

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 649**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2012 PCT/US2012/062989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067136**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2012 E 12845749 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2773962**

54 Título: **Ensayo para biomarcadores predictivos de la eficacia antiestrogénica**

30 Prioridad:

04.11.2011 US 201161555635 P

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

03.04.2017

73 Titular/es:

**INVIVIS SAS (100.0%)
2 Rue Jean Rostand
91400 Orsay, FR**

72 Inventor/es:

GILLES, ERARD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 607 649 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

Ensayo para biomarcadores predictivos de la eficacia antiestrogénica.

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a biomarcadores asociados a la sensibilidad de los antiestrógenos en cánceres, métodos para detectar y cuantificar los biomarcadores, y métodos para tratar pacientes de cáncer que muestran los biomarcadores.

10

ANTECEDENTES

Se utilizan habitualmente biomarcadores pronósticos y predictivos en la gestión clínica de los pacientes con cáncer de mama, y su evaluación se ha convertido en obligatoria como base para la toma de decisiones terapéuticas. Uno de tales biomarcadores es el receptor de estrógeno (ER), que es un factor de transcripción nuclear activado por los estrógenos para regular el crecimiento y la diferenciación de las células epiteliales normales de mama. El estrógeno también estimula el crecimiento de las células tumorales que expresan ER α , y la expresión de ER en tumores es un buen factor pronóstico para pacientes de cáncer de mama. Sin embargo, la expresión de ER α es también altamente predictiva de la sensibilidad tumoral a la intervención terapéutica con antiestrógenos. Los antiestrógenos incluyen antagonistas directos del receptor (por ejemplo, tamoxifeno y falzodex) e inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol y exemestano). Los antiestrógenos representan el mejor tratamiento disponible actualmente para el cáncer de mama en el entorno adyuvante. Desafortunadamente, en la actualidad no existe ningún método para predecir con exactitud la eficacia de tales terapias adyuvantes para un tumor particular en un paciente particular, ya que el fracaso del tratamiento no es reconocible hasta recaída. Sin embargo, se sabe que en el tratamiento del cáncer metastásico y cuando se expresa ER por los tumores, sólo el 50 % de estos cánceres responde al tratamiento antiestrógeno. Esto indica claramente que, mientras que la ausencia de receptores predice la ausencia de efecto, sólo un subconjunto de cánceres que expresan ER se beneficiará del tratamiento antiestrógeno.

La expresión de ER α en los tumores se evalúa en ensayos inmunohistoquímicos utilizando anticuerpos marcados dirigidos al receptor, lo que da como resultado una tinción visible. Típicamente, los especímenes de tumor incluidos en parafina fijados con formalina se evalúan bajo visualización microscópica directa, y el número de células teñidas se cuantifica como un porcentaje de células totales. Existe una variación significativa en la positividad por este método, y los tumores que expresan ER α pueden contener de casi el 0 a casi el 100 % de células positivas. Aunque no existe una correlación real entre la probabilidad de respuesta clínica a las terapias hormonales y el nivel de expresión ER α , es notable que incluso los tumores que expresan niveles muy bajos (por ejemplo, 1-10 % de células positivas) pueden mostrar una respuesta significativa, mientras que tumores negativos a ER α son básicamente totalmente insensibles. Por esta razón, se ha usado generalmente un umbral del 1 % de células positivas como la definición de positividad a ER α .

Los ensayos inmunohistoquímicos que se han descrito anteriormente proporcionan sólo una cuantificación del propio receptor de estrógeno. Es decir, que no tienen en cuenta si se une o no a su ligando en el ADN, el elemento receptor de estrógeno (ERE), o si tiene algún papel funcional. Por lo tanto, los ensayos inmunohistoquímicos actuales no proporcionan ninguna información sobre si el receptor de estrógenos que se detecta también está biológica o transcripcionalmente activado o no. Al igual que otros receptores de esteroides, los receptores de estrógeno están predominantemente presentes en el núcleo de la célula. En ausencia de unión al ERE, el receptor de estrógenos se observa como una tinción difusa nuclear en ensayos de inmunofluorescencia. Los estudios académicos en biología experimental han indicado que los receptores nucleares, tal como el receptor de estrógeno, forman agregados nucleares o focos en presencia de ligando que son visibles por microscopía. Estas estructuras subnuclear también pueden denominarse como motas y los núcleos que los contienen como núcleos hipermoteados. Tras la unión al ligando el receptor se mueve en la estructura del agregado subnuclear para activar la transcripción de una amplia diversidad de genes.

Los métodos más utilizados comúnmente en estudios que visualizan la formación de focos receptores de estrógenos han empleado líneas celulares transfectadas transitoriamente con ER α etiquetado con proteína verde fluorescente (GFP). Un ensayo disponible en el mercado de este tipo es el ensayo Redistribution[®] de ER α de Thermo Scientific (BioImage Products, Lafayette, CO). Este ensayo está diseñado para ensayar compuestos para determinar su capacidad para modular la acumulación de ER α en focos nucleares usando GFP para controlar la translocación. Los focos nucleares son detectados y analizados por un algoritmo de análisis de imágenes, revelando el movimiento regulado por ligandos de los receptores de estrógeno transfectados en focos subnucleares. La distribución nuclear

de los receptores endógenos también se ha detectado en líneas celulares utilizando inmunofluorescencia, pero ha habido muy pocos estudios que examinen la distribución de receptores nucleares en los tejidos primarios humanos o animales. Aunque estos tipos de ensayos son útiles para dilucidar los posibles mecanismos biológicos de la formación de focos de receptores de estrógeno, no proporcionan ninguna información sobre el proceso, cómo se produce, o su relevancia para la enfermedad en cánceres de origen natural. Los informes de reacciones de ER focales observadas en la tinción inmunohistoquímica de una sección de tejido o frotis aspiración con aguja fina son en realidad un artefacto de fijación inadecuada o heterogeneidad de la tinción en el tejido canceroso. Véase, por ejemplo, M. Nadji y col. (2005) Am. J. Clin. Pathol. 123: 21-27. Tal tinción focal de tejido canceroso heterogéneo puede observarse a bajo aumento y, a diferencia de los focos de ER subnucleares, no se refiere a una estructura molecular específica.

De hecho, la investigación académica básica en este campo muestra que los sistemas de modelos disponibles no son representativos de la variabilidad clínica del cáncer. A partir de 2005 se han desarrollado más de 140 líneas celulares de cáncer de mama humano, pero sólo aproximadamente un tercio de ellas expresan receptores de estrógeno y/o receptores de estrógeno. Se han desarrollado aproximadamente 50 líneas celulares de ratón y sólo unos pocos expresan el receptor de estrógeno o el receptor de estrógeno. Por el contrario, en el ámbito clínico el 75 % de las pacientes de cáncer de mama tienen tumores que son positivos para los receptores de hormonas. Estas estadísticas ilustran la insuficiencia de los sistemas modelo *in vitro* con respecto al desarrollo de métodos mejorados para la selección del tratamiento de cáncer apropiado para las pacientes de cáncer de mama individuales.

En los cánceres de origen natural, ER α unido al ligando en focos activados activa o inactiva potencialmente miles de genes. Por lo tanto, se ha sugerido que el ensayo inmunohistoquímico utilizado actualmente para identificar pacientes de cáncer de mama positivo a ER α y para determinar si el tratamiento antiestrógeno es apropiado podría mejorarse mediante el desarrollo de ensayos que analizan firmas de pronóstico y predictivas multigénicas. Este enfoque se basa en el supuesto de que la respuesta a las terapias hormonales es biológicamente demasiado compleja para predecirse con precisión midiendo la expresión de un único gen (es decir, la expresión de sólo el ER α). (D. C. Allred, Modern Pathology (2010) 23, S52-S59). Sin embargo, el ensayo de miles de genes para determinar un perfil predictivo o el intento de identificar los que son más relevantes es una estrategia costosa y a muy largo plazo. Además, debido a que el objetivo de los ensayos de receptores de estrógeno es principalmente para determinar qué tipos de cáncer son propensos a responder al tratamiento con antiestrógenos, y cuáles no, el estado de los genes individuales (es decir, activados o suprimidos) es poco probable que sea relevante para el objetivo clínico de antagonizar los efectos colectivos de estrógenos sobre la biología del cáncer (véase, por ejemplo, el documento WO2005/028681).

Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar los ensayos de receptores de estrógeno, incluyendo ensayos de ER α , que pueden identificar con más precisión y sensibilidad pacientes con cáncer de mama que son más propensos a responder a la terapia antiestrógeno. Dichos ensayos definen mejor qué pacientes se beneficiarán del tratamiento antiestrógeno. También hay una clara necesidad de métodos que mejoren la capacidad de identificar tumores positivos a receptores de estrógenos que probablemente se dirijan con más precisión por la terapia antiestrógeno. Un mejor direccionamiento ayuda a evitar un tratamiento innecesario y al desarrollo de estrategias de tratamiento más relevantes. Por ejemplo, si se sabía que los antiestrógenos de antemano a son ineficaces en un tumor en particular (particularmente en un tumor que es positivo a ER α por métodos convencionales), se evitará un tratamiento innecesario y podrán iniciarse otras opciones de tratamiento más rápidamente con mejores resultados esperados. La capacidad para predecir la eficacia antiestrógeno en un tumor particular también permitirá la selección temprana de combinaciones de tratamiento sinérgicas, tal como un inhibidor de mTOR (por ejemplo, everolimus).

También existe la necesidad de métodos de ensayo que predican con más precisión y sensibilidad la eficacia del tratamiento antiestrógeno en pacientes con cáncer de mama individuales, porque actualmente no hay medios para saber que el tratamiento ha fallado hasta que el paciente ha recidivado. La capacidad para predecir en su lugar el potencial fracaso del tratamiento antiestrógeno en el momento del diagnóstico proporciona un gran valor a la decisión de realizar el programa actual de 5 años de terapia adyuvante con antiestrógenos. Por lo tanto, un conocimiento temprano del potencial fracaso del tratamiento antiestrógeno puede evitar innecesariamente poner al paciente en riesgo de efectos secundarios del tratamiento, tal como el cáncer de endometrio, y apoyar las decisiones tempranas para seleccionar estrategias de tratamiento más adecuadas en un momento en el que las posibilidades de éxito son mejores.

La presente invención satisface estas necesidades. A diferencia de los ensayos de la técnica anterior, tales como el ensayo Thermo Scientific Estrogen Receptor alpha Redistribution[®], la presente invención proporciona un análisis de focos de ER en el tejido del tumor primario, independientemente de la presencia de un ligando de ER o un fármaco.

En un aspecto, los métodos ejemplares descritos en el presente documento se refieren a la presencia de focos de ER en los núcleos de las células en los tumores de origen natural que indican una anomalía que se puede utilizar para predecir la eficacia en ese paciente de un antiestrógeno que tiene propiedades antagonistas de ER. En otro aspecto, se ha descubierto que la caracterización de ER activado de forma constitutiva en la clínica es un nuevo y útil indicador de tumores y cánceres que son susceptibles al tratamiento con antiestrógenos.

RESUMEN

Los solicitantes han determinado que las anteriores necesidades en la técnica para la mejora de los ensayos de receptores de estrógeno (incluyendo ER α) que emplean muestras de tejido de cáncer de mama primario se pueden satisfacer mediante ensayos inmunohistoquímicos o citológicos que distinguen los cánceres en los que el receptor de estrógeno se activa biológicamente de aquellos en los que el receptor de estrógeno está presente pero biológicamente inactivo. Estos ensayos detectan la presencia de focos de ER o agregados en los núcleos de células cancerosas (ER biológicamente, transcripcionalmente activo) como una indicación del estado positivo a ER del tumor, en oposición al estado negativo a ER indicado por la tinción nuclear difusa (ER biológicamente inactivo) y/o ninguna tinción nuclear. La presencia de ER biológicamente activo proporciona una indicación de que el receptor de estrógeno que está presente está involucrado en la biología del tumor y, por lo tanto, es una diana apropiada para la terapia antiestrógeno. Por el contrario, la tinción nuclear difusa de los receptores de estrógeno indica que, aunque el tumor se considerará positivo a ER por métodos convencionales, es poco probable que sea sensible a la terapia antiestrógeno debido al estado biológicamente inactivo del receptor.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para la identificación de un subconjunto de tumores positivos a ER con más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con antiestrógenos, tales como tamoxifeno, faldodex, anastrozol, letrozol y exemestano. La formación de focos de receptores de estrógeno se ha estudiado en modelos experimentales homogéneos y artificiales. Sin embargo, cada tumor de origen natural es diferente y cada tumor de origen natural es heterogéneo. La importancia clínica de distinguir las células tumorales que expresan el receptor de estrógenos en forma biológicamente activa (es decir, unido a ligando en focos o agregados) a partir de células tumorales que expresan un receptor de estrógenos en forma biológicamente inactiva (no unida a ligando y en una distribución nuclear difusa) no se reconoció previamente. La expresión de receptores de estrógeno biológicamente activos (es decir, transcripcionalmente activos), visualizados como focos dentro de los núcleos de las células cancerosas, proporciona una diana potencial para la intervención por los antiestrógenos y la alteración de las rutas estimuladas por estrógenos del crecimiento de células tumorales. Es decir, en tales células tumorales, los antiestrógenos pueden inactivar potencialmente el ligando activado u otro ER activado de forma aberrante. Por el contrario, la expresión de ER transcripcionalmente inactivo, visualizado como una tinción nuclear difusa en la evaluación inmunohistoquímica o citológica, indicará que, a pesar de la presencia del receptor de estrógenos en las células tumorales, es poco probable que sea una diana apropiada para la intervención del antiestrógeno. Este enfoque proporcionará un marco racional para la comprensión de la eficacia terapéutica del antiestrógeno en los cánceres de mama, porque la mayoría de las pacientes de cáncer de mama son postmenopáusicas y no se esperará ningún impacto fisiológico del antiestrógeno. La identificación de los tumores que expresan ER activado de forma aberrante por el fondo biológico patológico proporcionará una justificación directa y plausible para el tratamiento.

Por lo tanto, los focos de ER en las células tumorales pueden servir como un biomarcador para la selección de un tratamiento apropiado, incluyendo la decisión de si emplear o no antiestrógenos en la terapia adyuvante. El reconocimiento de este biomarcador permite el desarrollo de un ensayo que pueda servir como un indicador de la probabilidad de que una paciente de cáncer de mama se beneficie de la terapia con antiestrógenos.

En una primera realización, el ensayo de diagnóstico es un método para la identificación de pacientes que tienen tumores que expresan ER activado (es decir, focos de ER activados o "AEF"). Estos pacientes tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con un antiestrógeno que los pacientes que no expresan ER activado (típicamente visto como una tinción nuclear difusa). La inactivación de los AEF por un antiestrógeno se puede producir por cualquiera de una diversidad de mecanismos, incluyendo la disociación de los focos y la inhibición de la activación de los focos sin alterar sustancialmente su estructura. Los pacientes que no expresan focos de ER activados (AEF) pueden incluir los que son negativos a los receptores de estrógeno mediante el ensayo convencional, o los que son positivos a los receptores de estrógenos positivos mediante el ensayo convencional. Se cree que cualquier tumor que muestre AEF es un candidato para el tratamiento con este tipo de antiestrógenos, incluyendo el cáncer de mama.

En una segunda realización, la invención se refiere a un método *in vitro* para identificar un tumor que se puede tratar

con un fármaco AEF-activo, que comprende:

- 5 a) exponer las células cancerosas o un espécimen de tejido que contiene células cancerosas obtenidas de un paciente a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas; y
b) detectar la presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos;

donde la presencia de unión focal indica la sensibilidad del tumor al tratamiento con el fármaco AEF-activo y la ausencia de unión focal indica la falta de sensibilidad del tumor al tratamiento con el fármaco AEF-activo.

10

Se desvela adicionalmente el tratamiento de un paciente positivo para la unión focal del anticuerpo con un antagonista del receptor de estrógeno. Sin embargo, se desvela adicionalmente un tratamiento de un paciente positivo para la unión focal del anticuerpo con un inhibidor de aromatasas.

- 15 En otra realización más, la unión focal del anticuerpo se detecta en ausencia de unión difusa del anticuerpo en los núcleos.

En otra realización más, la unión focal del anticuerpo se detecta además de la unión difusa del anticuerpo en los núcleos.

20

En otra realización más, las células cancerosas son células de cáncer de mama o el espécimen de tejido tumoral primario es un espécimen de cáncer de mama.

En otra realización más, la presencia o ausencia de unión focal se detecta por fluorescencia.

25

En otra realización más, la presencia o ausencia de unión focal se detecta en una reacción colorimétrica, tal como una reacción enzimática.

- 30 En otra realización más, el método comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia de unión focal de una manera cuantitativa o semi-cuantitativa.

Se desvela un método para tratar un tumor, que comprende:

- 35 a) exponer las células cancerosas o un espécimen tisular que contiene las células cancerosas obtenidas de un paciente a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas;
b) detectar la presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos; y
c) tratar al paciente con un antiestrógeno AEF-activo si está presente una unión focal.

- 40 En otra realización más, la invención se refiere al uso de un antiestrógeno AEF-activo para tratar un tumor, tras la identificación de la presencia de unión focal del anticuerpo antirreceptor de estrógeno a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas.

- 45 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la presencia de unión focal puede significar que el 1-100 %, 5-100 %, 25-100 % o el 50-100 % de los núcleos de las células cancerosas muestran unión focal.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, cuando la unión focal está presente, la intensidad o la densidad de tal unión focal puede cuantificarse.

- 50 En cualquiera de las realizaciones anteriores, el antiestrógeno AEF-activo puede ser un antagonista receptor o un inhibidor de aromatasas, o el tumor de interés puede ser cáncer de mama.

En otra realización más, la invención proporciona un método *in vitro* para analizar un fármaco antitumoral o candidato de fármaco antitumoral para determinar la actividad de inactivación de AEF que comprende:

55

- a) proporcionar células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas, donde las células cancerosas expresan un grado inicial de distribución focal de AEF y los AEF se tiñen de forma detectable con un anticuerpo receptor de estrógeno;
b) exponer las células cancerosas o el espécimen de tejido tumoral al fármaco antitumoral o el candidato de fármaco

antitumoral; y

- c) detectar un descenso en el grado de distribución focal de los AEF con respecto al valor inicial como una indicación de la actividad de inactivación de AEF del fármaco antitumoral o el candidato farmacológico, o no detectar ningún descenso sustancial en el grado de distribución focal de los AEF con respecto al valor inicial como una indicación de la falta de actividad de inactivación de AEF del fármaco antitumoral.

- En ciertas realizaciones de métodos para analizar un fármaco antitumoral o fármaco antitumoral candidato para determinar la actividad de inactivación de AEF, el nivel inicial de AEF puede expresarse como el porcentaje de células que muestran AEF o el número medio de AEF por célula. Un descenso en la tinción detectable de AEF tras la exposición al fármaco o el fármaco candidato se expresará entonces como un porcentaje reducido de células que expresan AEF o un número medio reducido de AEF por célula con respecto al valor inicial. Como alternativa, una reducción en el tamaño medio de los AEF puede usarse para indicar la actividad de inactivación de AEF del fármaco o fármaco candidato.
- 15 En otras realizaciones de los métodos para analizar un fármaco antitumoral o fármaco antitumoral candidato para determinar la actividad de inactivación de AEF, las células cancerosas pueden proporcionarse como una línea de células cancerosas que expresa un nivel inicial de AEF. Como alternativa, el espécimen de tejido tumoral puede ser un espécimen de tejido primario o un tejido obtenido de una biopsia.
- 20 En cualquiera de las realizaciones anteriores, el receptor de estrógenos detectado puede ser un ER α y el anticuerpo antirreceptor de estrógeno usado puede ser un anti-ER α .

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 25 La figura 1 ilustra los resultados del Ejemplo 5. La gráfica muestra la correlación del porcentaje de positividad de ER de biopsias de cáncer de mama usando métodos convencionales (eje y) con el estado de AEF usando los métodos de la invención (eje x).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 30 Como se usa en el presente documento, los términos "células cancerosas" y "células tumorales" son generalmente intercambiables y se refieren a células malignas que pueden estar presentes en un tumor sólido o que pueden estar circulando en la sangre. El tumor sólido puede ser un tumor primario o un tumor metastásico, y cualquier célula cancerosa circulante puede derivarse de cualquier tipo de tumor sólido. El análisis de tumores sólidos para los fines de la invención (es decir, el análisis histológico) puede realizarse usando una muestra de biopsia primaria. Como alternativa, las células cancerosas o tumorales para el análisis (es decir, el análisis citológico) se pueden obtener por aspiración con aguja fina de un tumor sólido, así como por la separación de la sangre.
- 40 Como se usa en el presente documento, las expresiones "tratar un tumor", "tratamiento de un tumor" y similares, se refieren a inhibir la replicación de las células tumorales, inhibir la propagación del tumor, reducir el tamaño del tumor, disminuir o reducir el número de células tumorales en el cuerpo, o mejorar o aliviar los síntomas de la enfermedad causada por el tumor. Los tumores incluyen cánceres. El tratamiento se considera terapéutico si hay un descenso de la mortalidad y/o la morbilidad, o hay una disminución de la carga de la enfermedad como se puede manifestar por un número reducido de células tumorales en el cuerpo o la disminución del tamaño del tumor.
- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de estrógeno" incluye el receptor de estrógenos dimerizado, el receptor ER α y el receptor ER β .
- 50 Como se usa en el presente documento, la expresión "antiestrógeno AEF-activo" y sus equivalentes se refieren a un fármaco antiestrógeno que muestra una capacidad para inactivar, disolver o disociar focos de ER activados (AEF) en los núcleos de las células, lo que indica que su mecanismo de acción es a través de la ruta de activación de ER de la célula. Estos términos pretenden incluir el receptor de estrógenos dimerizado, así como el receptor ER α y el receptor ER β .
- 55 Las expresiones "positivo a AEF", "positivos a focos de ER", "ER activado", "ER en un estado funcional" y similares, se refieren a la presencia de agregados del receptor de estrógeno en los núcleos de las células. Estas expresiones pretenden incluir el receptor de estrógenos dimerizado, así como el receptor ER α y el receptor ER β . Las expresiones incluyen ER patológicamente activado, es decir, ER que puede no activarse por los agonistas fisiológicos habituales, tales como estradiol o tamoxifeno. La identificación de AEF implica que la activación es a través de un mecanismo

anormal.

- La expresión "grado de distribución focal" se refiere al número relativo de células positivas a AEF frente a las células totales en una muestra. El grado de distribución focal puede determinarse cuantitativamente o cualitativamente. En un ejemplo, el grado de distribución focal se expresa como un porcentaje de células positivas a AEF, es decir, el porcentaje de células que contienen agregados del receptor de estrógenos (cuantitativo). En un ejemplo alternativo, el grado de distribución focal puede expresarse en expresiones relativas que describen el número de células que contienen agregados del receptor de estrógenos, tal como "pocos" o "muchos" (cualitativo).
- 10 Por ejemplo, el uso de un ligando colorimétrico, enzimático, o radiomarcado tal como un anticuerpo antirreceptor de estrógeno, se puede utilizar para unirse a los receptores de estrógeno en los núcleos celulares. El grado de distribución focal se puede determinar cuantitativamente, por ejemplo, determinando el número de células que tienen intensidad de color, fluorescencia o radiactividad emitida por el anticuerpo marcado que está asociado a AEF en lugar de un patrón de tinción difusa. El grado de distribución focal se puede comparar con una muestra de control que no contiene células positivas a AEF o que tiene un grado de distribución focal que se considera por debajo de un umbral inferior usando un microscopio de luz a un aumento apropiado o técnicas que incluyen, pero sin limitación, micromatriz de ADN, perfiles de proteínas, radiomarcado, u otros sustitutos para medir focos de ER.

La expresión "patrón difuso" se refiere a un patrón finamente granular que es indicativo de la ausencia de distribución focal.

El término "estrógeno" se refiere a una sustancia estrogénica natural o sintética que imita algunas o todas las acciones del estradiol, también se denomina como moduladores del de estrógeno (ERM) o moduladores selectivos del receptores de estrógeno (SERM).

El término "antiestrógeno" se refiere a una sustancia que inhibe la formación, transporte, o acción de, o que inactiva los agentes progestacionales, incluyendo, pero sin limitación, fulvestrant, tamoxifeno, toremifeno, e inhibidores de aromatasa, tales como letrozol, anastrozol, vorozol, exemestano, foremestano y atemestano. Un ERM o SERM puede tener algunas propiedades antiestrogénicas, y puede considerarse un antiestrógeno o un estrógeno dependiendo del contexto de uso.

Un "fármaco AEF-activo" es un fármaco que disocia los AEF o de otro modo reduce el número, tamaño o intensidad de la tinción de los AEF en los núcleos celulares. En un ejemplo, un fármaco AEF-activo causa la conversión de un patrón de tinción A o AD en un patrón de tinción D en la célula. Los fármacos AEF-activos incluyen antiestrógenos y antagonistas de los receptores de estrógeno, así como fármacos que presentan actividad contra AEF pero no actúan mediante un mecanismo anti-hormonal.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" se refiere a una proteína que es capaz de unirse específicamente a un antígeno e incluye cualquier sustancia, o grupo de sustancias, que tiene una afinidad de unión específica para el antígeno al que se dirige, con poca o ninguna afinidad de unión por otras sustancias. En general, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos derivados de seres humanos o animales, anticuerpos humanizados (por ejemplo, porciones sin unión derivadas de un ser humano, porciones de unión derivadas de un animal) y fragmentos de los mismos.

Los términos "anticuerpo anti-ER α " y "anticuerpo anti-ER β " se refieren a anticuerpos dirigidos a las isoformas alfa y beta del receptor de estrógeno, respectivamente. "Anticuerpo anti-ER" se refiere genéricamente a un anticuerpo capaz de unirse a ER. Los anticuerpos específicos adecuados para su uso de acuerdo con los aspectos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos monoclonales anti-ER CONFIRM SP1 de Ventana Medical Systems (Tucson, AZ) y los anticuerpos monoclonales anti-ER α y anti-ER β NOVOCASTRA disponibles en Leica Biosystems (Buffalo Grove, IL).

En un aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de un tumor susceptible a la inhibición del crecimiento por antiestrógenos mediante la determinación del grado de unión focal del anticuerpo anti-ER en los núcleos de células en una muestra de células o tejido obtenido de un paciente y que se sospecha que contiene células tumorales. Si el grado de distribución focal es mayor de aproximadamente el 5 %, por ejemplo de aproximadamente del 5 % al 100 %, el 25-100 % o el 50-100 %, un antiestrógeno o se administra al paciente para inhibir el crecimiento del tumor. Los antiestrógenos potencialmente útiles incluyen fulvestrant ((7R,8R,9S,13S,14S,17S)-13-metil-7-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentilsulfonil)nonil]-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahidrociclopenta[a]fenantren-3,17-diol), Tamoxifeno (2-[4-[(Z)-1,2-difenilbut-1-enil]fenoxi]-N,N-dimetiletanamina),

Toremifeno (2-[4-[(Z)-4-cloro-1,2-difenilbut-1-enil]fenoxi]-N,N-dimetiletanamina), inhibidores de aromatasa, tal como Letrozol (4-[(4-cianofenil)-(1,2,4-triazol-1-il)metil]benzonitrilo), Anastrozol (2-[3-(2-cianopropan-2-il)-5-(1,2,4-tiazol-1-ilmetil)fenil]-2-metilpropanonitrilo), Vorozol (6-[(4-clorofenil)-(1,2,4-triazol-1-il)metil]-1-metilbenzotiazol), Exemestano ((8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-dimetil-6-metiliden-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidrociclopenta[a]fenantren-3,17-diona),
 5 Foremestano ((8R,9S,10R,13S,14S)-4-hidroxi-10,13-dimetil-2,6,7,8,9,11,12,14,15,16-decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3,17-diona), y Atemestano ((8R,9S,10S,13S,14S)-1,10,13-trimetil-7,8,9,11,12,14,15,16-octahidro-6H-ciclopenta[a]fenantren-3,17-diona)), y combinaciones de los mismos.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para identificar un tumor tratable con un fármaco AEF-activo, que
 10 comprende:

- a) exponer las células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas obtenidas de un paciente a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas; y
- 15 b) detectar la presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos; donde la presencia de unión focal indica la sensibilidad del tumor al tratamiento con el fármaco AEF-activo y la ausencia de unión focal indica la falta de sensibilidad del tumor al tratamiento con el fármaco AEF-activo.

El ensayo anterior para la unión a ER focal proporciona una prueba más sensible y predictiva que los ensayos de ER
 20 convencionales usados actualmente, y la unión a ER focal puede identificarse en pacientes clasificados en ensayos de ER convencionales como negativos a ER, así como aquellos que son convencionalmente positivos a ER. Los pacientes clasificados en ensayos de ER convencionales como negativos a ER, así como aquellos que son convencionalmente positivos a ER pueden mostrar un resultado positivo para la unión nuclear de ER focal y, por lo tanto, pueden considerarse candidatos para el tratamiento con antiestrógenos. La ausencia de focos de ER en
 25 pacientes probados convencionalmente como positivos a ER explicará el resultado aparentemente anómalo de que los antiestrógenos son ineficaces en algunos de estos pacientes. Por lo tanto, el método de ensayo de la invención hace del tratamiento hormonal una elección eficaz para un mayor número de pacientes de cáncer.

Las células cancerosas analizadas en cualquiera de los ensayos para la unión focal pueden estar contenidas en una
 30 muestra de tejido tumoral tomada directamente de un paciente. Estas muestras se denominan típicamente como biopsias primarias, y se pueden derivar de tumores sólidos, ya sean primarios o metastásicos (un análisis histológico). Como alternativa, las células cancerosas analizadas en cualquiera de los ensayos para la unión focal pueden ser células cancerosas individuales o pequeños grupos de células cancerosas obtenidas, por ejemplo, por aspiración con aguja de un tumor o por separación de las células cancerosas de la sangre (un análisis citológico). El
 35 análisis citológico tiene varias ventajas, incluyendo ser menos invasivo para el paciente y proporcionar un análisis del compartimiento celular relevante sin interferencia de la arquitectura tisular circundante.

Se describen ciertos métodos inmunohistoquímicos adecuados para su uso en la invención por M. Nadji, y col. (Am. J. Clin. Pathol. (2005) 123: 21-27) y D. C. Allred (Modern Pathology (2010) 23: S52-S59). A modo de ejemplo, los
 40 especímenes de tejido de biopsia de tumor primario para el análisis se pueden preparar como secciones de parafina del tejido canceroso como se conoce en la técnica para ensayos de ER convencionales. Si se usan secciones de parafina, la parafina se funde primero calentando los portaobjetos, y se desparafinan con xileno. Los portaobjetos se rehidrataron entonces, en grados descendentes de etanol y se exponen a un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a ER α , ER β , o ambos. La unión del anticuerpo se detecta
 45 entonces utilizando uno cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para la detección de unión a anticuerpo. Dado que ER α es un biomarcador de uso común para el cáncer de mama, los anticuerpos que se unen específicamente a ER α pueden ser más apropiados para los métodos de la invención.

Ciertos métodos citológicos adecuados para su uso en la invención incluyen métodos inmunocitoquímicos aplicados
 50 a los materiales de aspiración con aguja fina, por ejemplo como se describe por N. H. Hafez, y col. (J. Egyptian Nat. Cancer Inst. (2010) 22: 217-225). Los portaobjetos de citología por aspiración pueden fijarse en alcohol (por ejemplo, alcohol isopropílico al 95 %, 10 min a 18 h) y se tiñen para visualizar el receptor de estrógenos. Los portaobjetos fijados pueden exponerse a un anticuerpo primario específico para el ER, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que se une a ER α , ER β , o ambos. La unión del anticuerpo puede detectarse utilizando uno cualquiera de los
 55 métodos conocidos en la técnica para la detección de la unión del anticuerpo.

Un método apropiado para la detección de unión de un anticuerpo a su diana es un ensayo colorimétrico, típicamente un ensayo colorimétrico enzimático. Uno de tales métodos emplea peroxidasa para producir un tinte de color visible bajo el microscopio óptico. La peroxidasa endógena en el espécimen de tejido se bloquea usando

peróxido de hidrógeno y la biotina endógena se bloquea usando un reactivo de bloqueo de la biotina antes de la incubación con el anticuerpo o anticuerpos. En un ejemplo, la unión del anticuerpo primario se sigue del anticuerpo secundario biotilado que se dirige al anticuerpo primario. La unión del anticuerpo secundario se detecta entonces usando avidina o estreptavidina conjugada con peroxidasa, típicamente peroxidasa de rábano picante (HRP). El 5 conjugado se añade para unir la enzima al complejo anticuerpo-diana. El ER se visualiza por la conversión enzimática del sustrato cromogénico 3,3'-diaminobencidina (DAB) en un tinte de color marrón en el sitio de localización de ER. Si el anticuerpo primario es un anticuerpo de ratón, se une posteriormente a una inmunoglobulina anti-ratón biotilada. El espécimen citológico o tisular puede contrastarse con verde rápido para aumentar la visibilidad de la mancha de peroxidasa.

10

Como alternativa, se puede utilizar un método de fluorescencia para detectar la unión del anticuerpo a ER- α , EAR- β o ambos. En este caso, un anticuerpo primario marcado de forma fluorescente se puede unir a la diana de ER y se detecta directamente bajo un microscopio de fluorescencia. Sin embargo, un método que emplea la unión de un anticuerpo primario no marcado al ER seguido de la unión de un anticuerpo secundario marcado por fluorescencia 15 (por ejemplo, inmunoglobulina anti-ratón) al anticuerpo primario puede reducir la fluorescencia no específica. Cualquier marcador fluorescente conocido para su uso en ensayos inmunocitológicos o inmunohistoquímicos se puede utilizar en los métodos de la invención, por ejemplo FITC.

Ambos anticuerpos monoclonales y policlonales pueden ser útiles en los presentes métodos. Una lista no exhaustiva 20 de anticuerpos monoclonales adecuados está disponible en el mercado en Santa Cruz Biotechnology, Inc., que incluye tanto anticuerpos anti-ER α como anti- β (http://www.scbt.com/table-estrogen_receptor.html)

La unión del anticuerpo a ER se detecta típicamente por la observación del portaobjetos teñido con un microscopio óptico o un microscopio de fluorescencia según sea apropiado. La ampliación es típicamente de aproximadamente 25 40X o 50X; sin embargo, para mejorar la sensibilidad para la detección de AEF puede ser deseable para evaluar los portaobjetos a aproximadamente 80X o 100X para facilitar el estudio de las estructuras subnucleares. La ampliación se puede ajustar según sea necesario, como se conoce en la técnica, para identificar más claramente los diversos fenotipos de ER descritos en el presente documento.

Las muestras que son aparentemente negativas por microscopía pueden evaluarse por citometría de flujo para detectar la positividad que está por debajo del umbral de microscopía de luz o de fluorescencia. Si la citometría de flujo indica células positivas raras, puede usarse alta microscopía de aumento (100X-400X, 400X o 900X, por ejemplo, 800X) para estudiar las estructuras subnucleares e identificar los AEF. Sin embargo, si las células positivas detectadas por citometría de flujo son demasiado raras para ser detectadas de forma fiable por microscopía para el 35 análisis de AEF, puede usarse un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) para separar las células positivas de las células en suspensión en base a su fluorescencia. Según se concentran las células positivas, pero sin dañar por este proceso, se aumenta sustancialmente la fiabilidad y la probabilidad de visualizar con éxito los AEF en la evaluación microscópica posterior.

La presencia o ausencia de AEF en los núcleos de células tumorales individuales puede detectarse visualmente bajo un microscopio óptico o de fluorescencia, o por cualquier otro medio adecuado, tal como fluorescencia o mediciones colorimétricas. Típicamente, se usarán medios visuales para la detección. Los resultados de la tinción se pueden cuantificar simplemente observando la presencia o ausencia de AEF, o contando el número o porcentaje de células positivas. Como alternativa, las características específicas de la tinción se pueden cuantificar. Por ejemplo, la 45 detección puede incluir la notación de si la unión focal en forma de AEF está acompañada o no por tinción nuclear difusa, cuantificación de células positivas en número o porcentaje, y/o cuantificación de la intensidad o el número/densidad de AEF. Tamaño relativo de AEF también se puede utilizar para caracterizar, clasificar y cuantificar. La cuantificación de la densidad de AEF puede determinarse como el número medio de focos/célula, o usando una escala arbitraria (por ejemplo, "poca", "moderada" o "mucho"). De forma similar la intensidad puede 50 determinarse usando una escala arbitraria, por ejemplo, baja/media/alta o una escala numérica, tal como 1-5. Típicamente, los resultados del análisis del tejido tumoral del paciente se compararán con controles positivos y/o negativos.

Un espécimen de tejido citológico o tumoral se juzga como positivo a AEF cuando el grado de distribución focal es del 1-100 %, 5-100 %, 25-100 % o 50-100 % de las células en el espécimen que muestran AEF. Dado que la 55 eficacia terapéutica de un fármaco AEF-activo o antiestrógeno también puede estar correlacionada con la intensidad de la tinción de AEF o con el número, el tamaño o la densidad de AEF, estos parámetros también se pueden usar para determinar la sensibilidad del tumor al tratamiento con el fármaco AEF-activo o antiestrógeno. En general, se prevé que la sensibilidad del tumor al tratamiento con fármacos AEF-activos o antiestrógenos aumentará con el

grado de distribución focal (por ejemplo, aumento del número o porcentaje de células positivas, el aumento de intensidad de AEF y/o aumento del número o tamaño de AEF) en las células del espécimen de tejido citológico o tumoral.

5 Los métodos anteriores para la determinación de la sensibilidad de un tumor a fármacos AEF-activos o antiestrógenos pueden ser manuales (por ejemplo, detección visual usando un microscopio de fluorescencia) o pueden automatizados o semi-automatizados usando métodos para la exploración rápida, detección y cuantificación de muestras citológicas o tisulares marcadas colorimétricamente o por fluorescencia. Por ejemplo, un sistema de exploración y análisis totalmente automatizado puede desarrollarse y usarse en la presente invención. A diferencia
 10 del sistema de inmunohistoquímica cuantitativa (IHC) de ER/PR InScape®, que requiere la selección manual de regiones específicas a analizar, el presente sistema de escaneo y análisis de AEF en los núcleos celulares se diseñarán para proporcionar la exploración automatizada de todo el espécimen y el análisis del espécimen teñido de inmunohistoquímica específico de antígeno. El reconocimiento de imágenes creará una imagen digital de toda la sección de tejido teñida. Un algoritmo informático específico del antígeno analizará después los resultados de la
 15 imagen digital que representa todo el espécimen. Para su uso en los métodos de la invención, el software distinguirá focos de tinción de fondo difusa en el núcleo, y medirá la intensidad de la fluorescencia y el tamaño de los focos en una base célula por celda o grupo por grupo, repitiendo el proceso para cada célula o grupo sobre todo el espécimen. Estos métodos automatizados darán como resultado una mejor precisión mediante la realización de una función que no es posible de forma manual, con un coste reducido. La completa automatización también hará la
 20 prueba accesible para los centros médicos no expertos.

Los presentes métodos para determinar la sensibilidad de un tumor a los fármacos AEF-activos o antiestrógenos permiten a los médicos identificar un subconjunto de pacientes con tumores que son más susceptibles de beneficiarse de dicho tratamiento. Es decir, mediante la clasificación en primer lugar del tumor como positivo a AEF
 25 o negativo a AEF en el método de diagnóstico, el médico es capaz de seleccionar el tratamiento más adecuado para el paciente. Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación también proporciona un método para tratar un tumor en un paciente, que comprende:

- a) exponer las células cancerosas o un espécimen de tejido que contiene células cancerosas obtenidas del paciente
 30 a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas;
- b) detectar presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos; y
- c) tratar al paciente con un fármaco AEF-activo si está presente una unión focal.

35 Los detalles de la detección del grado de distribución focal (incluyendo la presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno) en los núcleos de las células se han analizado anteriormente. La decisión de si tratar o no al paciente en base a los resultados del ensayo de diagnóstico se basará en el número/porcentaje, intensidad, tamaño y/o densidad de AEF cuando están presentes. Puede tomarse la decisión de tratar al paciente con un fármaco AEF-activo o antiestrógeno cuando el grado de distribución focal en el ensayo de diagnóstico es del
 40 1-100 %, 5-100 %, 25-100 % o el 50-100 % de núcleos de las células cancerosas. En general, se prevé que la eficacia del tratamiento con un fármaco AEF-activo o antiestrógeno aumentará con el aumento del número o porcentaje de células positivas, el aumento de la intensidad de AEF y/o el aumento del número o el tamaño de los AEF en las células del espécimen de tejido de tumor o muestra de células cancerosas. E base a estos parámetros, el médico también puede determinar la dosificación, el momento y la duración del tratamiento. Por consiguiente, en
 45 otra realización, la invención se refiere al uso de un antiestrógeno AEF-activo para el tratamiento de un tumor positivo a AEF.

El tumor a identificar o tratar de acuerdo con los métodos anteriores puede incluir cualquier tumor canceroso o no canceroso en el que se producen los AEF, y en el que la presencia de AEF puede determinarse. El tejido tumoral o
 50 las células cancerosas para el análisis o el tratamiento se pueden seleccionar del grupo que consiste en tejido o células de mama, próstata, ovario, endometrio, pulmón y de útero. Dichos cánceres incluyen en particular cáncer de mama.

El fármaco AEF-activo o antiestrógeno de los métodos de tratamiento anteriores pueden ser cualquier fármaco que
 55 tenga la capacidad de inactivar AEF (por ejemplo, disolviendo o disociando los agregados). Tales fármacos incluyen antagonistas de ER y/o inhibidores de aromatasa, pero también se incluyen para su uso otros con la capacidad de inactivar AEF como el mecanismo de acción. En ciertos aspectos, el antiestrógeno se selecciona del grupo que consiste de fulvestrant, tamoxifeno, toremifeno, o inhibidores de aromatasa, tales como letrozol, anastrozol, vorozol, exemestano, foremestano, y atemestano, y combinaciones de los mismos.

- Aún en otro aspecto, el fármaco AEF-activo o antiestrógeno se administra a un paciente que tiene un tumor positivo a AEF en una cantidad de 10 a aproximadamente 200 mg por día dependiendo de la potencia, la biodisponibilidad, y el perfil de seguridad del antiestrógeno seleccionado o combinación de antiestrógenos. Sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que mediante la identificación de pacientes con tumores que son más susceptibles al tratamiento con antiestrógenos, puede usarse una dosis más baja del antiestrógeno se puede usar, dando como resultado un menor riesgo de efectos secundarios tóxicos. Por lo tanto, un intervalo de dosificación inferior de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg se puede utilizar para pacientes que muestran más del 5 % de unión focal de AEF. En un aspecto, la clasificación altamente positiva a AEF de ER en un tumor puede dar como resultado un régimen de dosificación diferente a la clasificación como las células de tinción tanto positiva como difusamente de AEF, debido a un mayor grado de activación en el tumor altamente positivo a AEF. Por el contrario, no se garantiza un patrón de tinción predominantemente difuso (que indica ER no activado) indicará que el tratamiento con un fármaco AEF-activo o antiestrógeno.
- 15 En otro aspecto más, la invención proporciona métodos para el cribado de fármacos antitumorales y fármacos antitumorales candidatos para determinar la capacidad de inactivar AEF. Estos métodos son útiles para identificar fármacos AEF-activos adicionales, incluyendo antiestrógenos, que pueden ser candidatos para su uso en el tratamiento de tumores positivos a AEF de acuerdo con los métodos de la invención. Por consiguiente, el método para seleccionar un fármaco antitumoral o fármaco antitumoral candidato para la actividad de inactivación de AEF comprende:
- 20
- a) proporcionar células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas, donde las células cancerosas expresan un grado inicial de distribución focal de AEF y los AEF se tiñen de forma detectable con un anticuerpo receptor de estrógeno;
 - 25 b) exponer las células o el espécimen de tejido tumoral al fármaco antitumoral o candidato de fármaco antitumoral; y
 - c) detectar un aumento en el grado de distribución focal de los AEF con respecto al grado de distribución focal inicial de los AEF como una indicación de la actividad de inactivación de AEF del fármaco antitumoral o el fármaco candidato, o no detectar ningún descenso sustancial en el grado de distribución focal de los AEF con respecto al grado de distribución focal inicial de los AEF como una indicación de la falta de la actividad de inactivación de AEF
 - 30 del fármaco antitumoral o el fármaco candidato.

En una realización alternativa del método de selección anterior, pueden usarse con fines de comparación dos especímenes de tejido de tumor que expresan AEF o dos muestras de células cancerosas de expresión de AEF del mismo tumor. En esta realización, ambos especímenes de tejido tumoral o muestras de células cancerosas se tiñen de forma detectable para determinar los AEF con un anticuerpo antirreceptor de estrógeno, después, uno de los especímenes o muestras se expone al fármaco antitumoral o el fármaco antitumoral candidato y el otro no. Si la tinción de los AEF en el espécimen o muestra tratada se disminuye en comparación con el espécimen o muestra sin tratar, el fármaco antitumoral o el fármaco antitumoral candidato, el fármaco candidato fármaco antitumoral o antitumoral tiene actividad de inactivación de AEF. Por el contrario, si la tinción de los AEF en el espécimen o muestra tratada no se disminuye en comparación con el espécimen o muestra sin tratar, el fármaco antitumoral o fármaco antitumoral candidato, el fármaco antitumoral o fármaco antitumoral candidato no tiene actividad de inactivación de AEF. El método de selección anterior proporcionará más comprensión del mecanismo de acción de antiestrógenos conocidos y antiestrógenos aún por descubrir. Los que son AEF-activos (es decir, tienen actividad de inactivación de AEF) probablemente serán útiles en el tratamiento de tumores en poblaciones de pacientes identificadas como de tumores positivos a AEF utilizando los métodos de la invención. Los ejemplos de antiestrógenos que pueden seleccionarse como AEF-activos incluyen cualquiera de los antiestrógenos aprobados para su uso por las autoridades reguladoras y cualquiera de los antiestrógenos no aprobados en el desarrollo.

Si un fármaco antitumoral es negativo para la actividad de AEF en el método de selección que se ha descrito anteriormente, la falta de capacidad para inactivar AEF se puede interpretar como una indicación de que el fármaco antitumoral puede ser eficaz en terapia de combinación con un antiestrógeno AEF-activo debido a la complementariedad de los diferentes mecanismos de acción. Por ejemplo, puede usarse un antiestrógeno AEF-activo en combinación con el tratamiento hormonal adicional que no actúa mediante un mecanismo de inactivación de AEF (por ejemplo, anti-progestinas) para lograr una mejor eficacia terapéutica en comparación con cualquier agente en solitario. Como alternativa, puede usarse un antiestrógeno AEF-activo en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos convencionales que son negativos para la actividad AEF en el ensayo de selección para lograr una mejor eficacia terapéutica en comparación con cualquier agente en solitario (por ejemplo, everolimus, trastuzumab, TM1-D, fármacos anti-HER2, bevacizumab, o quimioterapia con agentes tales como paclitaxel, docetaxel, taxanos, doxorrubicina, doxorrubicina liposomal, doxorrubicina liposomal pegilada, antraciclina,

antracendionas, carboplatino, cisplatino, 5-FU, gemcitabina y ciclofosfamida). Por ejemplo, everolimus es un inhibidor de mTOR que está indicado en combinación con un inhibidor de aromatasa y puede, en el futuro, indicarse basado en ERF.

- 5 En otro aspecto más, la detección de la presencia de distribución focal del anticuerpo a los AEF en los núcleos se puede usar como una indicación de que el tumor de un paciente previamente tratado con un fármaco antitumoral, que se ha vuelto resistente a ese medicamento, sigue siendo sensible a un antiestrógeno de inactivación de AEF. En un aspecto, el método se puede adaptar para determinar si la quimiorresistencia de un tumor resultante de la quimioterapia anterior puede invertirse por tratamiento con un antiestrógeno de inactivación de AEF. La inversión de tal quimiorresistencia puede basarse en los diferentes mecanismos de acción de la quimioterapia anterior y el antiestrógeno de inactivación de AEF.

Ejemplo 1

- 15 Se seleccionaron especímenes tumorales de pacientes con cáncer de mama (carcinoma ductal invasivo) y cáncer de endometrio de los archivos de Oscar Lambret Cancer Center (Lille, Francia), departamento anatomopatológico. Los pacientes habían dado el consentimiento para el uso de sus tejidos con fines de investigación. Se obtuvieron muestras de tejidos de tumor de mama o endometrio que se habían fijado en fijador de formalina al 4 % y se habían incluido en parafina.

- 20 La inmunohistoquímica (IHC) se realizó en secciones de 3-4 µm de los tejidos de tumor de mama o de endometrio de archivo. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron y se lavaron en tampón de trabajo (0,05 mol/l de Tris/HCl, 0,15 mol/l de NaCl, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,6, Dako, Dinamarca, código S3006). La recuperación del antígeno se realizó con la solución de recuperación de diana Dako (tampón de citrato modificado, pH 6,1, Dako, Dinamarca, código S1699) en un baño de agua a 98 °C durante 20 min. Después, las secciones se cubrieron con la solución de bloqueo de peroxidasa Dako para bloquear peróxidos endógenos a temperatura ambiente (TA) durante 5 min (Kit +/HRP de ratón (DAB+) Dako EnVision®, Dako, Dinamarca, código K4007), se lavó y se incubó con los anticuerpos primarios a las diluciones óptimas adecuadas a TA durante 60 min en una cámara humidificada (Tabla 1). Tras un lavado de 5 min con tampón de trabajo, el polímero etiquetado Dako (kit +/HRP de ratón (DAB+) Dako EnVision®, Dako, Dinamarca, código K4007) se usó para la detección de la unión del anticuerpo primario a TA durante 30 min. Después, se usó cromógeno (DAB) con un lote de sustrato a temperatura ambiente durante 5-10 min y las secciones se contrastaron ligeramente con hematoxilina de Gill.

- 35 Los controles negativos se obtuvieron por sustitución de los anticuerpos primarios con IgG1 de ratón de control de isotipo (Tabla 1) o con diluyente de anticuerpo en solitario (control negativo de tampón de lavado) en el procedimiento de tinción inmunohistoquímica.

Tabla 1. Anticuerpos usados para la inmunohistoquímica

Anti-ERα	Ratón Monoclonal	IgG1	Clon 6F11	AbD serotecMCA1799(1 ml)
	Recomendaciones: desenmascaramiento: tampón de citrato Dilución: 1/40 a 1/80			Lote 270412 Exp. NP Conc. entre 10 y 50 mg/
http://www.abdserotec.com/product/6f11-antiestrogen-receptor-alpha-antibody-mca1799.html				
Anti-ER	Conejo monoclonal	IgG	Clon SP1	Thermo ScientificMA1-39540(1 ml)
	Recomendaciones: Desenmascaramiento: Tampón citrato, ebullición durante 10 min , enfriamiento durante 20 min Dilución: 1/200, 30 minutos a temperatura ambiente			Lote 1574651 Exp. NC Conc. NC
http://www.pierce-antibodies.com/Estrogen-Receptor-antibody-clone-SP1-Monoclonal-MA139540.html				

- 40 El análisis de inmunohistoquímica se realizó con un microscopio Zeiss Axioscope, equipado con una cámara digital Imaging Model ROHS. Las señales inmunorreactivas se clasificaron como etiquetado marrón inequívoco de núcleos de células tumorales. La intensidad de marcado se definió como 0 para el negativo, + para el débil, ++ para moderado y +++ para fuerte.

45 Ejemplo 2

Las muestras de cáncer de mama se analizaron con dos anticuerpos diferentes. Se procesaron 15 muestras para el análisis de inmunohistoquímica (IHC) adicional.

- 5 La inmunohistoquímica se realizó con un microscopio de fluorescencia Zeiss equipado con una cámara CCD y el software Smart Capture, específica para la captura de imágenes fluorescentes. La IHC se realizó en secciones de 3-4 µm de los tejidos tumorales de mama de archivo. Las secciones se desparafinaron, se hidrataron y se lavaron en tampón de trabajo (0,05 mol/l de Tris/HCl, 0,15 mol/l de NaCl, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,6, Dako, Dinamarca, código S3006). La recuperación del antígeno se realizó con la solución de recuperación de diana Dako (tampón de citrato modificado, pH 6,1, Dako, Dinamarca, código S1699) en un baño de agua a 98 °C durante 20 min. Después, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios a las diluciones óptimas adecuadas a TA durante 60 min en una cámara humidificada negra (Tabla 2). Después de un lavado de 5 minutos con tampón de trabajo, se utilizó el anticuerpo secundario apropiado conjugado con Alexa Fluor 488 para la detección de la unión del anticuerpo primario a TA durante 30 min (IgG anti-ratón (H+L), F(ab')₂, Señalización celular, Estados Unidos, código 4408S, dilución 1: 1000; IgG anti-conejo (H+L), F(ab')₂, Señalización celular, Estados Unidos, código 4412S, dilución 1:1000). Después, se lavaron todos los portaobjetos y las cubiertas se cerraron usando Vectashield® Hardset Mounting Medium (Vector Labs, Estados Unidos, código H-1400) y se almacenaron en refrigeración en la oscuridad hasta su análisis, para conservar la fluorescencia. Los controles negativos se obtuvieron por la sustitución de los anticuerpos primarios con IgG1 de ratón de control de isotipo o suero de conejo (véase la tabla IHC) o con diluyente de anticuerpo en solitario (control negativo de tampón de lavado) en el procedimiento de tinción de inmunohistoquímica.

Posteriormente, se analizó una muestra mayor en IHC con el anticuerpo anti-ER alfa.

- 25 Se procesaron 70 cánceres de mama y 20 muestras de cáncer de endometrio. Para cada muestra de tumor etiquetada, se definió la distribución focal positiva como el porcentaje de células tumorales etiquetadas en todo el tejido tumoral, excluyendo las áreas necróticas.

Se observaron dos patrones de tinción básicos tras la tinción de muestras de tejidos con anticuerpos anti-ER usando IHC. El primer patrón era un patrón de color marrón, finamente granular y difuso denominado en el presente documento como "D". El segundo patrón era un patrón moteado aglomerado que representa un patrón de unión focal positiva denominado en el presente documento como "A". Se observaron los mismos dos patrones básicos en las muestras procesadas con IHC. Tanto el patrón difuso D como el patrón de unión focal moteado y aglomerado A observados con IHC eran similares al resultado de IHC. Los patrones difuso D y de unión focal A eran similares a los resultados obtenidos en las células modificadas genéticamente que expresan un receptor fluorescente cuando no está presente ningún esteroide o ningún agonista de esteroide. (Arnett-Manfield y col., 2004, 1C Control, 1D y 1E) y en el tejido endometrial humano normal y en cáncer de endometrio (Arnett-Manfield y col., 2004, 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F).

- 40 El patrón activo A observado en tejido de tumor incluido en parafina fijado en formalina puede diferir de las imágenes obtenidas en las células frescas. Esto se espera porque el tejido de fijación en formalina y de inclusión en parafina dará como resultado cambios en el contenido celular, dando como resultado así un patrón diferente de ER. Otra diferencia con respecto a las publicaciones de investigación que utilizaron IHC, se refiere al método. En el marco de la investigación, un microscopio confocal (es decir, que usa dos rayos láser) proporciona imágenes de alta resolución y tridimensionales. El patrón de IHC resultante de una reacción química que modifica el contenido celular. A diferencia de la IHC, se usa un microscopio de campo amplio tradicional para la lectura de las rodajas de tumor estándar (por ejemplo, 4 micrómetros). La técnica de IHC descrita da como resultado cierta pérdida de resolución.

La técnica de IHC es químicamente menos agresiva para los tejidos tumorales, ya que no altera la arquitectura celular microscópica. La IHC requiere un equipo especializado, un patólogo experimentado con la técnica, y tarda mucho más tiempo. La IHC no puede acoplarse fácilmente con otros análisis patológicos tal como una histología estándar que requiere tejidos embebidos en parafina fijados con formalina. Por lo tanto, en un aspecto, la IHC se puede usar como un procedimiento de laboratorio patológico de rutina. En la técnica de IHC desarrollada usada en el presente documento, secciones de tejido de 4 micrómetros (un espesor usado comúnmente para el análisis clínico de rutina) para todos los análisis.

Por lo tanto, se encontraron dos patrones básicos: una tinción nuclear de ER difusa "D" indica una ausencia de ER activados, y la tinción heterogénea "A", donde los agregados, que indican AEF, se pueden reconocer en el núcleo de las células. Los focos de ER son visiblemente más grandes que los elementos de un patrón difuso D, que son

sustancialmente más pequeños.

Ejemplo 3

5 En total, se han identificado tres categorías o fenotipos de la tinción de ER que se observan a mayor aumento (por ejemplo, 80X). Por el contrario, el aumento estándar (200-400X) se utiliza para la determinación del estado de ER en una IHC convencional.

Las categorías (observadas a alto aumento) son:

10

D: Tinción difusa, sin focos de ER (es decir, AEF)

AD: Área que contiene tanto células A como D, o que tiene una distribución heterogénea de focos de ER (AEF) con tamaños menores que los observados en el fenotipo A

A Focos grandes (AEF) distribuidos de una manera heterogénea.

15

Se evaluó esta clasificación (D, AD, y A) en 90 casos (70 cáncer de mama y 20 muestras de tejido de cáncer de endometrio).

Se analizaron muestras de cáncer de mama (61 casos) para la expresión de ER usando técnicas convencionales.

20

De los 70 casos totales de cáncer de mama, siete eran negativos a ER para todos los anticuerpos, y dos tenían datos que faltaban. La Tabla 2 y la Tabla 3 muestran los resultados del ensayo convencional para el ER en células de cáncer de mama y de cáncer de endometrio, seguido del perfil de AEF respectivo:

Tabla 2

Células tumorales de cáncer de mama positivas para el anticuerpo indicado				
En Porcentajes	Número de casos	Media	Mín.	Máx.
Anti-ER	61	51%	5 %	100 %
Distribución Focal (Cáncer de Mama)				
D: 34/61 (56 %)				
AD: 24/61 (39 %)				
A: 3/61 (5 %)				

25

Tabla 3

Células de cáncer endometrial positivas para el anticuerpo indicado				
25 casos (14 casos negativos para el anticuerpo ER)				
En Porcentajes	Número de casos positivos a ER	Media	Mín.	Máx.
Anti-ER	11	36 %	5 %	15 %
Distribución Focal (Cáncer endometrial)				
Tipo D: 4/11				
Tipo AD: 7/11				

La sección siguiente describe las frecuencias de los patrones A, AD, D y N (negativo, sin tinción de ER) en las muestras tumorales evaluadas previamente para determinar la positividad de ER usando métodos convencionales.

30

Todos los casos fueron analizados a gran aumento (100X). Algunos casos de cáncer de mama no fueron evaluables. Los métodos convencionales de IHC para determinar el ER no pueden proporcionar información sobre el patrón de tinción, ya que sólo indican la presencia o ausencia de los receptores de hormonas. La expresión de los patrones de ER activados (por ejemplo, A y AD) es heterogénea en los tumores y en diferentes muestras, que es una característica de los cánceres. Por el contrario, el fenotipo D es homogéneo, un patrón consistente con la falta

35

de la función biológica de ER.

Ejemplo 4

La tasa de positividad a ER para 61 cánceres de mama usando métodos convencionales para el análisis fue del 51 % con una desviación estándar del 31 %. Estos tumores se considerarán positivos a ER y el tratamiento con antiestrógeno será considerado para ser indicado. La positividad a ER también se puntuó utilizando una escala de 1 = débil a 3 = fuerte, para medir la calidad de la tinción. Sin embargo, se descubrió que el grado de tinción no estaba relacionado con el estado de ER activado como se muestra en la siguiente tabla:

40

Tabla 4

Puntuación de ER	AER			
	D	AD	A	Total
1	8	11	1	20
2	17	11	1	29
3	9	2	1	12
Total	34	24	3	61

Ejemplo 5

- 5 La gráfica de la figura 1 muestra el porcentaje de muestras de cáncer de mama positivas a ER por métodos convencionales (porcentaje de células tumorales que expresan ER, eje y) en comparación con los tres patrones de unión (A, AD, y D) para los mismos cánceres determinados por métodos de acuerdo con la invención (eje x). El tumor se considera positivo a ER si más del 1 % de las células son positivas. Normalmente, sin embargo, los médicos utilizan el 10 % de células positivas como el límite para la decisión de administrar un tratamiento antiestrógeno. Como se muestra en la figura 1, los tumores que tienen un estado de ER activado (AEF - A o AD) y los tumores que tienen un estado de ER no activado (D) tienen ambos una tasa de positividad a ER similar, según se determina por métodos convencionales, lo que indica que la positividad de ER convencional no predice el estado de AEF de la célula tumoral. Es decir, el valor de la mediana para los tres fenotipos basados en AEF se correlaciona con aproximadamente el 60 % de positividad a ER por métodos convencionales. Estos resultados apoyan la conclusión de que un estado positivo a ER determinado por métodos convencionales no se correlaciona con la presencia de la AEF.

Ejemplo 6

- 20 La Tabla 5 muestra el porcentaje de células tumorales positivas a ER en biopsias de cáncer de mama con el tipo AEF: A, AD o D. La figura 1 muestra el porcentaje de positividad para cada tipo de AEF. Se muestra que el tipo A, D, o AD no está asociado con la tasa de ER convencional. Por lo tanto, los AEF no se predicen por la tasa de tinción de ER estándar.

25

Tabla 5 Porcentaje de células que expresan un patrón de AEF

Porcentaje de células positivas a ER	Tipo AEF
5	AD
5	D
20	D
60	AD
60	D
70	D
100	D
100	AD
90	AD
5	AD
20	AD
5	D
5	D
80	AD
60	AD
40	AD
20	D
80	AD
70	D
70	D
90	AD
70	D
70	D
60	AD
90	D

5	D
5	D
70	D
5	D
50	D
60	D
70	AD
80	D
40	D
70	D
60	A
40	D
60	A
80	A
30	AD
5	AD
80	D
5	AD
80	D
30	D
40	D
30	AD
80	D
90	D
90	AD
30	D
5	AD
5	D
60	D
30	AD
90	D
5	D
50	D
90	AD
	AD
30	AD
	AD
5	D

Para los cánceres endometriales, once casos fueron positivos para ER usando técnicas convencionales. El porcentaje medio de células tumorales positivas a ER fue del 0,6 %, con un mínimo del 0,05 % y un máximo del 0,15 %. Cuatro de estos tumores mostraron un patrón D tras la tinción para AEF, y siete exhiben el patrón de tinción A o AD. Los cuatro cánceres con el fenotipo D tenían menos del 10 % de células positivas a ER. Los cánceres del fenotipo A tenían hasta el 15 % de células positivas con el anticuerpo utilizado. AEF está presente en una minoría de los casos. El uso de antiestrógenos en el cáncer de endometrio se ve obstaculizado con datos inconsistentes. Es probable que la identificación del subconjunto correcto de los pacientes dé resultados más fiables e interpretables y ayude a identificar a los pacientes adecuados que se beneficiarán de una hormoterapia específica. Los pacientes con receptores y AEF podrían beneficiarse de los agentes que alteran los AEF, aquellos con ER inactivado pero presente podrían beneficiarse de otros agentes endocrinos.

Ejemplo 7

15 Las líneas de células tumorales se cultivan en monocapas, con un medio de cultivo adaptado para cada línea, después de la amplificación durante 3 días. Cada línea celular se cultiva en cualquiera de FBS normal o FBS dividido con carbón vegetal. Cada condición del suero se expone a los factores de crecimiento o las hormonas: Vehículo, RPMI, Oestradiol 10 nM Progesterona 30 ng/ml (es decir, 100 nM), EGF 10 ng/ml o FGF 2,5 ng/ml. Cada ajuste experimental se complementa con Vehículo (DMSO), y una sustancia de ensayo antiestrógeno 100 nM o 1

µM. La viabilidad celular se evalúa con exclusión de azul de tripano.

Se ensayan las siguientes líneas celulares:

Línea celular	Tipo	Especie	Origen
BT-474	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
CAMA-1	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
EVSA-T	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
HCC-1954	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
MCF-7	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
MDA-MB-231	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
T-47D	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
ZR-75-1	Tumor mamario	Ser humano	ATCC ^a
Ishikawa	Cáncer endometrial uterino	Ser humano	ATCC ^a
HEC-1-A	Cáncer endometrial uterino	Ser humano	ATCC ^a

5 Para los citobloques, WB y ensayos citotóxicos, las células se incubaron en matraces de 75 cm², matraces de 25 cm² y placas de 6 pocillos, respectivamente, y se trataron con hormonas y sustancia de ensayo antiestrógenos en T = 0 horas y se trataron de nuevo de forma similar en T = 4 días. Para los citobloques y WB, las células se recogen en T = 6 horas, T = 4 días y T = 7 días. Para ensayos citotóxicos, las células se observan en T = 7 días. El experimento se realiza dos veces con condiciones duplicadas en cada experimento.

10

La actividad citotóxica *in vitro* de la sustancia de ensayo se revela mediante un ensayo MTS. Para cada afección de tratamiento, la relación entre el factor de crecimiento o afecciones tratadas únicamente con hormonas y control (RPMI) se calcula para mostrar el efecto de la hormona sobre el crecimiento. La relación de sustancia de ensayo antiestrógeno + factor de crecimiento sobre el factor de crecimiento (o Control) se calcula para estimar un efecto

15 antiestrógeno de la afección de referencia.

Los citobloques de células incluidas en parafina fijadas con formalina se producen en el momento = 6 horas, 4 días y 7 días. Los bloques de prueba se evalúan con hematina-Eosina Azafrán e IHC para los receptores PR. Si la coloración es demasiado intensa para el análisis nuclear, pueden realizarse portaobjetos HES separados e

20 inmunoquímica de ER sin fondo.

La IHC se realiza en 3-4 µm. Las secciones se desparafinan, se hidratan y se lavan en tampón de trabajo. La recuperación de antígenos se realiza. Después, las secciones se cubren con la solución de bloqueo de Peroxidasa Dako para bloquear peróxidos endógenos a temperatura ambiente (TA) durante 5 min, se lavan y se incuban con los

25 anticuerpos primarios a las diluciones óptimas adecuadas a TA durante 60 min en una cámara humidificada. Tras un lavado de 5 min con tampón de trabajo, el polímero etiquetado Dako se utiliza para la detección de la unión del anticuerpo primario a TA durante 30 min. Después, se realiza el cromógeno (DAB) con lote de sustrato a TA durante 5-10 min y las secciones se contrastan ligeramente con hematoxilina de Gill n.º 2. Los controles negativos se obtienen por sustitución de los anticuerpos primarios con IgG1 de de ratón de control de isotipo (Tabla 1) o con

30 diluyente de anticuerpo en solitario (control negativo de tampón de lavado) en el procedimiento de tinción inmunohistoquímica. El análisis inmunohistoquímico se realiza utilizando un microscopio Zeiss Axioscope, equipado con una cámara digital o un escáner.

Las señales inmunorreactivas se analizan con un aumento de x40 y se clasifican como un etiquetado marrón

35 inequívoco de núcleos de las células de tumor. La intensidad del etiquetado se define como 0 para el negativo, + para débil, ++ para moderado y +++ para fuerte. Se calcula el porcentaje de células positivas a tumorales.

La IHC se realiza para ER-α, ER-β y ER. Posteriormente, la morfología subnuclear se analiza en un aumento x 100 usando un microscopio y las fotos se escanean a alta resolución con XY (ref). Como se ha descrito previamente, se

40 describe la morfología subnuclear como difusa cuando se observa una tinción difusa o A cuando se observa un patrón moteado. La muestra se determina como AD cuando se mezclan las células de los tipos D o A.

Se ha descubierto que cuando las células expresan el patrón de tinción D no hay sensibilidad a la sustancia de ensayo antiestrógeno, incluso si las células son positivas a ER por métodos convencionales. Todas las células que

45 son sensibles a la sustancia de ensayo antiestrógeno son un patrón de tinción A o AD. También se observó que la célula convierte el patrón A o AD en el patrón D incluso cuando están creciendo con diversos estímulos distintos de las hormonas. Esto indica un efecto biológico que no afecta a la viabilidad cuando el estímulo es de una naturaleza

diferente. En los controles, no hay ningún cambio en AEF presente al inicio.

Se demuestra que el propio ER no es predictivo de un efecto del fármaco, pero la expresión inicial de AEF es predictiva de un efecto del fármaco. Además, la conversión de AEF en un estado inactivo indica un evento biológico
5 relevante para el receptor.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para identificar un tumor tratable con un antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa, que comprende:
- 5 a) exponer las células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas obtenidas de un paciente a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas; y
 b) detectar la presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos;
- 10 donde la presencia de unión focal indica la sensibilidad del tumor al tratamiento con el antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa y la ausencia de unión focal indica la falta de sensibilidad del tumor al tratamiento con el antiestrógeno, el antagonista del receptor de estrógeno o el inhibidor de aromatasa.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente detectar la presencia o ausencia de unión difusa del anticuerpo a receptores de estrógeno en los núcleos.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, donde la presencia o ausencia de unión focal se detecta por fluorescencia o colorimétricamente.
- 20 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la presencia o ausencia de unión focal es cuantificada.
5. El método de la reivindicación 4, donde la presencia o ausencia de unión focal se expresa como un porcentaje de células positivas a los focos de ER activados (AEF).
- 25 6. El método de la reivindicación 4, donde la presencia o ausencia de unión focal se expresa como una intensidad o densidad relativa de focos de receptores de estrógenos activados.
- 30 7. Un método para seleccionar el tratamiento farmacológico para un tumor, que comprende:
- a) exponer las células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas obtenidas de un paciente a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas;
- 35 b) detectar la presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos; y
 c) seleccionar un antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa para su uso en el tratamiento del tumor si está presente una unión focal.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el grado de distribución focal de AEF en las células cancerosas es del 1-100 %, 5-100 %, 25-100 % o del 50-100 %.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde un antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa se selecciona para su uso en el tratamiento del tumor.
- 45 10. Un antiestrógeno, un antagonista del receptor de estrógeno o un inhibidor de aromatasa para su uso en el tratamiento de un tumor previamente identificado como positivo a AEF, donde el estado positivo a AEF del tumor se determina mediante:
- a) exposición de las células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas obtenidas de un paciente a un anticuerpo antirreceptor de estrógeno en las condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos de las células cancerosas; y
- 50 b) detectando presencia o ausencia de unión focal del anticuerpo a los receptores de estrógeno en los núcleos;
- donde la presencia de unión focal indica la sensibilidad del tumor al tratamiento con el antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa y la ausencia de unión focal indica la falta de sensibilidad del tumor al tratamiento con el antiestrógeno, el antagonista del receptor de estrógeno o el inhibidor de aromatasa.
11. Un antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que es un antagonista de ER.

12. Un antiestrógeno, antagonista del receptor de estrógeno o inhibidor de aromatasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, que es un inhibidor de aromatasa.

5 13. Un método para analizar un fármaco antitumoral o candidato de fármaco antitumoral para determinar la actividad de inactivación de AEF que comprende:

- a) proporcionar células cancerosas o un espécimen de tejido tumoral que contiene células cancerosas, donde las células cancerosas expresan un grado inicial de distribución focal de AEF y los AEF se tiñen de forma detectable
10 con un anticuerpo receptor de estrógeno;
- b) exponer las células o espécimen de tejido al fármaco antitumoral o el candidato de fármaco antitumoral; y
- c) detectar un descenso en el grado de distribución focal de los AEF con respecto al valor inicial como una indicación
15 de la actividad de inactivación de AEF del fármaco antitumoral o el candidato de fármaco antitumoral, o no detectar ningún descenso sustancial en el grado de distribución focal de los AEF con respecto al valor inicial como una indicación de la falta de actividad de inactivación de AEF del fármaco antitumoral o el candidato de fármaco antitumoral.

14. El método o uso médico de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el anticuerpo antirreceptor de estrógenos es anti-ER α .

20

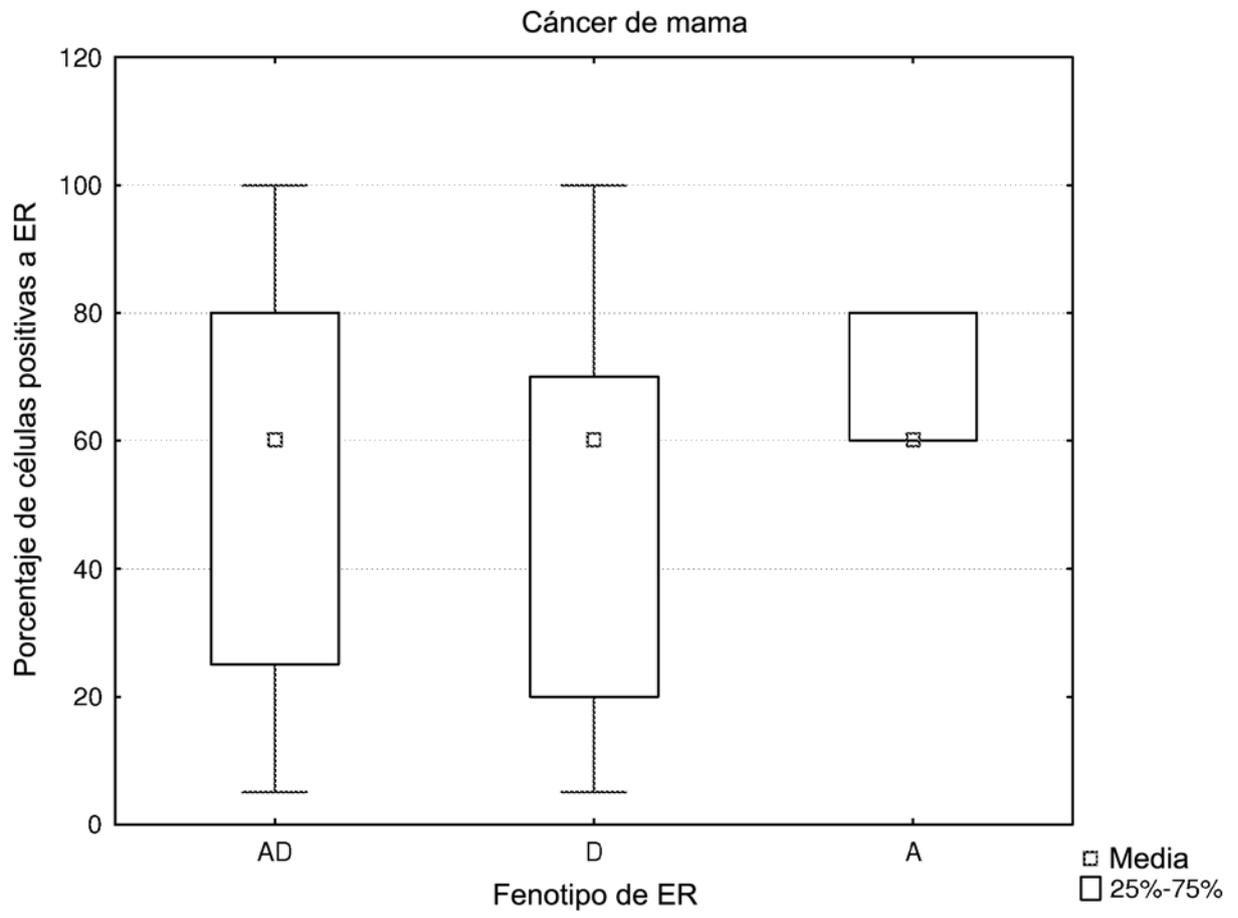


FIG. 1