la terapia (4 a 5 semanas) predice una mediana mejorada de la SLP y la SG. Para ambos grupos, la línea de color negro muestra < 5 CTC tanto en extracción inicial como en la extracción de sangre para el primer seguimiento. La línea de puntos negro muestra ≥ 5 CTC inicialmente al inicio del estudio, pero disminuye por debajo de 5 CTC en el primer seguimiento. La línea gris de puntos muestra ≥ 5 CTC, tanto al inicio como después del seguimiento, y la línea gris sólida muestra un aumento de las CTC con respecto al nivel inicial con ≥ 5 CTC en el seguimiento. El Grupo A muestra la probabilidad de SLP en los pacientes, mientras que el Grupo B muestra la probabilidad de SG.

Descripción detallada de la invención

El objetivo de la presente invención proporciona la detección de células tumorales circulantes como indicador del pronóstico temprano de la supervivencia del paciente. El procedimiento combina tecnología de enriquecimiento inmunomagnético, y tecnología de marcaje de inmunofluorescencia con una plataforma de análisis adecuada después de la extracción inicial de sangre. La prueba asociada tiene la sensibilidad y la especificidad para detectar estas células raras en una muestra de sangre completa y para investigar su papel en la evolución clínica de la enfermedad en tumores malignos de origen epitelial. A partir de una muestra de sangre completa, las células raras son detectadas con una sensibilidad y una especificidad que permiten que se puedan recoger y usar en los ensayos diagnósticos de la invención, es decir, predecir la evolución clínica de la enfermedad en tumores malignos.

Con esta tecnología, se ha demostrado que existen células tumorales circulantes (CTC) en la sangre en cantidades detectables. Esto ha generado una herramienta para investigar la importancia de las células de origen epitelial en la circulación periférica de pacientes con cáncer (Racila E., Euhus D., Weiss A.J., Rao C., McConnell J., Terstappen L.W.M.M. y Uhr J.W., Detection and characterization of carcinoma cells in the blood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998)). Este estudio demuestra que estas células transportadas por la sangre podrían tener un papel importante en la fisiopatología del cáncer. Al tener una sensibilidad de detección de 1 célula epitelial por cada 5 ml de sangre, el análisis incorpora el enriquecimiento inmunomagnético de la muestra y la tinción de anticuerpos monoclonales fluorescentes, seguido de citometría de flujo para un análisis rápido y sensible de una muestra. Los resultados muestran que el número de células epiteliales en sangre periférica de ocho pacientes tratados por carcinoma metastásico de mama se correlacionan con la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. En 13 de 14 pacientes con enfermedad localizada, 5 de 5 pacientes con afectación de los nódulos linfáticos y 11 de 11 pacientes con metástasis distante, se encontraron células epiteliales en la sangre periférica. El número de células epiteliales fue significativamente mayor en pacientes con la enfermedad extendida.

El ensayo se ha configurado adicionalmente para un análisis de imagen citométrica de tal manera que la muestra enriquecida inmunomagnéticamente es analizada por el sistema Cell Spotter[®] System (véase Ejemplo 1). Se trata de un análisis de la imagen mediante microscopio basado en fluorescencia, que a diferencia del análisis de citometría de flujo permite la visualización de eventos y la evaluación de las características morfológicas para identificar mejor los objetos.

El término Cell Spotter[®] System se refiere a un sistema automatizado de fluorescencia microscópica para el recuento automatizado de células aisladas de la sangre. El sistema contiene un microscopio de fluorescencia integrado controlado por ordenador y una fase automatizada con una horquilla magnética que albergará un cartucho de muestra desechable. La horquilla magnética está diseñada para permitir que células tumorales candidatas marcadas con un fluido de hierro dentro de la cámara de muestras se puedan localizar magnéticamente en la superficie de visión superior del cartucho de muestra para su visualización al microscopio. El software presenta al operador células cancerígenas sospechosas, marcadas con anticuerpos para la citoqueratina y que tienen un origen epitelial, para su selección final.

Aunque el aislamiento de las células tumorales para el Cell Spotter[®] System se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica, una forma de realización utiliza el sistema Immunicon CellPrep[™] System para aislar células tumorales utilizando 7,5 ml de sangre completa. Se agregan partículas magnéticas específicas de células epiteliales y se incuban durante 20 minutos. Después de la separación magnética, las células unidas a los anticuerpos

de unión inmunomagnética se mantienen magnéticamente a la pared del tubo. A continuación los componentes no unidos se aspiran, y se añade una disolución isotónica para volver a suspender la muestra. Con la muestra se incubaba un colorante de ácidos nucleicos, anticuerpos monoclonales para la citoqueratina (un marcador de las células epiteliales) y CD 45 (un marcador de leucocitos de amplio espectro). Después de la separación magnética, la fracción libre se aspira de nuevo y las células marcadas y unidas se resuspenden en 0,2 ml de una disolución isotónica. La muestra se suspende en una cámara de presentación de células y se colocan en un dispositivo magnético cuyo campo orienta a las células marcadas magnéticamente para su examen al microscopio de fluorescencia en el Cell Spotter[®] System. Las células son identificadas automáticamente en el Cell Spotter[®] System y las células tumorales circulantes candidatas son presentadas al operador para su verificación con una lista. Una lista de verificación consiste en criterios morfológicos predeterminados que constituyen una célula completa (ver Ejemplo 1).

El potencial de diagnóstico del Cell Spotter[®] System, junto con el uso de células tumorales circulantes intactas como factor pronóstico en la supervivencia del cáncer, pueden proporcionar un procedimiento rápido y sensible para determinar el tratamiento apropiado. Por consiguiente, en la presente invención se proporciona un procedimiento para el recuento rápido y la caracterización de células tumorales diseminadas en la sangre de pacientes con enfermedad metastásica y primaria para la evaluación del pronóstico del potencial de supervivencia.

Los procedimientos de la invención son útiles en la evaluación de una supervivencia favorable o desfavorable, e incluso en la prevención de la terapia innecesaria que podría dar lugar a efectos secundarios perjudiciales cuando el pronóstico es favorable. Por lo tanto, la presente invención se puede usar para el pronóstico de cualquiera de una amplia variedad de cánceres, incluyendo, sin limitación, tumores sólidos y leucemia, incluyendo cánceres destacados: apudoma, coristoma, branquioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinoma (es decir, de Walker, de células basales, basocamuso, de Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, de Krebs 2, de células de Merkel, mucinosa, pulmonar de células no pequeñas, de células pequeñas, papilar, escurro, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células de transición), trastornos histiocíticos, leucemia (es decir, de células B, de células mixtas, de células nulas, de células T, crónica de células T, asociada a HTLV-II, linfocítica aguda o linfocítica crónica, de mastocitos, y mielóide), histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, inmunoproliferativa del intestino delgado, linfoma no de Hodgkin, plasmocitoma, reticuloendoteliosis, melanoma, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma, lipoma, liposarcoma, mesotelioma, mixoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, cordoma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma, mesenquimoma, mesonefoma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, timoma, tumor trofoblástico, adenocarcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistoadenocarcinoma, cistoadenoma, tumor de células granulosas, ginandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, tumor de las células de los islotes pancreáticos, tumor de las células icdydig, papiloma, tumor de las células de Sertoli, tumor de las células de la teca, leiomioma, leiomiosarcoma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, rabdomioma, rabdomyosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma no cromafín, angioqueratoma, hiperplasia angioliñoide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, glomangioma, hemangioendotelio, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, linfangioma, linfangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, condrosarcoma, cistosarcoma, filoides, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomiosarcoma, leucosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, miosarcoma, mixosarcoma, carcinoma de ovario, rabdomyosarcoma, sarcoma (es decir, experimental de Ewing, de Kaposi y de células mastocíticas), neoplasias (es decir, de hueso, de mama, aparato digestivo, colorrectal, hígado, páncreas, hipófisis, testículo, orbital, cabeza y cuello, sistema nervioso central, acústico, pélvico, tracto respiratorio y urogenital, neurofibromatosis, y displasia cervical).

Los siguientes ejemplos ilustran el valor predictivo y pronóstico de las CTC en la sangre de pacientes. Nótese que los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no se pretende en modo alguno que limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Recuento de células positivas para citoqueratina circulantes con CellPrep[™]

Se aislaron células positivas para citoqueratina con el sistema CellPrep[™] System usando una muestra de 7,5 ml de sangre completa. Se añadió fluido inmunomagnético específico de células epiteliales y se incubó durante 20 minutos. Después de la separación magnética durante 20 minutos, las células unidas a los anticuerpos de unión inmunomagnética se sujetaron magnéticamente a la pared del tubo. A continuación los componentes no unidos se aspiran, y se añade una disolución isotónica para volver a suspender la muestra. Con la muestra se incubaba un colorante de ácidos nucleicos, anticuerpos monoclonales para la citoqueratina (un marcador de las células epiteliales) y CD 45 (un marcador de leucocitos de amplio espectro) durante 15 minutos. Después de la separación magnética, la fracción libre se aspira de nuevo y las células marcadas y unidas se resuspenden en 0,2 ml de una disolución isotónica. La muestra se suspende en una cámara de presentación de células y se colocan en un dispositivo magnético cuyo campo orienta a las células marcadas magnéticamente para su examen al microscopio de fluorescencia en el Cell

Spotter® System. Las células son identificadas automáticamente en el Cell Spotter® System; las células control son contadas por el sistema, mientras que las células tumorales circulantes candidatas son presentadas al operador para el recuento mediante una lista de verificación como se muestra (Figura 1).

Ejemplo 2

5 **Evaluación de la carga tumoral: Comparación entre el análisis de imágenes radiográficas y el número absoluto de CTC.**

10 Actualmente se utilizan mediciones radiológicas de las lesiones metastásicas para evaluar la carga tumoral en pacientes de cáncer con metástasis. En general, se miden las lesiones más grandes y se suman para obtener una carga tumoral. En la Figura 2A se ilustra un ejemplo de una medida bidimensional de una metástasis hepática en un paciente con cáncer de mama. En la Figura 2B se ilustra un modelo que representa la necesidad de medir la carga tumoral en la sangre como medida de la carga tumoral activa real, y por lo tanto una medida mejor de la actividad global de la enfermedad. Para determinar si el número absoluto de CTC está correlacionado o no con la dimensión del tumor medido por la imagen se llevó a cabo un estudio prospectivo en pacientes con MBC.

15 Se usó el sistema Cell Spotter® System para el recuento de CTC en 7,5 ml de sangre procedente de 69 pacientes con MBC medible. La carga tumoral se evaluó mediante mediciones radiográficas bidimensionales de hasta 8 lesiones medibles antes del inicio de la terapia. La carga tumoral se determinó mediante la adición de las mediciones individuales (mm²). Las CTC se cuentan en la extracción de sangre antes del inicio de la terapia.

20 La Figura 3 muestra el número de CTC en 7,5 ml en comparación con las sumas bidimensionales de las mediciones del tumor en los 69 pacientes. En la Figura 3, no existe una correlación entre el tamaño del tumor y el número absoluto de células tumorales en la sangre. Algunos pacientes con tumores de gran tamaño, medido por la imagen, tienen un número de CTC bajo, y viceversa.

Por lo tanto, la carga tumoral, medida por la obtención de imágenes radiográficas no se correlaciona con el número absoluto de células tumorales en la sangre.

Ejemplo 3

25 **Evaluación de la carga tumoral: Comparación entre los cambios en la imagen radiográfica y los cambios en el número absoluto de CTC.**

30 La obtención de imágenes radiográficas es el estándar actual para evaluar si una determinada enfermedad está respondiendo, está estabilizada, o está progresando con el tratamiento. El intervalo entre las mediciones radiográficas debe ser de al menos 3 meses para dar resultados significativos. Por lo tanto, una prueba que podría predecir una respuesta al tratamiento más temprana durante el ciclo de tratamiento podría mejorar la gestión de los pacientes tratados por enfermedades metastásicas, lo que podría aumentar su calidad de vida y, posiblemente, mejorar su supervivencia. En este estudio, se evaluaron pacientes que inician una nueva línea de tratamiento para el MBC para determinar si un cambio en el número de CTC está correlacionado con un cambio en el estado del paciente, medido por la obtención de imágenes.

35 Se usó el sistema Cell Spotter® System para el recuento de CTC en 7,5 ml de sangre en pacientes con MBC a punto de comenzar un nuevo tratamiento, y en distintos momentos durante el ciclo de tratamiento. Se realizaron mediciones radiográficas antes del inicio de la terapia, 10-12 semanas después del inicio de la terapia y después de la finalización del ciclo de tratamiento (aproximadamente 6 meses después del inicio de la terapia), o en el momento en el que el paciente evolucionase en la terapia, lo que ocurriera primero.

40 A partir del análisis de imagen, se encontró una respuesta parcial en 14 pacientes (17 segmentos de datos). Las CTC se redujeron o permanecieron indetectables en todos los casos (ver Figura 4). Mediante la imagen se encontró la estabilización de la enfermedad en 30 pacientes (37 segmentos de datos). Las CTC se redujeron o permanecieron no detectables en todos los casos (ver Figura 4). Mediante la imagen se encontró la progresión de la enfermedad en 14 pacientes (15 segmentos de datos). Las CTC se incrementaron en 7 de 15 casos. No se detectaron CTC en ningún momento en los otros 8 casos.

45 Sólo se observó un aumento de las CTC en pacientes con progresión de la enfermedad (100%). Sólo se observó una disminución de las CTC en pacientes con respuesta parcial o enfermedad estable (100%). En los pacientes con respuesta parcial o enfermedad estable, no se detectaron CTC en ambos momentos en 54 de 61 casos (89%).

Ejemplo 4**Evolución del número de CTC en pacientes tratados por MBC como guía para el tratamiento.**

Se llevó a cabo un estudio en pacientes con MBC para determinar si se pueden observar tendencias claras o no en los cambios del número de CTC en pacientes tratados por MBC, y si se pueden aplicar reglas simples o no a estas tendencias con el fin de guiar al médico que atiende en la optimización del tratamiento de pacientes con MBC.

5 Se usó el sistema Cell Spotter[®] System para el recuento de CTC en 7,5 ml de sangre. En el estudio se incluyeron 81 pacientes, que comienzan una nueva línea de tratamiento para el MBC. Las CTC se cuentan en la extracción de sangre antes del inicio de la terapia y aproximadamente cada mes a partir de entonces.

10 Se observaron tendencias claras en el número de CTC en 76 de 81 (94%) pacientes. Durante el transcurso del tratamiento, el número de CTC no fue detectable o se mantuvo por debajo de 5 CTC por 7,5 ml de sangre en el 50% de los pacientes. En la Figura 6A se muestra un ejemplo típico. El número de CTC se redujo durante el transcurso de la terapia en un 22% de los pacientes. En la Figura 6B se muestra un ejemplo típico. Se observó una disminución en el número de CTC seguido por un aumento en el transcurso del tratamiento en el 6% de los pacientes. En la Figura 6C se muestra un ejemplo típico. El número de CTC se incrementó durante el transcurso de la terapia en el 16% de los pacientes. En la Figura 6D se muestra un ejemplo típico. En 42 casos, se prepararon y se analizaron 2 muestras de sangre en el momento de cada extracción de sangre. Los resultados con los primeros tubos extraídos en el momento inicial y el primer tubo extraído en el punto de seguimiento se compararon con los resultados de los segundos tubos extraídos en cada punto. En sólo uno de esos casos, el cambio en el número de CTC fue diferente entre los primeros tubos extraídos y los segundos (o duplicados) tubos extraídos (98% de concordancia). En este caso, los dos tubos de la primera extracción de sangre presentaban 0 CTC, mientras que para la extracción de sangre en segundo lugar, un tubo tenía 5 CTC (por debajo del límite) y el segundo tubo tenía 6 CTC (por encima del límite). En comparación con la reproducibilidad de las mediciones de CTC, la variabilidad inter-radiólogos de imágenes radiográficas, cuando las mismas películas fueron leídas por dos radiólogos expertos diferentes dieron lugar a una concordancia de sólo el 81%. Además, la concordancia entre los dos radiólogos en un conjunto de 146 segmentos de imágenes fue del 85% cuando se midió la Progresión frente a la no progresión, y se redujo a sólo el 58% cuando se midió la Progresión, enfermedad estable y respuesta parcial. En contraste, el análisis de medición de CTC se realizó sobre el mismo conjunto de datos por dos técnicos diferentes, lo que da lugar a una concordancia del 100%.

Por lo tanto, la detección y el seguimiento de las CTC en pacientes tratados por MBC es un procedimiento más reproducible para medir la respuesta a la terapia que las imágenes radiográficas.

Ejemplo 5**30 Predicción de la SLP y la SG antes del inicio de la terapia.**

Se llevó a cabo un estudio para correlacionar los niveles de CTC antes del inicio de la terapia con la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) por lo que se usó un valor umbral de ≥ 5 CTC/7,5 ml.

35 177 pacientes con MBC medible fueron sometidos a prueba para las CTC en 7,5 ml de sangre antes de iniciar una nueva línea de tratamiento y en intervalos mensuales posteriores durante un período de hasta seis meses. En el ensayo se incluyeron pacientes que entran en cualquier tipo de terapia o cualquier línea de tratamiento. La progresión o la respuesta a la enfermedad fueron evaluadas por médicos en los lugares de cada paciente.

40 Como se muestra en la Figura 7, la mediana de la SLP disminuyó a medida que los niveles de CTC aumentaron y llegó a un nivel que se estabilizó en 5 CTC (línea vertical). La mediana de la SLP fue de aproximadamente 5,9 meses para todos los pacientes (punto negro). Basándose en el cambio de la media de la SLP para pacientes positivos y la relación de riesgo de Cox, se usó un límite de ≥ 5 CTC para todos los análisis posteriores.

45 La Figura 8 muestra un análisis de Kaplan-Meier de la Supervivencia libre de progresión (SLP) y de la Supervivencia global (SG) usando el número de CTC medidas al inicio de las extracciones de sangre. En los 177 pacientes, el tiempo medio de SLP fue de aproximadamente 5,0 meses. Los pacientes con ≥ 5 CTC/7,5 ml de sangre al inicio del estudio tenían una SLP significativamente menor que los pacientes con < 5 CTC (aproximadamente 2,7 meses frente a 7,0 meses, respectivamente). La supervivencia global (SG) refleja la misma tendencia con una mediana de SG de 10,1 meses frente a > 18 meses para pacientes con ≥ 5 CTC vs < 5 CTC, respectivamente.

50 La medición del número de CTC antes del inicio de una nueva línea de tratamiento predice el tiempo hasta que los pacientes progresen en su terapia, y predice el tiempo de supervivencia. Debido a esta capacidad de predicción, la detección y medición de las CTC al inicio proporciona información a los médicos que será útil en la selección de un tratamiento adecuado. Además, la capacidad de estratificar a los pacientes en grupos de alto y bajo riesgo en términos de SLP y SG puede ser muy útil para seleccionar a pacientes adecuados para su inclusión en

ensayos terapéuticos. Para obtener nuevos fármacos con toxicidad potencialmente alta, los pacientes con factores de mal pronóstico pueden ser la población objetivo más apropiada. En contraste, los fármacos con una toxicidad mínima y una eficacia terapéutica prometedora se pueden dirigir de manera más apropiada a pacientes con factores pronósticos favorables.

5 Ejemplo 6

Predicción de la SLP y la SG después del inicio del tratamiento.

Se llevó a cabo un estudio para correlacionar los niveles de CTC después del inicio de la terapia con la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG) utilizando el número de CTC en el primer seguimiento para predecir la SLP y la SG.

10 Para este análisis se evaluaron 163 pacientes con MBC medible. Se extrajo sangre una media de 4 semanas después del inicio de una nueva línea de tratamiento. La progresión o la respuesta a la enfermedad fueron evaluadas por los médicos en los lugares para cada paciente en un tiempo promedio de 12 semanas después del inicio de la terapia.

15 Como se muestra en la Figura 9, de los 49 pacientes con ≥ 5 CTC por 7,5 ml en un primer seguimiento tuvo una mediana de la SLP significativamente menor en comparación con los 114 pacientes con < 5 CTC por 7,5 ml, aproximadamente 2,1 meses frente a 7,0 meses, respectivamente. La misma tendencia se observó para la mediana de la supervivencia global, aproximadamente 8,2 meses para ≥ 5 CTC y > 18 meses para < 5 CTC.

20 En un análisis por separado, comparamos dos grupos con una SLP y SG más cortas o más largas conocidas a la de pacientes con disminución de las CTC. En concreto, los pacientes cuyas CTC eran < 5 al inicio y en el primer seguimiento se sabe que tienen una SLP y una SG relativamente largas; es decir, se trataba de una población con un rendimiento relativamente bueno. Por el contrario, los pacientes cuyas CTC aumentaron desde el inicio hasta el primer seguimiento con un nivel de CTC > 5 en el primer seguimiento se sabe que tienen una SLP y una SG relativamente cortas, es decir, se trataba de una población de pacientes con resultados relativamente pobres. A continuación, se compararon dos grupos adicionales de pacientes con estos dos primeros grupos: en primer lugar, los pacientes cuyas CTC disminuían desde el inicio hasta el primer seguimiento a un nivel < 5 . En segundo lugar, se evaluó a pacientes cuyas CTC disminuían desde el inicio hasta el primer seguimiento, pero el número de CTC en el primer seguimiento era ≥ 5 . Los resultados se muestran en la Figura 10. Para los primeros grupos control con unas CTC < 5 al inicio y en el primer seguimiento, la SLP y la SG son relativamente largas, como se esperaba. Para el segundo grupo control con aumento de células, la SLP y la SG son relativamente mucho más cortas, de nuevo como se esperaba. Para los pacientes cuyas CTC se redujeron a < 5 en el primer seguimiento, la SLP y la SG se aproximaban a la de los pacientes que tenían < 5 CTC en ambos momentos. Por el contrario, para los pacientes cuyas CTC disminuían, pero no disminuían a < 5 , su pronóstico era tan malo como el de los pacientes con CTC en aumento.

30 En consecuencia, las CTC deben descender por debajo de 5 en el primer seguimiento (aproximadamente 4 semanas) para maximizar la SLP y la SG, y para maximizar el beneficio asociado a la terapia.

35 Ejemplo 7

Análisis unifactorial y multifactorial de predictores de la SLP y la SG.

40 Con el fin de comparar los niveles de CTC con parámetros conocidos asociados a la SLP y la SG, se llevaron a cabo análisis de regresión unifactorial y multifactorial del riesgo proporcional de Cox. Para predecir la SLP, sólo eran unifactorialmente significativas la línea de terapia, el tipo de terapia y los niveles de CTC al inicio y en el primer seguimiento. Para la SG, también eran unifactorialmente significativas el estado de ER/PR, donde ER/PR se considera positiva si el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, o ambos son positivos. El estado del paciente medido utilizando las directrices ECOG también resultó unifactorialmente significativo para la SG, donde ECOG es el estado del Grupo de Oncología Cooperativa Europeo, que varía entre 0 a 5 (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de regresión unifactorial de Cox de parámetros independientes para la predicción de la SLP y la SG.

Parámetro	Categorías			SLP			SG		
	Pos	Neg	Nº pac	HR	p-val	chi ²	HR	p-val	chi ²
Edad (años)	Edad al inicio		175	0,99	0,1099	2,56	0,99	0,1992	1,65
ECOG	2 vs 1 vs 0		172	1,10	0,4465	0,58	1,63	0,0075	7,16
Etapas	4 vs 3 vs 2 vs 0		164	0,94	0,5591	0,34	1,10	0,4746	0,51
Estado ER/PR	+	-	175	0,85	0,3827	0,76	0,57	0,0253	5,00
Estado HER2	3 vs 2 vs 1		148	0,90	0,1895	1,72	0,90	0,3557	0,85
Tiempo para metástasis	Años		175	0,97	0,0252	5,01	0,92	0,0028	8,92
Línea de Terapia	≥ 2º	1º	175	1,68	0,0025	9,14	2,06	0,0042	8,19
Tipo de Terapia	Quimo	Hormonal	172	1,81	0,0016	9,97	3,46	0,0001	15,61
CTC al inicio	≥ 5	< 5	177	1,95	0,0001	15,33	4,39	0,0000	31,73
CTC en el 1º seguimiento	≥ 5	< 5	163	2,73	0,0000	25,25	5,54	0,0000	38,02

Etapas = estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico primario, Pos = positivo, Neg = negativo, Quimo = quimioterapia con o sin otros tratamientos, Horm. = Terapia hormonal y/o inmunoterapia, HR = relación de riesgo de Cox. La edad y el tiempo para la metástasis se evaluaron como variables continuas.

5 La regresión de Cox por etapas a un nivel de severidad de $p < 0,05$ para incluir y excluir parámetros se utiliza por separado para los niveles de CTC iniciales y del primer seguimiento para predecir la SLP y la SG. Aunque algunos de los factores clínicos mantuvieron su importancia en el análisis multivariado, los niveles de CTC iniciales y de CTC positivos persistentes en el primer seguimiento aparecieron como los predictores más fuertes de la SLP y la SG (Tabla 3).

10 **Tabla 3.** Análisis de regresión multifactorial de Cox para la predicción de la SLP y la SG mediante la selección por etapas a un nivel de severidad de $p < 0,06$.

Parámetro	Categorías		SLP			SG		
	Pos	Neg	HR	p-val	chi ²	HR	p-val	chi ²
Análisis usando el recuento de CTC iniciales			(n = 172)			(n = 170)		
CTC al inicio	≥ 5	< 5	1,76	0,001	10,58	4,26	0,000	22,35
Línea de Terapia	≥ 2º	1º	1,73	0,002	9,75	2,38	0,001	10,32
Tipo de Terapia	Quimo	Hormonal	1,61	0,016	5,85	2,54	0,015	5,90
ECOG	2 vs 1 vs 0		ns	ns	ns	1,48	0,024	5,10
Tiempo para metástasis	Años		ns	ns	ns	0,92	0,028	4,82
Análisis usando el recuento del 1º Seguimiento de CTC			(n = 162)			(n = 160)		
1º Seguimiento de CTC	≥ 5	< 5	2,52	0,000	23,56	6,49	0,000	38,34
Estado de ER/PR	+	-	ns	ns	ns	0,35	0,001	11,19
Línea de Terapia	≥ 2º	1º	1,58	0,013	6,22	2,29	0,006	7,67
ECOG	2 vs 1 vs 0		ns	ns	ns	1,53	0,025	5,05

5 Se utilizó el análisis de regresión multifactorial de Cox con un proceso de selección por etapas para evaluar la asociación con la SLP y la SG. Se usó un nivel de rigurosidad (valor de p) de 0,05 para incluir y excluir parámetros en el análisis multifactorial. Los resultados para cada parámetro que ha demostrado una correlación estadísticamente significativa para la SLP y la SG se resumen en la tabla. El número de CTC fue el predictor más fuerte de la SLP y la SG.

Etapa = estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico principal, Pos = positivo

Neg = negativo, HR = relación de riesgo de Cox, ns = no significativo en el análisis multifactorial

Ejemplo 8

Evaluación de la respuesta a la terapia basada en las CTC después del primer seguimiento.

10 Se llevó a cabo un estudio realizado en pacientes con MBC para determinar si el número de CTC tras el primer seguimiento proporciona un índice relevante, o no, para evaluar la respuesta al tratamiento.

15 Se utilizó el sistema Cell Spotter[®] System para el recuento de las CTC en 7,5 ml de sangre. 163 pacientes diagnosticados clínicamente con cáncer de mama metastásico se compararon para las CTC en la extracción de sangre del primer seguimiento con un promedio de $4,5 \pm 2,4$ semanas (mediana de 4,0 semanas, que varía entre 1,4 y 16,9 semanas) desde el momento de la extracción de sangre inicial. Las CTC se contaron en la extracción de sangre antes del inicio de la terapia y aproximadamente cada mes a partir de entonces. Usando un valor umbral inferior a 5 CTC por 7,5 ml de sangre, se compararon el recuento de CTC en el primer seguimiento con el estado clínico del paciente, de tal manera que los pacientes con enfermedad estable o que responden fueron clasificados como Sin progresión, y los pacientes con progresión de la enfermedad clínica basándose en la determinación de las imágenes bidimensionales desde el inicio y el primer seguimiento fueron clasificados como Progresión (Ver Tabla 4).

20 **Tabla 4:** Recuento de pacientes con cáncer de mama metastásico en el momento de la extracción de sangre del primer seguimiento.

Determinación de la obtención de imágenes	Pacientes con < 5 CTC después del 1 ^{er} seguimiento	Pacientes con \geq 5 CTC después del 1 ^{er} seguimiento	Total
Estable o que responde (sin progresión)	94	14	108
Progresión	20	35	55
Total	114	49	163

25 Cuando se sometieron a ensayo 94 pacientes con menos de 5 CTC en el primer seguimiento no mostraron progresión de la enfermedad, lo que demuestra una concordancia entre los recuentos de CTC y la respuesta al tratamiento. Cuando se sometieron a ensayo 35 pacientes con 5 o más CTC en el primer seguimiento mostraron progresión de la enfermedad, lo que demuestra de nuevo una concordancia entre el número de CTC en el momento del primer seguimiento y la falta de respuesta al tratamiento. 20 pacientes presentaban menos de 5 CTC con progresión de la enfermedad, que representa resultados de falsos negativos. Estos resultados no serían clínicamente contraproducentes puesto que estos pacientes continuaron recibiendo tratamiento, de la misma forma que lo recibirían si no se usase el análisis de CTC. Sin embargo, 14 pacientes presentaron \geq 5 CTC en el primer seguimiento sin evidencias radiográficas de progresión, lo que indica respuestas de falsos positivos. Aunque estas respuestas podrían dar lugar al cambio de terapia en un paciente que podría beneficiarse de dicha terapia, se espera que la nueva terapia sea útil en estos pacientes, y que el número de falsos positivos sea aceptablemente bajo. Por lo tanto, en general, el recuento de CTC en el primer seguimiento dio una indicación de la respuesta al tratamiento en 129 de los 163 pacientes evaluados.

30

35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el pronóstico de la supervivencia de un paciente que comprende:

5 a) enriquecer inmunológicamente una fracción de una muestra de sangre de dicho paciente, comprendiendo dicha muestra una población de células mixtas sospechosas de contener células tumorales circulantes (CTC), en donde dicha etapa de enriquecimiento comprende mezclar dicha muestra con partículas magnéticas acopladas a un anticuerpo que se une específicamente a EpCAM y someter dicha mezcla de partículas magnéticas-muestra a un campo magnético para producir una suspensión celular enriquecida en CTC unidas a partículas magnéticas,

10 b) confirmar la integridad estructural de las CTC positivas para citoqueratina de que se encuentran intactas, en donde las células positivas para citoqueratina se identifican mediante el marcaje con un anticuerpo monoclonal para citoqueratina, y en donde dicha integridad estructural se determina mediante un análisis de las características morfológicas basado en fluorescencia, y

c) medir el número de dichas CTC intactas para determinar la supervivencia del paciente, en donde un número de CTC por encima o igual a cinco CTC por 7,5 ml de sangre es indicativo de un pronóstico de supervivencia más bajo.

15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho pronóstico de supervivencia se determina en pacientes con cáncer de mama metastásico, pacientes con cáncer de próstata metastásico y/o pacientes con cáncer de colon metastásico.

Figura 1

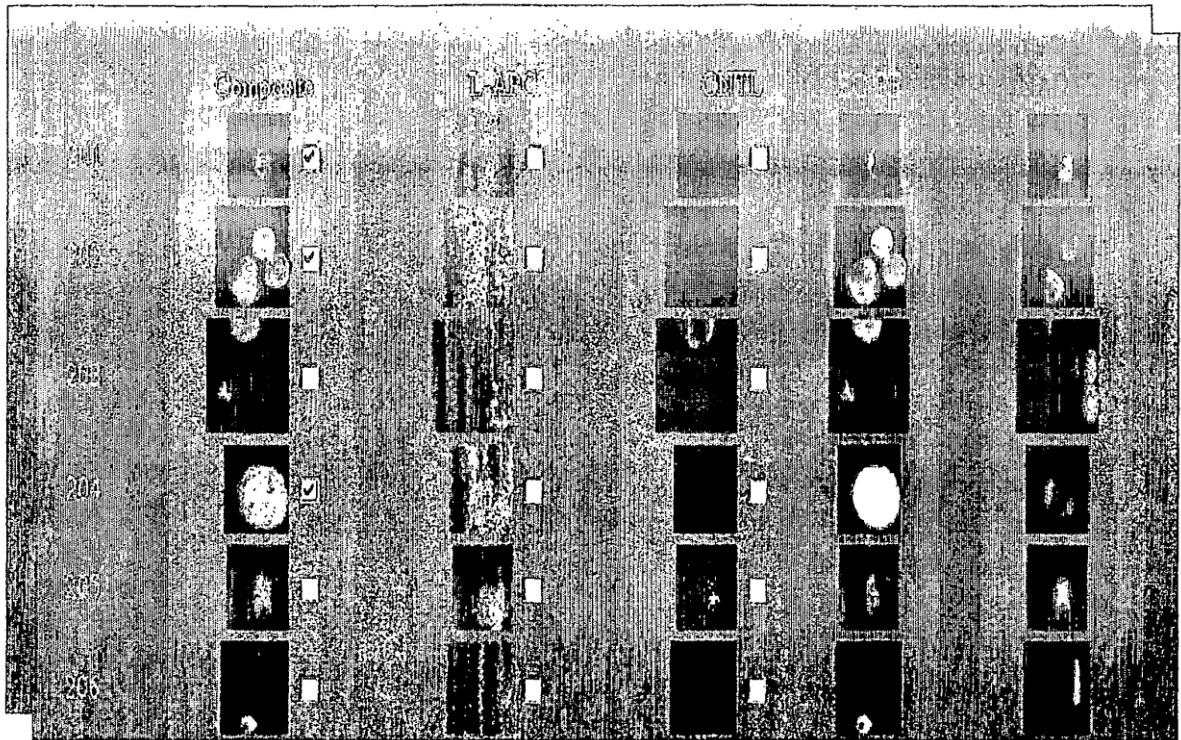


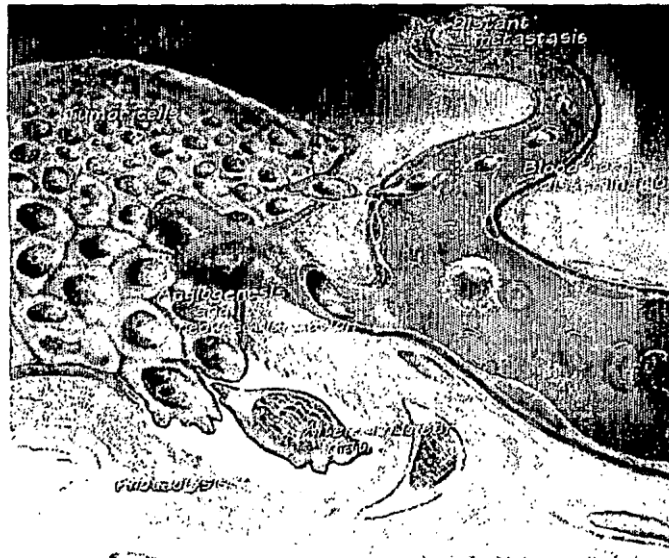
Figura 2

A: Estándar actual: Cambios en las imágenes radiográficas (de 1 a 8 lesiones medidas)



Imágenes de lesión por lesión

B: Hipótesis: El cambio en células tumorales en sangre de pacientes refleja mejor la eficacia del tratamiento para el cáncer de mama metastásico.



Biopsia del cuerpo completo

Figura 3

Sin correlación entre el recuento de CTC y el tamaño del tumor

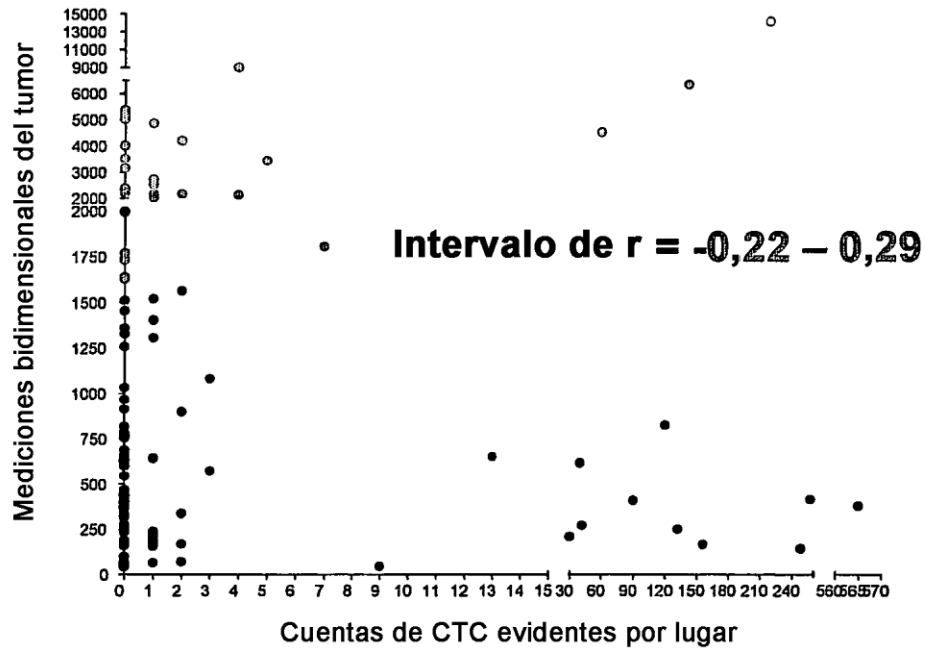


Figura 4

El DESCENSO en las CTC siempre está asociado a una Respuesta parcial o Estabilidad de la enfermedad

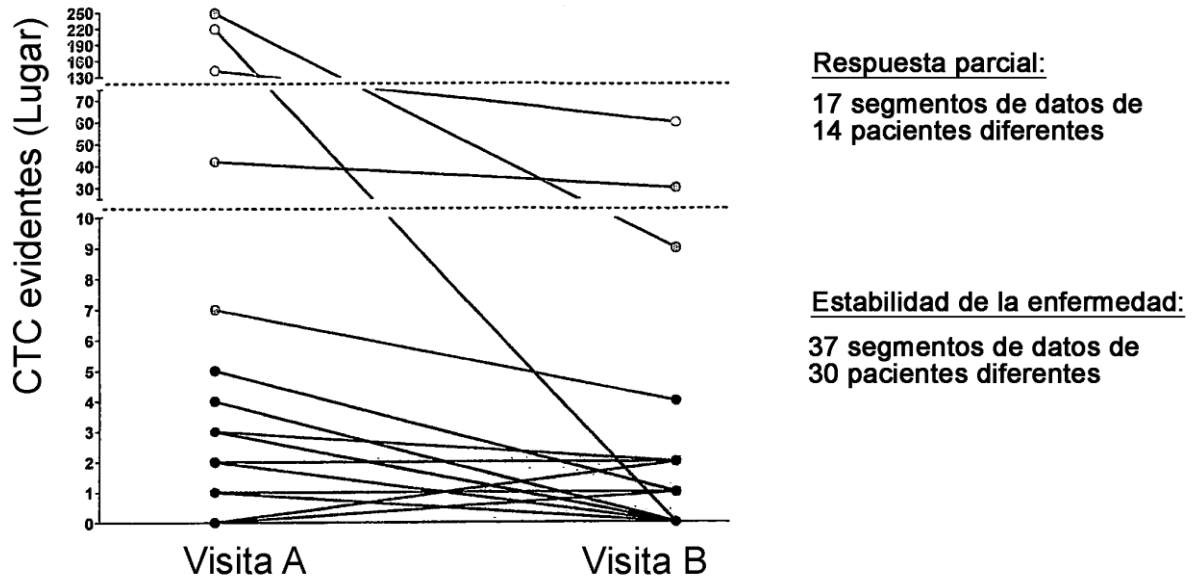


Figura 5

El INCREMENTO en las CTC siempre está asociado a una Progresión

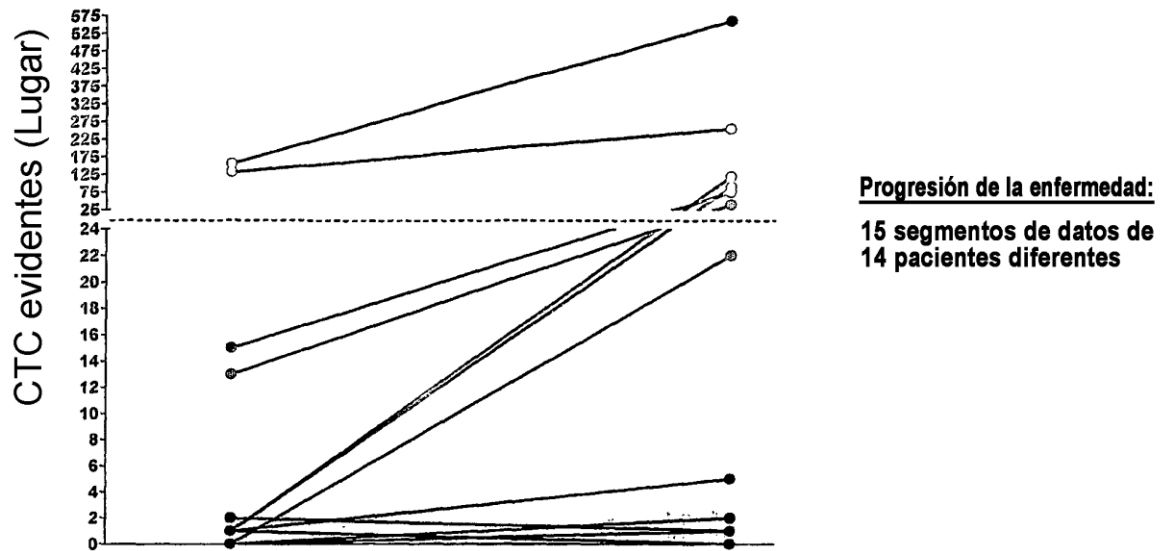
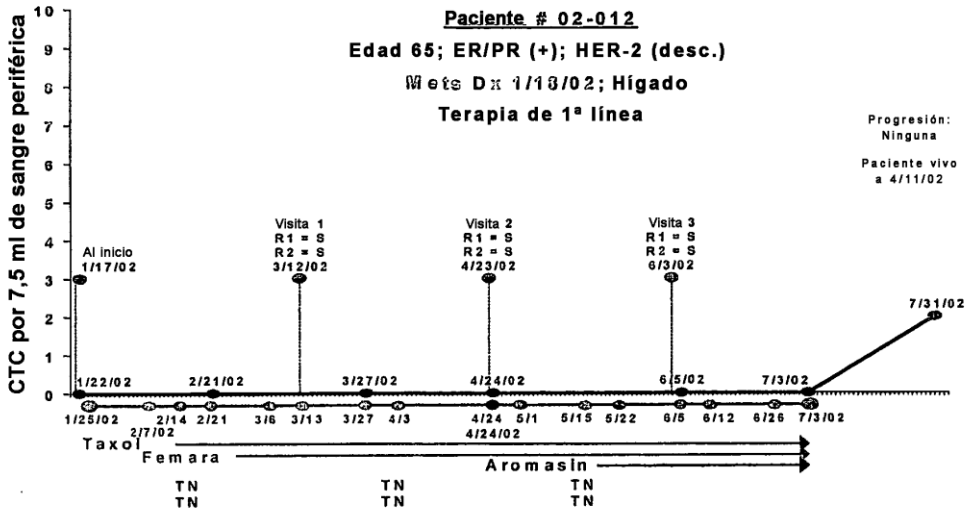


Figura 6

Grupo A: Menos de 5 CTC por 7,5 ml en todos los puntos



Grupo B: Descenso de las CTC

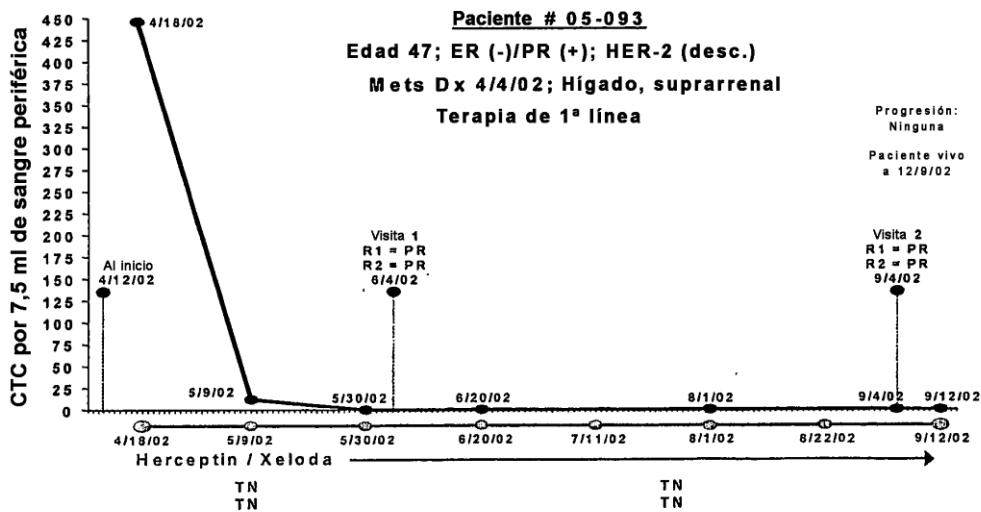
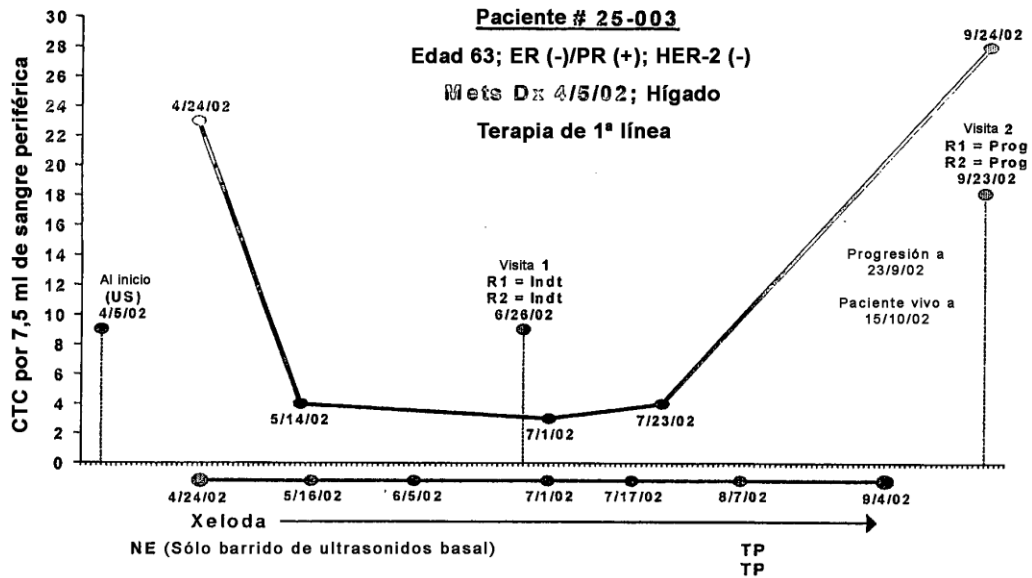


Figura 6 (continuación)

Grupo C: Descenso de las CTC seguido de un incremento



Grupo D: Incremento de las CTC

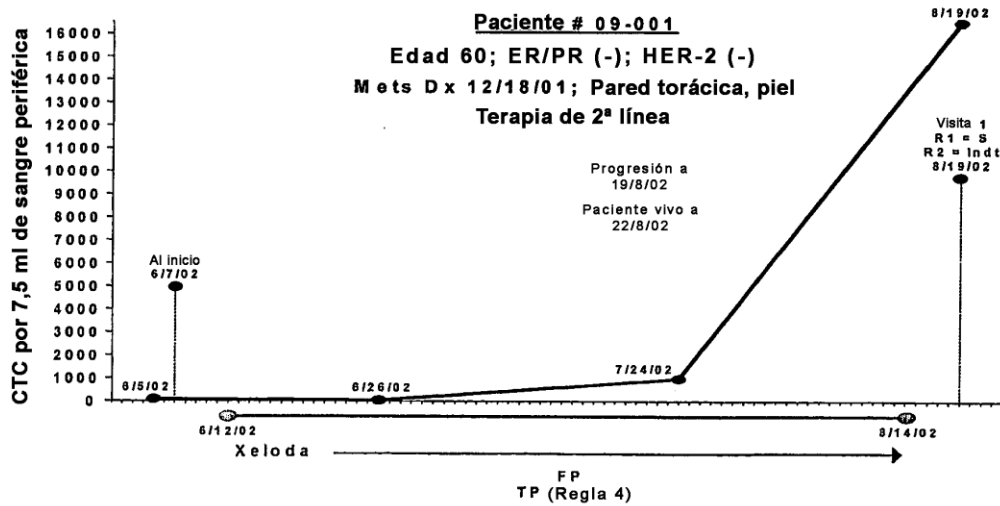


Figura 7

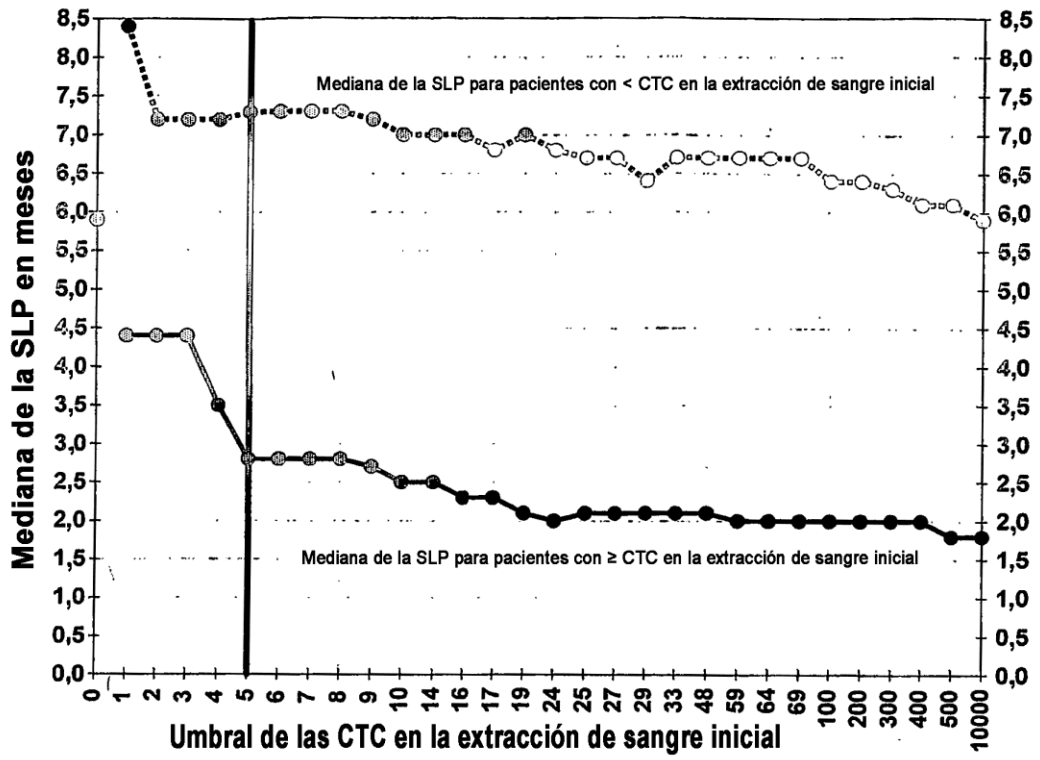
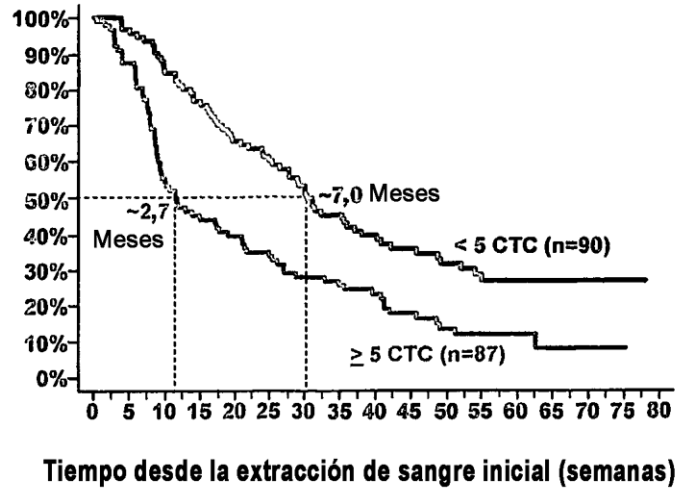


Figura 8

Grupo A
 Probabilidad en % de supervivencia libre de progresión



Grupo B

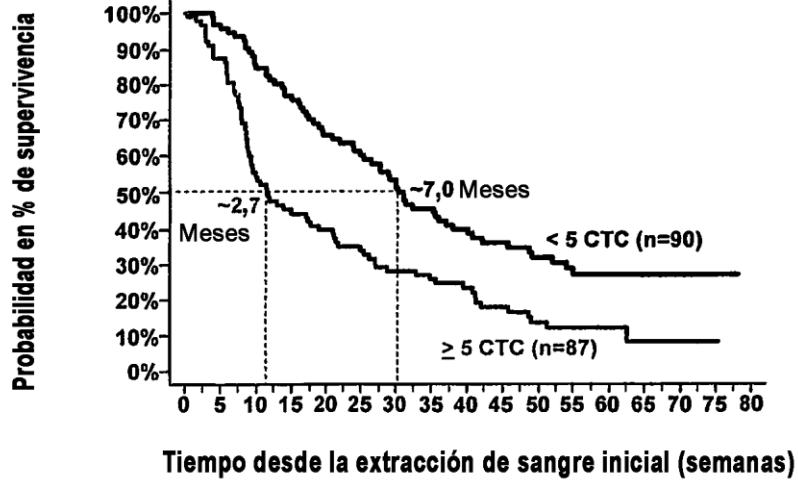
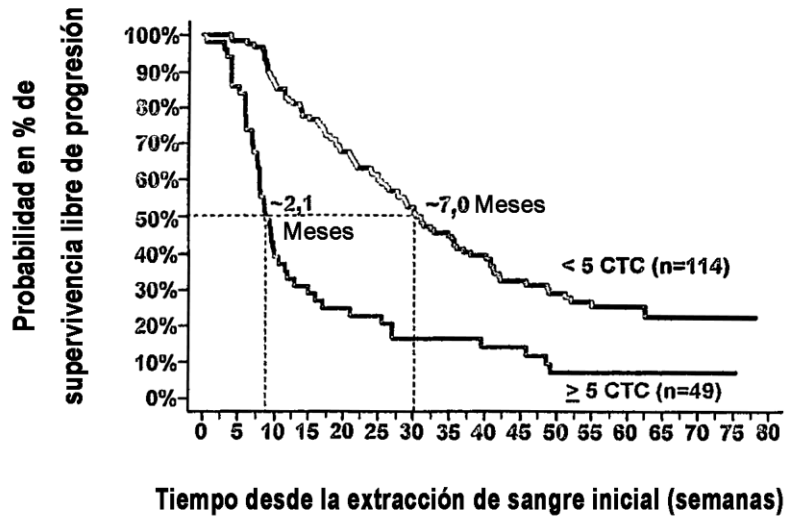


Figura 9

Grupo A



Grupo B

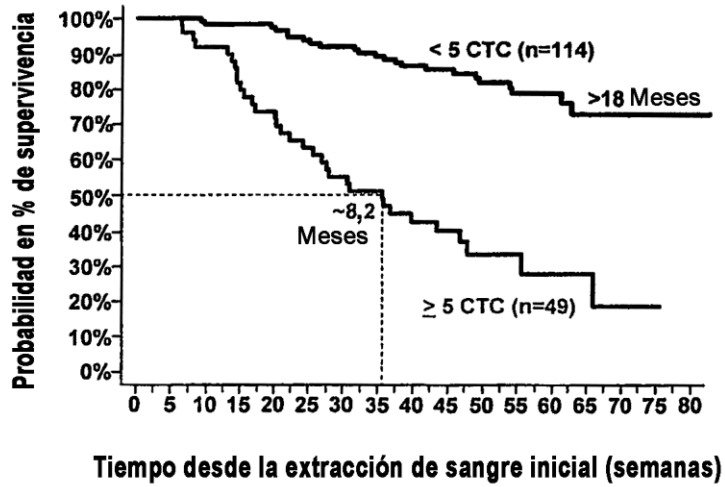


Figura 10

