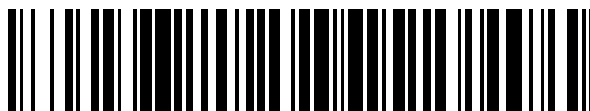


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 600**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2011 PCT/US2011/043189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2012 WO12006421**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2011 E 11804337 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2591363**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de cáncer de mama**

30 Prioridad:

31.03.2011 US 201161469890 P
07.07.2010 US 362021 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2018

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
1600 Huron Parkway, 2nd Floor
Ann Arbor, MI 48109-2590, US

72 Inventor/es:

HAYES, DANIEL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 652 600 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

Diagnóstico y tratamiento de cáncer de mama

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico, la investigación y la terapia del cáncer, incluyendo, pero no limitados a, marcadores tumorales. En particular, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para la predicción de la respuesta de un sujeto a terapias contra el cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer de mama es la segunda forma más común de cáncer entre las mujeres en los EE.UU. y la segunda de las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres. Aunque la década de 1980 vio un fuerte aumento en el número de nuevos casos de cáncer de mama, ese número ahora parece haberse estabilizado. La caída en la tasa de mortalidad por cáncer de mama se debe probablemente al hecho de que más mujeres se están haciendo mamografías. Cuando se detecta a tiempo, las posibilidades de éxito del tratamiento del cáncer de mama mejoran mucho.

15 El cáncer de mama, que es altamente tratable con cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal, es curable con más frecuencia cuando se detecta en estadios tempranos. La mamografía es la modalidad de exploración más importante para la detección precoz del cáncer de mama. El cáncer de mama se clasifica en una diversidad de subtipos, pero solo unos pocos de ellos afectan al pronóstico o a la selección de la terapia. El tratamiento del paciente después de una sospecha inicial de cáncer de mama generalmente incluye la confirmación del diagnóstico, la evaluación del estadio de la enfermedad y la selección de la terapia. El diagnóstico puede confirmarse mediante
20 una citología por aspiración, una biopsia con aguja gruesa con una técnica estereotáxica o de ultrasonidos para lesiones no palpables o una biopsia por incisión o escisión. En el momento en el que el tejido tumoral se extirpa quirúrgicamente, parte del mismo se procesa para la determinación de los niveles de RE y RP.

25 El pronóstico y la selección de la terapia se ven influenciados por la edad del paciente, el estadio de la enfermedad, las características patológicas del tumor primario incluyendo la presencia de necrosis tumoral, los niveles de receptor de estrógeno (RE) y receptor de progesterona (RP) en el tejido tumoral, el estado de sobreexpresión de HER2 y las mediciones de la capacidad proliferativa, así como por el estado menopáusico y la salud general. Los pacientes con sobrepeso pueden tener un peor pronóstico (Bastarrachea y col., *Annals of Internal Medicine*, 120: 18 [1994]). El pronóstico también puede variar con la raza, teniendo los pacientes de raza negra y, en menor medida, los de raza hispanoamericana, un peor pronóstico que los pacientes de raza blanca (Elledge y col., *Journal of the
30 National Cancer Institute* 86: 705 [1994]; Edwards y col., *Journal of Clinical Oncology* 16:2693 [1998]).

Los tres tratamientos principales del cáncer de mama son la cirugía, la radioterapia y la terapia farmacológica. Ningún tratamiento se adapta a todos los pacientes y con frecuencia se requieren dos o más. La elección está determinada por muchos factores, incluyendo la edad del paciente y su estado menopáusico, el tipo de cáncer (por ejemplo, ductal frente a lobular), su estadio, si el tumor es receptivo a hormonas o no y su nivel de invasividad.

35 Los tratamientos del cáncer de mama se definen como locales o sistémicos. La cirugía y la radiación se consideran terapias locales porque tratan directamente el tumor, la mama, los ganglios linfáticos u otras regiones específicas. El tratamiento farmacológico se denomina terapia sistémica, porque sus efectos son generalizados. Las terapias farmacológicas incluyen los fármacos quimioterápicos clásicos, el tratamiento de bloqueo hormonal (por ejemplo, inhibidores de la aromatasas, moduladores selectivos del receptor de estrógeno y reguladores negativos del receptor
40 de estrógeno) y el tratamiento con anticuerpos monoclonales (por ejemplo, contra HER2). Se pueden usar por separado o, con más frecuencia, en combinaciones diferentes.

Existe una necesidad de tratamientos adicionales, en particular tratamientos personalizados para el tumor de un paciente.

Sumario de la invención

45 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no pertenecen al ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico, la investigación y la terapia del cáncer, incluyendo, pero no limitados a, marcadores tumorales. En particular, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para la predicción de la respuesta de un sujeto a terapias contra el cáncer.

50 Las composiciones y procedimientos de la presente descripción pueden usarse en la determinación del pronóstico de supervivencia o respuesta al tratamiento (por ejemplo, tratamiento antiestrogénico) de un sujeto (por ejemplo, un sujeto diagnosticado con cáncer de mama metastásico). Dichos procedimientos encuentran un uso tanto en aplicaciones de investigación como clínicas.

Por ejemplo, puede proporcionarse un procedimiento para la determinación de un ciclo de tratamiento, en el que

dicho procedimiento comprende detectar el nivel de células tumorales circulantes (CTC) en una muestra de un sujeto diagnosticado con cáncer de mama metastásico; y la determinación de un ciclo de tratamiento basado en el nivel de CTC en la muestra. El ciclo de tratamiento puede comprender la terapia antiestrogénica (por ejemplo, tamoxifeno o un inhibidor de la aromatasa tal como letrozol, anastrozol o exemestano). En otros ejemplos, el ciclo de tratamiento comprende la quimioterapia. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de la caracterización de uno o más marcadores tumorales asociados a las CTC (por ejemplo, el receptor de estrógeno, HER-2, bcl-2, marcadores de apoptosis, IGFR1, vimentina o ki67). En algunos ejemplos, el marcador de apoptosis se detecta usando el anticuerpo monoclonal M30. En algunos ejemplos, el cáncer de mama metastásico es positivo para el receptor de estrógeno. En algunos ejemplos, uno o más de los marcadores tumorales se detectan mediante una tecnología múltiple (por ejemplo, RCP múltiple) o un ensayo inmunomagnético. En algunos ejemplos, los ensayos son automatizados. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende adicionalmente la etapa de determinar un Índice de Terapia Endocrina-CTC (ITE-CTC). En algunos ejemplos, el ITE-CTC se calcula mediante la asignación de puntos a niveles de CTC y marcadores tumorales. En algunos ejemplos, un ITE-CTC bajo es indicativo de un sujeto que es probable que responda a una terapia endocrina (por ejemplo, antiestrogénica). En algunos ejemplos, una puntuación de ITE-CTC alta es indicativa de un sujeto que no es probable que responda a la terapia endocrina y se trata mejor con quimioterapia.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la expresión del receptor de estrógeno en estirpes celulares de cáncer.

La Figura 2 muestra la expresión de a) Bcl-2, b) Ki-67 y c) HER-2 en estirpes celulares de cáncer.

La Figura 3 muestra el cálculo de puntuaciones de ITE-CTC para estirpes celulares de cáncer.

La Figura 4 muestra el cálculo de puntuaciones de ITE-CTC para tres pacientes.

La Figura 5 muestra un esquema de un estudio clínico de ejemplo de puntuaciones de ITE-CTC y el resultado clínico en el cáncer de mama.

La Figura 6 muestra un esquema de un estudio clínico de ejemplo de puntuaciones de ITE-CTC y el resultado clínico en el cáncer de mama.

La Figura 7 muestra un esquema de un estudio clínico de ejemplo de puntuaciones de ITE-CTC y el resultado clínico en el cáncer de mama.

La Figura 8 muestra los resultados de un estudio clínico de 8 pacientes que monitorizó puntuaciones de ITE-CTC.

Definiciones

Para facilitar una comprensión de la presente invención, se definen a continuación un número de términos y frases:

Como se usan en el presente documento, los términos "detectar", "detecta" o "detección" pueden describir ya sea el acto general de descubrir o discernir o la observación específica de una composición.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que contiene ácido nucleico, incluyendo, pero no limitada a, ADN o ARN. La expresión abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN incluyendo, pero no limitados a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede estar codificado por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier porción de la secuencia codificante a condición de que la actividad o las propiedades funcionales deseadas (por ejemplo, la actividad enzimática, la unión a ligando, la transducción de señales, la inmunogenia, etc.) de la longitud completa o el fragmento se conserven. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo de manera que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias localizadas en 3' o corriente abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se retiran o "se desempalman" del transcrito nuclear o primario;

por tanto, los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "gen heterólogo" se refiere a un gen que no está en su entorno natural. Por ejemplo, un gen heterólogo incluye un gen de una especie introducida en otra especie. Un gen heterólogo también incluye un gen nativo para un organismo que ha sido alterado de alguna manera (por ejemplo, mutado, añadido en múltiples copias, unido a secuencias reguladoras no nativas, etc). Los genes heterólogos se distinguen de los genes endógenos porque las secuencias de los genes heterólogos normalmente se unen a secuencias de ADN que no se encuentran asociadas de forma natural a las secuencias génicas en el cromosoma o se asocian a porciones del cromosoma que no se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genes expresados en loci en los que el gen no se expresa normalmente).

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a una longitud corta de una cadena de polinucleótidos monocatenaria. Los oligonucleótidos normalmente tienen menos de 200 restos de longitud (por ejemplo, entre 15 y 100), sin embargo, como se usa en el presente documento, el término también pretende abarcar cadenas de polinucleótidos más largas. Los oligonucleótidos con frecuencia se denominan por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 restos se denomina un "24-mero". Los oligonucleótidos pueden formar estructuras secundarias y terciarias mediante autohibridación o mediante hibridación con otros polinucleótidos. Dichas estructuras pueden incluir, pero no se limitan a, dúplex, horquillas, cruciformes, torsiones y tríplex.

Como se usan en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan con referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados mediante las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'" es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'". La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos están emparejadas de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O, puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico. Esto es de particular importancia en reacciones de amplificación, así como en procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que inhibe al menos parcialmente que una molécula de ácido nucleico completamente complementaria se hibride con un ácido nucleico diana que es "sustancialmente homóloga". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia Southern o Northern, hibridación en solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga a una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean de manera que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede someterse a ensayo mediante el uso de una segunda diana que sea sustancialmente no complementaria (por ejemplo, una identidad de menos de aproximadamente el 30 %); en ausencia de unión no específica la sonda no se hibridará con la segunda diana no complementaria.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico bicatenario tal como un ADNc o un clon genómico, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridarse con cualquiera o ambas cadenas de la secuencia de ácido nucleico bicatenario en condiciones de baja rigurosidad como se ha descrito anteriormente.

Un gen puede producir múltiples especies de ARN que se generan por corte y empalme diferencial del transcrito de ARN primario. Los ADNc que son variantes de corte y empalme del mismo gen contendrán regiones de identidad de secuencia o de homología completa (que representan la presencia del mismo exón o una porción del mismo exón en ambos ADNc) y regiones de no identidad completa (por ejemplo, que representan la presencia del exón "A" en el ADNc 1 en el que el ADNc 2 contiene el exón "B" en su lugar). Debido a que los dos ADNc contienen regiones de identidad de secuencia, ambos se hibridarán con una sonda derivada de todo el gen o porciones del gen que contienen las secuencias que se encuentran en ambos ADNc; las dos variantes de corte y empalme son, por tanto, sustancialmente homólogas a dicha sonda y entre sí.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenario, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridarse (es decir, sea el complemento de) la secuencia de ácido nucleico monocatenario en condiciones de baja rigurosidad como se ha descrito anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ven afectadas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la Tm del híbrido formado y la relación G:C dentro de los ácidos nucleicos. Una única molécula que contiene el apareamiento de ácidos nucleicos complementarios dentro de

su estructura se dice que está "autohibridada".

Como se usa en el presente documento, el término "rigurosidad" se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y a la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, en las cuales se realizan las hibridaciones de ácidos nucleicos. En "condiciones de baja rigurosidad" una secuencia de ácido nucleico de interés se hibridará con su complemento exacto, secuencias con apareamientos erróneos de bases individuales, secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, secuencias con una homología del 90 % o más) y secuencias que tienen solamente una homología parcial (por ejemplo, secuencias con una homología del 50-90 %). En "condiciones de astringencia media", una secuencia de ácido nucleico de interés se hibridará solo con su complemento exacto, secuencias con apareamientos erróneos de bases individuales y secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, con una homología del 90 % o más). En "condiciones de alta rigurosidad", una secuencia de ácido nucleico de interés se hibridará solo con su complemento exacto y (dependiendo de las condiciones tales como la temperatura) secuencias con apareamientos erróneos de bases individuales. En otras palabras, en condiciones de alta rigurosidad la temperatura puede aumentarse con el fin de excluir la hibridación con secuencias con apareamientos erróneos de bases individuales.

"Condiciones de rigurosidad alta" cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos comprenden condiciones equivalentes a la unión o la hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5X (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄ H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5X y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml seguido de lavado en una solución que comprende SSPE 0,1X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

"Condiciones de rigurosidad media" cuando se usan en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos comprenden condiciones equivalentes a la unión o la hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5X (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄ H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5X y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml seguido de lavado en una solución que comprende SSPE 0,1X, SDS al 1,0 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

"Condiciones de baja rigurosidad" comprenden condiciones equivalentes a la unión o la hibridación a 42 °C en una solución que consiste en SSPE 5X (NaCl 43,8 g/l, NaH₂PO₄ H₂O 6,9 g/l y EDTA 1,85 g/l, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5 %, reactivo de Denhardt 5X [el reactivo de Denhardt 5X contiene por cada 500 ml: 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (fracción V; Sigma)] y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml, seguido de lavado en una solución que comprende SSPE 5X, SDS al 0,1 % a 42 °C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

En la técnica es bien sabido que pueden emplearse numerosas condiciones equivalentes para comprender condiciones de baja rigurosidad; factores tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en solución o inmovilizada, etc.) y se consideran la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol) y la solución de hibridación puede variarse para generar condiciones de hibridación de baja rigurosidad diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones enumeradas anteriormente. Además, en la técnica se conocen condiciones que promueven la hibridación en condiciones de alta rigurosidad (por ejemplo, el aumento de la temperatura de la hibridación y/o las etapas de lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación, etc.) (véase la definición anterior de "rigurosidad").

Como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido de amplificación" se refiere a un oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico diana o su complemento y participa en una reacción de amplificación de ácido nucleico. Un ejemplo de un oligonucleótido de amplificación es un "cebador" que se hibrida con un ácido nucleico molde y contiene un extremo OH 3' que se prolonga mediante una polimerasa en un procedimiento de amplificación. Otro ejemplo de un oligonucleótido de amplificación es un oligonucleótido que no se prolonga mediante una polimerasa (por ejemplo, porque tiene un extremo 3' bloqueado), pero participa en o facilita la amplificación. Los oligonucleótidos de amplificación pueden incluir opcionalmente nucleótidos o análogos modificados o nucleótidos adicionales que participan en una reacción de amplificación, pero no son complementarios a o están contenidos en el ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de amplificación pueden contener una secuencia que no es complementaria a la secuencia diana o molde. Por ejemplo, la región 5' de un cebador puede incluir una secuencia promotora que es no complementaria al ácido nucleico diana (denominada un 'promotor-cebador'). Los expertos en la materia entenderán que un oligonucleótido de amplificación que actúa como un cebador puede modificarse para incluir la secuencia promotora 5' y, por tanto, actuar como un promotor-cebador. De forma similar, un promotor-cebador puede modificarse mediante la eliminación de, o la síntesis sin, una secuencia promotora y aún así actuar como un cebador. Un oligonucleótido de amplificación 3' bloqueado puede proporcionar una secuencia promotora y servir como molde para la polimerización (denominado un 'promotor-proveedor').

Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico, (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como la ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es

preferentemente monocatenario para una eficiencia máxima en la amplificación, pero como alternativa puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de usarse para preparar productos de extensión. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser la suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento.

Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sea de origen natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, de forma recombinante o mediante amplificación por RCP, que es capaz de hibridarse con al menos una parte de otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias de genes particulares. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención pueda marcarse con cualquier "molécula indicadora", de modo que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero no limitado a sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos a base de enzimas), fluorescentes, radiactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención se limite a ningún sistema particular de detección o marcador.

El término "aislado" cuando se usa en relación a un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado", se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un componente o contaminante con el que está asociado normalmente en su fuente natural. Un ácido nucleico aislado está presente en una forma o configuración que es diferente de aquella en la que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados como los ácidos nucleicos tales como ADN y ARN se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula hospedadora en la proximidad de los genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con otros ARNm numerosos que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que expresan habitualmente la proteína dada en las que el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales o está flanqueado de otra forma por una secuencia de ácido nucleico diferente que la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado ha de usarse para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la cadena sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener ambas cadenas codificante y no codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la eliminación de componentes (por ejemplo, contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los anticuerpos se purifican mediante la eliminación de proteínas no inmunoglobulinas contaminantes; también se purifican mediante la eliminación de inmunoglobulina que no se une a la molécula diana. La eliminación de proteínas no inmunoglobulinas y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a la molécula diana dan como resultado un aumento en el porcentaje de inmunoglobulinas reactivas a la diana en la muestra. En otro ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células hospedadoras bacterianas y los polipéptidos se purifican mediante la eliminación de proteínas de la célula hospedadora; el porcentaje de polipéptidos recombinantes aumenta de este modo en la muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se usa en su sentido más amplio. En un sentido, se entiende que incluye una muestra o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden obtenerse a partir de animales (incluyendo los seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos de la sangre, tales como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua, cristales y muestras industriales.

Aunque un número de documentos de la técnica anterior se refieren a

- recuentos de CTC (véase, por ejemplo, Anónimo, "*High CTC Levels Predicted Poor Outcome in Metastatic Breast Cancer*", 12 de diciembre de 2012, URL:<http://www.aacr.org/home/public-media/aacr-press-releases/press-releases-2010.aspx?d=2214>; G. T. BUDD Y COL., "*Circulating Tumor Cells versus Imaging--Predicting Overall Survival in Metastatic Breast Cancer*", *CLINICAL CANCER RESEARCH*, vol. 12, n.º 21, páginas 6403 - 6409; D. F. HAYES, "*Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival*", *CLINICAL CANCER RESEARCH*, vol. 12, n.º 14, páginas 4218-4224; MITRA TEWES Y COL., "*Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies*", *BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT*, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 115, n.º 3, páginas 581-590; documento US 2008/113350 A1; LIU, M. C. Y COL., "*Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer*", *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, vol. 27, n.º 31, páginas 5153-5159),

- recuentos de CTC como factor predictivo del resultado del cáncer de mama metastásico (véase, por ejemplo, CRISTOFANILLI, N. Y COL., "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer", *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, vol. 23, n.º 7, páginas 1420-1430, PIERGA, J.-Y. Y COL., "Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial", *CLINICAL CANCER RESEARCH*, vol. 14, páginas 7004-7010, WULFING, P. Y COL., "HER2-positive circulating tumor cells indicated poor clinical outcome in stage I to III breast cancer patients", *CLINICAL CANCER RESEARCH*, vol. 12, páginas 1715-1720, ROSS, J. S. Y COL., "Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer", *ANATOMIC PATHOLOGY*, vol. 132, n.º 2, páginas 237-245),
- estado de HER2 de los CTR en relación con el estado de RE/HER2 del tumor primario (véase, por ejemplo, TANJA FEHM Y COL., "HER2 status of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a prospective, multicenter trial", *BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT*, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 124, n.º 2, páginas 403-412),
- resistencia a quimioterápicos (véase, por ejemplo, A. GRADILONE Y COL., "Circulating tumor cells (CTCs) in metastatic breast cancer (MBC): prognosis, drug resistance and phenotypic characterization", *ANNALS OF ONCOLOGY*, vol. 22, n.º 1, páginas 86-92) y CTC como marcador de la sensibilidad a quimioterápicos (documento US 2005/079557),
- predicción de la resistencia/sensibilidad a la terapia endocrina basada en el estado de RE, HER-2 y Ki67 (YUMI ENDO Y COL., "High estrogen receptor expression and low Ki67 expression are associated with improved time to progression during first-line endocrine therapy with aromatase inhibitors in breast cancer", *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, SPRINGER-VERLAG, TO, vol. 16, n.º 5, páginas 512-518, MA CYNTHIA X Y COL., "Predicting endocrine therapy responsiveness in breast cancer", *ONCOLOGY*, PRR, HUNTINGTON, NY, EE.UU., vol. 23, n.º 2, páginas 133-142, RASTELLI FRANCESCA Y COL., "Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer", *TUMORI*, IT, vol. 94, n.º 3, páginas 370-383),
- sistemas de clasificación de marcadores tumorales (D. F. HAYES Y COL., "Tumor Marker Utility Grading System: a Framework to Evaluate Clinical Utility of Tumor Markers", *JNCI JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE*, vol. 88, n.º 20, páginas 1456-1466) y terapia de tumores endocrinos (NABHOLTZ JEAN-MARC Y COL., "Comparative review of anastrozole, letrozole and exemestane in the management of early breast cancer", *EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY*, INFORMA HEALTHCARE, REINO UNIDO, vol. 10, n.º 9, páginas 1435-1447),

dicha técnica anterior no consigue desvelar un procedimiento como se define en la reivindicación anexa 1, que comprende entre otras cosas el uso del marcador bcl-2 en combinación con los marcadores adicionales RE, HER-2 y ki67 y en el que se basa el ITE-ITC reivindicado.

Descripción detallada de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no pertenecen al ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico, la investigación y la terapia del cáncer, incluyendo, pero no limitados a, marcadores tumorales. En particular, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para la predicción de la respuesta de un sujeto a terapias contra el cáncer.

La mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en el mundo occidental a lo largo de los últimos 30 años, debido en parte a la aplicación generalizada de una terapia sistémica adyuvante. Sin embargo, más de 40.000 mujeres morirán por cáncer de mama metastásico en los Estados Unidos en 2008. Aunque algunos pacientes con cáncer de mama metastásico parecen estar curados, la mayoría están destinados a morir en última instancia debido a su enfermedad. Sin embargo, se ha introducido un número de nuevas terapias para los pacientes en este escenario, lo que da como resultado una prolongación moderada de la supervivencia y mejoras sustanciales en la paliación.

Por tanto, el objetivo del tratamiento para la mayoría de los pacientes con cáncer de mama metastásico es la elección de la terapia con la probabilidad más alta de respuesta y la posibilidad más baja de toxicidad, equilibrando de este modo los síntomas del cáncer con los efectos secundarios del tratamiento. De hecho, hay ahora disponible un amplio intervalo de estrategias y agentes para el tratamiento de estos pacientes. Éstos incluyen la quimioterapia (en la actualidad hay más de 10 agentes diferentes aprobados para el tratamiento del cáncer de mama metastásico), así como la terapia anti-HER2 (trastuzumab, lapatinib) y, aunque no están aprobadas por la FDA, las terapias antiangiogénicas también parecen bastante prometedoras. Sin embargo, uno de los pilares del tratamiento de los pacientes con cáncer de mama metastásico es la terapia antiestrogénica.

El cáncer de mama puede tratarse con una diversidad de enfoques antiestrogénicos, que básicamente pueden dividirse en aditivos y ablativos. La terapia aditiva utilizada más habitualmente es el modulador selectivo del receptor de estrógeno (MSRE), el tamoxifeno, aunque las terapias androgénicas tales como la fluoximesterona, y los agentes progestágenos, tales como el acetato de megestrol, también son eficaces. Las terapias ablativas eran, en el pasado, principalmente quirúrgicas, pero más recientemente se han conseguido en mujeres premenopáusicas con agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, tales como goserelina o leuprolida, y en mujeres postmenopáusicas con agentes que inhiben la conversión inducida por aromatasa de los precursores dihidroepiandrostenodiona (DHEA) y testosterona en estradiol y estrona. Existen tres inhibidores de la aromatasa

(IA) disponibles en los EE.UU.: letrozol, anastrozol y exemestano.

La selección de un tratamiento adecuado para los pacientes con cáncer de mama metastásico se basa en dos factores: el pronóstico y la predicción. En este sentido, la terapia antiestrogénica puede considerarse la primera de las terapias "dirigidas". Estudios posteriores han demostrado que el tamoxifeno es inactivo en pacientes con cánceres de mama negativos para el RE. Sin embargo, los tratamientos antiestrogénicos son eficaces solo en el 30-50 % de las mujeres con tumores positivos (o "ricos") para el RE, ya sea en el escenario metastásico o en el temprano. Se contempla que los pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para RE, aunque sea refractario a tratamiento endocrino, estarían mejor servidos con la quimioterapia inmediata, a pesar de su perfil de toxicidad aumentado, en lugar de retrasar la quimioterapia durante un ensayo de varios meses de la ineficacia del tratamiento endocrino, aunque sea menos tóxico.

Una vez que se selecciona una pauta de tratamiento paliativa para un paciente con cáncer de mama metastásico, ésta se suspende y el paciente comienza una nueva terapia por una de dos razones: 1) la terapia elegida es tan tóxica que incluso si funciona es poco probable que induzca la paliación; o 2) no funciona y el tumor progresa. Los procedimientos actuales de determinación de estos fenómenos, especialmente el último, incluyen la historia clínica, el examen físico, los ensayos serológicos y la evaluación radiográfica. La historia clínica y la exploración física son notoriamente poco fiables, debido a problemas de subjetividad y al hecho de que más del 50 % de los pacientes tienen lesiones metastásicas solo en órganos internos, tales como el hueso, el hígado y el pulmón. Los exámenes serológicos no específicos, tales como las enzimas derivadas de la médula (fosfatasa alcalina) y el hígado (fosfatasa alcalina, glutamato oxalato transferasa sérica, etc.) carecen tanto de sensibilidad como de especificidad suficientes para que sean útiles en la determinación de la progresión. Se han utilizado al menos tres categorías de marcadores tumorales asociados a tumores en el seguimiento de estos pacientes. Éstas incluyen ensayos para determinar la proteína MUC-1 (CA15-3, CA27.29), para determinar el antígeno carcinoembrionario (ACE) y para determinar el dominio extracelular de HER2. El Panel de la Guía de Marcadores Tumorales de la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica ha recomendado que se usen al menos CA15-3 y ACE en el seguimiento de pacientes seleccionados con cáncer de mama metastásico. Sin embargo, en los tres casos, la determinación temprana de la respuesta al tratamiento o del fracaso del tratamiento se confunde por el fenómeno de un "pico de marcador tumoral", en el que el marcador en realidad aumenta durante unas pocas semanas o meses antes de que disminuya al nivel basal o por debajo del mismo en hasta el 25 % de los pacientes que en última instancia creían haber respondido a la terapia. Por tanto, los resultados de marcadores tumorales circulantes, hasta la fecha, fundamentalmente no tienen valor para determinar la progresión durante los primeros uno a dos meses de una terapia de inicio reciente.

La formación de imágenes radiográficas ha sido el medio más respetado de determinación de la evolución clínica de un paciente con cáncer de mama metastásico. Se han desarrollado criterios estrictos para definir la respuesta, la estabilidad y la progresión para las radiografías simples, la tomografía computarizada y la resonancia magnética. Sin embargo, la formación de imágenes radiográficas tiene varios inconvenientes. La sensibilidad para determinar la progresión de todas estas modalidades es mala para la mayoría de los pacientes durante los primeros uno o dos ciclos de terapia y, en particular, los dos últimos son poco prácticas, costosas y se asocian a molestias para el paciente. Por tanto, estos ensayos por lo general no se realizan hasta que pasan varios meses en el tratamiento de un paciente después de iniciar una terapia nueva. Quizás de forma más importante, solo aproximadamente el 50 % de los pacientes con cáncer de mama metastásico tendrán una enfermedad "medible" sino que tendrán lesiones "no medibles" en el hueso y/o la pleura o lesiones "militares" en la piel y los pulmones que son demasiado pequeñas para cuantificarlas con precisión. Los esfuerzos para monitorizar los pacientes con enfermedad "solo ósea" han sido particularmente frustrantes. La gammagrafía ósea con pirofosfato de tecnecio es la modalidad de formación de imágenes utilizada más ampliamente para controlar a estos pacientes, pero está limitada por la sensibilidad relativamente baja para la detección de la progresión y por la denominada "exacerbación centellográfica", en la que se encuentra que pacientes que responden al tratamiento, en particular a la terapia endocrina, tienen un aumento de la captación del radiomarcador en las lesiones conocidas e incluso la aparición de nuevas áreas de captación como una función del aumento de la actividad de curación osteoblástica.

Existen pacientes seleccionados en los que la rápida progresión se determina fácilmente por medios clínicos, serológicos y/o radiológicos. Sin embargo, muchos pacientes con cáncer de mama metastásico presentan un reto clínico en la determinación de si es probable que una terapia recién iniciada tenga éxito durante los siguientes meses o se trata de una pauta inútil. Si es así, estos pacientes estarían mejor tratados con un tratamiento potencialmente más eficaz, incluso sea más tóxico, tal como la quimioterapia.

En consecuencia, en algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos de identificación de pacientes con cáncer de mama metastásico positivo para RE que no son propensos a responder a las terapias antiestrogénicas. En dichos pacientes, la quimioterapia tradicional puede iniciarse inmediatamente o después de un breve ensayo con una terapia antiestrogénica. Los procedimientos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones permiten la monitorización más temprana de la eficacia de tratamiento actual. En dichas situaciones, pueden elegirse tratamientos alternativos para los sujetos que no responden al tratamiento actual.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos que utilizan el análisis de células tumorales circulantes (CTC). Por ejemplo, en algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos

de determinación de la eficacia de la terapia antiestrogénica mediante la cuantificación de los niveles de CTC. En algunos ejemplos, el nivel de CTC se usa para determinar el pronóstico y guiar el ciclo de tratamiento.

5 En algunos ejemplos, los niveles de CTC se comparan con los niveles de un sujeto que no tiene cáncer o una población promedio de sujetos no diagnosticados con cáncer. En algunos ejemplos, los niveles de CTC se comparan con los promedios de población de sujetos diagnosticados con cáncer de mama metastásico, incluyendo los sujetos que han respondido a las terapias antiestrogénicas y los que no. En otros ejemplos, los niveles de CTC en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama metastásico o no metastásico se monitorizan en el tiempo.

10 En otros ejemplos, se caracterizan uno o más marcadores tumorales asociados a CTC con el fin de distinguir las mujeres a las que les va a ir bien en la terapia antiestrogénica frente a aquellas que parecen refractarias a hormonas y determinar de este modo un pronóstico o ciclo de tratamiento. En algunos ejemplos, los marcadores tumorales incluyen, pero no se limitan a, RE, HER2, bcl-2, apoptosis (tinción con M30 monoclonal), IGRFR1, vimentina y Ki67. Pueden utilizarse marcadores tumorales adicionales y son conocidos por los expertos en la materia. La presente descripción contempla marcadores tumorales tanto conocidos como desconocidos tanto (por ejemplo, aún por descubrir). Son marcadores tumorales preferidos aquellos que están presentes en CTC y son indicativos (solos o en combinación) de respuesta a la terapia antiestrogénica.

15 En algunos ejemplos, el estado de los marcadores tumorales en CTC se relaciona con el estado de estos mismos marcadores en el tejido primario y/o metastásico recogido de los mismos pacientes.

I. Células tumorales circulantes

20 Las células tumorales se reconocieron por primera vez en la circulación humana, aunque postmortem, hace más de 150 años. Los recientes avances en la tecnología han permitido el desarrollo de un sistema altamente automatizado y normalizado para separar las células tumorales circulantes (CTC) de la sangre entera con el uso de un enfoque inmunomagnético. En algunos ejemplos, los procedimientos de la presente descripción utilizan el sistema CellSearch™, (Immunicon Corporation, Huntingdon Valley, PA) para cuantificar las CTC (Allard y col., *Clin Cancer Res* 2004; 10(20): 6897-904; Cristofanilli y col., *N Engl J Med* 2004; 351(8): 781-91). El sistema CELL SEARCH identifica "acontecimientos" que después se caracterizan como de origen epitelial por tinción inmunofluorescente con anticuerpos anti-citoqueratina y se determinan que son celulares en virtud de la tinción con DAPI. Se identifican leucocitos contaminantes con tinción inmunofluorescente con un anticuerpo monoclonal contra CD45 y los resultados se muestran gráficamente en un formato digital.

30 La presente descripción no se limita al uso del sistema CELL SEARCH. Puede utilizarse cualquier procedimiento de aislamiento y/o cuantificación de CTC.

II. Marcadores tumorales

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos para la identificación de marcadores tumorales asociados a CTC. Se describen marcadores tumorales de ejemplo en más detalle a continuación.

35 Receptor de estrógeno (RE). Entre otros, los marcadores seleccionados que indican independencia de la terapia estrogénica incluyen niveles relativos de RE, HER2, bcl-2 y mediciones de apoptosis. Varios estudios han indicado que la asociación entre la expresión de RE y el beneficio de la terapia endocrina no es dicotómica, sino que más bien se relaciona con el nivel cuantitativo de la proteína RE. En consecuencia, se han usado diferentes puntos de corte para dicotomizar "positivo" de "negativo" para diferentes ensayos de RE. En algunos ejemplos, se usan niveles relativos de RE, que pueden medirse en CTC, para ayudar en la determinación de la probabilidad de respuesta a la terapia endocrina.

45 HER2. Una diversidad de investigaciones preclínicas y clínicas han indicado que la sobreexpresión y/o amplificación de HER2 disminuye la sensibilidad a la sensibilidad del tratamiento estrogénico en el cáncer de mama positivo para RE. La presente descripción no se limita a un mecanismo particular. De hecho, no es necesaria la comprensión del mecanismo para poner en práctica la presente invención. No obstante, se contempla que pacientes que tienen cáncer de mama positivo para RE, pero también positivo para HER2, tienen menos probabilidades de beneficiarse de los tratamientos antiestrogénicos.

50 BCL-2. BCL-2 es una proteína antiapoptótica que protege a una célula de entrar en la vía de la muerte celular programada. BCL-2 se expresa habitualmente en el cáncer de mama y se asocia a un peor pronóstico. La expresión de BCL-2 se expresa más habitualmente en los cánceres de mama positivo para RE que en los negativos para RE. Estudios preclínicos y algunos estudios clínicos indican que la expresión de BCL-2 parece estar asociada a la resistencia relativa a la terapia antiestrogénica. La presente descripción no se limita a un mecanismo particular. De hecho, no es necesaria la comprensión del mecanismo para poner en práctica la presente invención. Sin embargo, se contempla que los cánceres de mama positivos para RE y positivos para BCL-2 son más propensos a ser refractarios a los tratamientos endocrinos.

55 Apoptosis. Un mecanismo de acción de la terapia antiestrogénica está mediado a través de la muerte celular programada con apoptosis. Por tanto, la monitorización seriada de la apoptosis proporciona pruebas de la muerte de

las células del cáncer de mama. Estudios preoperatorios tanto de la quimioterapia como de la terapia hormonal han documentado que la inducción temprana de la apoptosis se asocia a la respuesta clínica posterior. La presente descripción no se limita a un mecanismo particular. De hecho, no es necesaria la comprensión del mecanismo para poner en práctica la presente invención. No obstante, se contempla que la evaluación seriada de la apoptosis proporciona una indicación de la eficacia de la terapia antiestrogénica.

Ki-67. Ki67 es un antígeno de proliferación que refleja la renovación celular. La tinción inmunohistoquímica de Ki67 en tejidos primarios se asocia al pronóstico en el cáncer de mama en estadio temprano. En estudios neoadyuvantes, la reducción de los niveles de Ki67 se ha relacionado con un beneficio aparente de las terapias antiestrogénicas, incluyendo tanto el tamoxifeno como los inhibidores de la aromatasa. La presente descripción no se limita a un mecanismo particular. De hecho, no es necesaria la comprensión del mecanismo para poner en práctica la presente invención. No obstante, se contempla que la evaluación seriada de Ki67 asociada a CTC antes y durante el tratamiento endocrino proporciona una indicación de la probabilidad de beneficio.

En algunos ejemplos, uno o más de los marcadores mencionados anteriormente se detectan en un formato múltiple o de panel. Por ejemplo, en algunos ejemplos, se utiliza un ensayo a base de RCP-ti de múltiples parámetros tal como OncotypeDX™ (Genomic Health Inc, CA). Los valores relativos de la expresión de RE, BCL-2, HER2 y Ki67 en impulsa el algoritmo utilizado para derivar la "puntuación de recurrencia (PR)" de OncotypeDX. Estudios correlativos altamente validados han demostrado que tanto los pacientes negativos para ganglios linfáticos como los positivos para ganglios linfáticos con PR baja, lo que refleja RE alto, HER2 bajo, BCL-2 bajo y Ki67 bajo, tienen un pronóstico cuando se tratan con tamoxifeno solo, mientras que aquellos con puntuación de recurrencia alta, lo que refleja RE bajo, HER2 alto, BCL-2 alta y Ki67 alto tienen un pronóstico mucho peor cuando se tratan con tamoxifeno solo, pero son mucho más propensos a beneficiarse de la quimioterapia (Paik y col., *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-26 .; Paik y col., *J Clin Oncol* 2006; 24:3726-34).

III. Procedimientos de detección

Se proporcionan a continuación procedimientos de ejemplo de la detección de marcadores asociados a las CTC. Sin embargo, puede utilizarse cualquier procedimiento adecuado de detección de ácidos nucleicos o proteínas marcadores tumorales.

A. detección de ADN y ARN

En algunos ejemplos, los marcadores tumorales se detectan como ARNm usando una diversidad de técnicas de ácidos nucleicos conocidas por los expertos habituales en la materia, incluyendo, pero no limitadas a: la secuenciación de ácidos nucleicos; la hibridación de ácidos nucleicos; y la amplificación de ácidos nucleicos.

1. Secuenciación

Los ejemplos ilustrativos no limitantes de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del terminador de la cadena (Sanger) y secuenciación del terminador del colorante. Los expertos habituales en la materia reconocerán que debido a que el ARN es menos estable en la célula y más propenso al ataque por nucleasas experimentalmente el ARN es generalmente se transcribe de forma inversa a ADN antes de su secuenciación.

La secuenciación del terminador de la cadena usa la terminación específica de secuencia de una reacción de síntesis de ADN usando sustratos nucleotídicos modificados. La prolongación se inicia en un sitio específico en el ADN molde mediante el uso de un cebador oligonucleotídico radiactivo corto, o marcado de otro modo, complementario al molde en esa región. El cebador oligonucleotídico se prolonga usando una ADN polimerasa, cuatro bases desoxinucleotídicas convencionales y una concentración baja de una cadena de nucleótidos de terminación, mucho más habitualmente un didesoxinucleótido. Esta reacción se repite en cuatro tubos separados turnándose cada una de las bases como el didesoxinucleótido. La incorporación limitada del nucleótido de terminación de cadena mediante la ADN polimerasa da como resultado una serie de fragmentos de ADN relacionados que se terminan solamente en posiciones en las que se usa ese didesoxinucleótido particular. Para cada tubo de reacción, los fragmentos se separan por tamaño mediante electroforesis en una losa de gel de poliacrilamida o un tubo capilar relleno de un polímero viscoso. La secuencia se determina mediante la lectura de qué calle produce una marca visualizada a partir del cebador marcado a medida que se barre desde la parte superior del gel hasta la parte inferior.

Secuenciación de terminador de tinte etiquetas como alternativa los terminadores. La secuenciación completa puede realizarse en una única reacción mediante el etiquetado de cada una de las di-desoxinucleótidos finalizadores de cadena con un colorante fluorescente separado, que emite fluorescencia a una longitud de onda diferente.

2. Hibridación

Los ejemplos ilustrativos no limitantes de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, hibridación *in situ* (HIS), micromatriz y transferencia Southern o Northern.

La hibridación *in situ* (HIS) es un tipo de hibridación que usa una cadena de ADN o ARN complementaria marcada como una sonda para localizar una secuencia de ADN o ARN específica en una parte o sección del tejido (*in situ*), o, si el tejido es lo suficientemente pequeña, todo el tejido (montaje completo de HIS). La HIS de ADN puede usarse para determinar la estructura de los cromosomas. La HIS de ARN se usa para medir y localizar ARNm y otros transcritos dentro de secciones de tejido o preparaciones completas. Las células y los tejidos de muestra se tratan generalmente para fijar los transcritos diana en su lugar y para aumentar el acceso de la sonda. La sonda se hibrida con la secuencia diana a temperatura elevada y después la sonda en exceso se elimina por lavado. La sonda que se marcó con cualquier base marcada radiactivamente, fluorescentemente o con antígeno se localiza y se cuantifica en el tejido usando ya sea autorradiografía, microscopía de fluorescencia o inmunohistoquímica, respectivamente. La HIS también puede usar dos o más sondas, marcadas con radiactividad u otros otros marcadores no radioactivos, para detectar simultáneamente dos o más transcritos.

2.1 HISF

En algunos ejemplos, las secuencias de marcadores tumorales se detectan usando hibridación *in situ* fluorescente (HISF). Se prefieren los ensayos de HISF que utilizan cromosomas bacterianos artificiales (CBA). Estos se han utilizado ampliamente en el proyecto de secuenciación del genoma humano (véase *Nature* 409: 953-958 (2001)) y los clones que contienen CBA específicos están disponibles a través de distribuidores que pueden localizarse a través de muchas fuentes, por ejemplo, NCBI. A cada clon de CBA del genoma humano se le ha dado un nombre de referencia que identifica de forma inequívoca el mismo. Estos nombres pueden usarse para encontrar una secuencia de GenBank correspondiente y para encargar copias del clon a un distribuidor.

Los protocolos específicos para la realización de HISF son bien conocidos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para la presente invención. Puede obtenerse orientación con respecto a la metodología a partir de muchas referencias, incluyendo: *In situ Hybridization: Medical Applications* (eds. G. R. Coulton y J. de Belleruche), Kluwer Academic Publishers, Boston (1992); *In situ Hybridization: In Neurobiology; Advances in Methodology* (eds. J. H. Eberwine, K. L. Valentino y J. D. Barchas), Oxford University Press Inc., Inglaterra (1994); *In situ Hybridization: A Practical Approach* (ed. D. G. Wilkinson), Oxford University Press Inc., Inglaterra (1992); Kuo, y col., *Am. J. Hum. Genet.* 49: 112-119 (1991); Klinger, y col., *Am. J. Hum. Genet.* 51: 55-65 (1992); y Ward, y col., *Am. J. Hum. Genet.* 52: 854-865 (1993). También existen kits que están disponibles en el mercado y que proporcionan protocolos para realizar ensayos de HISF (disponibles de, por ejemplo, Oncor, Inc., Gaithersburg, MD). Las patentes que proporcionan orientación sobre la metodología incluyen los documentos US 5.225.326; 5.545.524; 6.121.489 y 6.573.043. Todas estas referencias pueden usarse junto con referencias similares en la técnica y con la información proporcionada en la sección de Ejemplos en el presente documento para establecer etapas de procedimiento convenientes para un laboratorio particular.

2.2 Micromatrices

Se denominan micromatrices diferentes tipos de ensayos biológicos incluyendo, pero no limitados a: micromatrices de ADN (por ejemplo, micromatrices de ADNc y micromatrices de oligonucleótidos); micromatrices de proteínas; micromatrices de tejidos; micromatrices de transfección o celulares; micromatrices de compuestos químicos; y, micromatrices de anticuerpos. Una micromatriz de ADN, conocida habitualmente como chips de genes, chip de ADN o biochip, es una colección de manchas de ADN microscópicas unidas a una superficie sólida (por ejemplo, chip de vidrio, plástico o silicio) que forman una matriz con el fin de la formación de perfiles de expresión o la monitorización de los niveles de expresión de miles de genes simultáneamente. Los segmentos de ADN fijados se conocen como sondas, miles de las cuales pueden usarse en una única micromatriz de ADN. Las micromatrices pueden usarse para identificar genes de enfermedad mediante la comparación de la expresión génica en células con la enfermedad y células normales. Pueden fabricarse micromatrices usando una diversidad de tecnologías, incluyendo, pero no limitadas a: impresión con alfileres de punta fina sobre portaobjetos de vidrio; fotolitografía usando máscaras prefabricadas; fotolitografía usando dispositivos de espejos dinámicos; impresión de chorro de tinta; o, electroquímica en matrices de microelectrodos.

Se usa transferencia Southern y Northern para detectar secuencias de ADN o ARN específicas, respectivamente. El ADN o ARN extraído de una muestra se fragmenta, se separa por electroforesis en un gel de matriz y se transfiere a un filtro de membrana. El ADN o ARN unido al filtro se somete a la hibridación con una sonda marcada complementaria a la secuencia de interés. Se detecta la sonda hibridada unida al filtro. Una variante del procedimiento es la transferencia Northern inversa, en la que el ácido nucleico sustrato que se fija a la membrana es una colección de fragmentos de ADN aislados y la sonda es ARN extraído de un tejido y marcado.

3. Amplificación

El ADN genómico y el ARNm pueden amplificarse antes de o simultáneamente a la detección. Los ejemplos ilustrativos no limitantes de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RCP-TI), la amplificación mediada por transcripción (AMT), la reacción en cadena de la ligasa (RCL), la amplificación por desplazamiento de cadena (ADC) y la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (ABSAN). Los expertos habituales en la materia reconocerán que ciertas técnicas de amplificación (por ejemplo, RCP) requieren que el ARN

se transcriba inversamente a ADN antes de la amplificación (por ejemplo, RCP-TI), mientras que otras técnicas de amplificación amplifican el RNA directamente (por ejemplo, AMT y ABSAN).

La reacción en cadena de la polimerasa (Pat. de los EE.UU. N.º 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159 y 4.965.188), habitualmente denominada RCP, usa múltiples ciclos de desnaturalización, hibridación de pares de cebadores a cadenas opuestas y prolongación del cebador para aumentar exponencialmente el número de copias de una secuencia de ácido nucleico diana. En una variación denominada RCP-TI, se usa la transcriptasa inversa (TI) para hacer un ADN complementario (ADNc) a partir de ARNm, y el ADNc después se amplifica por RCP para producir múltiples copias de ADN. Para otras diversas permutaciones de RCP véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE.UU. N.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159; Mullis y col., *Meth. Enzymol.* 155: 335 (1987); y, Murakawa y col., *DNA* 7: 287 (1988).

La amplificación mediada por transcripción (Pat. de los EE.UU. N.º 5.480.784 y 5.399.491), habitualmente denominada AMT, sintetiza múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico diana autocatalíticamente en condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH sustancialmente constantes en las que múltiples copias de ARN de la secuencia diana generan copias adicionales autocatalíticamente. Véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE.UU. N.º 5.399.491 y 5.824.518. En una variación descrita en la Publ. de los EE.UU. N.º 20060046265, la AMT incorpora opcionalmente el uso de restos de bloqueo, restos de terminación y otros restos de modificación para mejorar la sensibilidad y precisión del procedimiento de AMT.

La reacción en cadena de la ligasa (Weiss, R., *Science* 254: 1292 (1991)), habitualmente denominada RCL, usa dos conjuntos de oligonucleótidos de ADN complementarios que se hibridan con regiones adyacentes del ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos de ADN se unen covalentemente por una ligasa de ADN en ciclos repetidos de desnaturalización térmica, hibridación y ligación para producir un producto oligonucleotídico ligado bicatenario detectable.

La amplificación por desplazamiento de cadena (Walker, G. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 392-396 (1992); Pat. de los EE.UU. N.º 5.270.184 y 5.455.166), habitualmente denominada ADC, usa ciclos de hibridación de pares de secuencias de cebadores con cadenas opuestas de una secuencia diana, prolongación del cebador en presencia de un dNTPαS para producir un producto de prolongación del cebador hemifósfotioado doble, mellado mediado por endonucleasa de un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción hemimodificado y prolongación del cebador mediada por polimerasa desde el extremo 3' de la mella para desplazar una cadena existente y producir una cadena para la siguiente ronda de hibridación del cebador, mellado y desplazamiento de la cadena, dando como resultado la amplificación geométrica del producto. La ADC termófila (ADCT) usa endonucleasas y polimerasas termófilas a temperaturas altas en esencialmente el mismo procedimiento (Pat. EP N.º 0 684 315).

Otros procedimientos de amplificación incluyen, por ejemplo: la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (Pat. de los EE.UU. N.º 5.130.238), habitualmente denominada ABSAN; una que usa una RNA replicasa para amplificar la propia molécula de sonda (Lizardi y col., *BioTechnol.* 6 1197 (1988)), habitualmente denominada Qβ replicasa; un procedimiento de amplificación basado en la transcripción (Kwoh y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173 (1989)); y, la replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874 (1990)). Para un análisis adicional de los procedimientos de amplificación conocidos véase Persing, David H., "*In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques*" en *Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications* (Persing y col., Eds.), págs. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, DC (1993)).

4. Procedimientos de detección

Pueden detectarse ácidos nucleicos marcadores tumorales no amplificados o amplificados mediante cualquier medio convencional. Por ejemplo, se detectan ácidos nucleicos marcadores tumorales mediante la hibridación con una sonda marcada de forma detectable y la medición de los híbridos resultantes. Se describen ejemplos ilustrativos no limitantes de los procedimientos de detección a continuación.

Un procedimiento de detección ilustrativo, el Ensayo de Protección de Hibridación (EPH) implica la hibridación de una sonda de oligonucleótidos quimioluminiscente (por ejemplo, una sonda marcada con éster de acridinio (AE)) con la secuencia diana, la hidrólisis selectiva del marcador quimioluminiscente presente en la sonda no hibridada y la medición de la quimioluminiscencia producida a partir de la sonda restante en un luminómetro. Véase, por ejemplo, la Pat. de los EE.UU. N.º 5.283.174 y Norman C. Nelson y col., *Nonisotopic Probing, Blotting, and Sequencing*, cap. 17 (Larry J. Kricka ed., 2ª ed. 1995).

Otro procedimiento de detección ilustrativo proporciona la evaluación cuantitativa del procedimiento de amplificación en tiempo real. La evaluación de un procedimiento de amplificación en "tiempo real" implica la determinación de la cantidad de amplicón en la mezcla de reacción ya sea de forma continua o periódicamente durante la reacción de amplificación y el uso de los valores determinados para el cálculo de la cantidad de secuencia objetivo presente inicialmente en la muestra. Se conoce bien en la técnica una diversidad de procedimientos para determinar la cantidad de secuencia diana inicial presente en una muestra basados en la amplificación en tiempo real. Éstos incluyen procedimientos desvelados en las Pat. de los EE.UU. N.º 6.303.305 y 6.541.205. Otro procedimiento para determinar la cantidad de secuencia diana presente inicialmente en una muestra, pero que no se basa en una

amplificación en tiempo real, se desvela en la Pat. de los EE.UU. N.º 5.710.029.

Los productos de amplificación pueden detectarse en tiempo real mediante el uso de diversas sondas autohíbridas, la mayoría de las cuales tienen una estructura de tallo-bucle. Dichas sondas autohíbridas se marcan de manera que emitan señales detectables de forma diferente, dependiendo de si las sondas están en un estado autohíbrido o en un estado alterado a través de la hibridación con una secuencia diana. A modo de ejemplo no limitante, las "antorchas moleculares" son un tipo de sonda autohíbrida que incluye distintas regiones de autocomplementariedad (denominadas "el dominio de unión a la diana" y "el dominio de cierre de la diana") que están conectadas por una región de unión (por ejemplo, un engarce no nucleotídico) y que se hibridan entre sí en condiciones de ensayo de hibridación predeterminadas. En un ejemplo preferido, las antorchas moleculares contienen regiones de bases monocatenarias en el dominio de unión a la diana que tienen de 1 a aproximadamente 20 bases de longitud y son accesibles para la hibridación con una secuencia diana presente en una reacción de amplificación en condiciones de desplazamiento de la cadena. En condiciones de desplazamiento de la cadena, la hibridación de las dos regiones complementarias, que pueden ser total o parcialmente complementarias, de la antorcha molecular se ve favorecida, excepto en presencia de la secuencia diana, que se unirá a la región monocatenaria presente en el dominio de unión a la diana y desplazará la totalidad o una porción del dominio de cierre de la diana. El dominio de unión de la diana y el dominio de cierre de la diana de una antorcha molecular incluyen un marcador detectable o un par de marcadores que interactúan (por ejemplo, luminiscente/inactivador) situados de manera que se produzca una señal diferente cuando la antorcha molecular se autohíbrida que cuando la antorcha molecular se hibrida con la secuencia diana, permitiendo de esta manera la detección de la sonda: dúplex de diana en una muestra de ensayo en presencia de antorchas moleculares no hibridadas. Se desvelan antorchas moleculares y una diversidad de tipos de pares de marcadores que interactúan en la Pat. de los EE.UU. N.º 6.534.274.

Otro ejemplo de una sonda de detección que tiene autocomplementariedad es una "baliza molecular". Las balizas moleculares incluyen moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia complementaria diana, un par de afinidad (o brazos de ácido nucleico) que mantiene la sonda en una conformación cerrada en ausencia de una secuencia diana presente en una reacción de amplificación y un par de marcadores que interactúan cuando la sonda está en una conformación cerrada. La hibridación de la secuencia diana y la secuencia complementaria a la diana separa los miembros del par de afinidad, desplazando de este modo la sonda a una conformación abierta. El desplazamiento a la conformación abierta es detectable debido a la reducción de la interacción del par de marcadores, que puede ser, por ejemplo, un fluoróforo y un inactivador (por ejemplo, DABCYL y EDANS). Se desvelan balizas moleculares en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.925.517 y 6.150.097.

Otras sondas autohíbridas son bien conocidas por los expertos habituales en la materia. A modo de ejemplo no limitante, podrían adaptarse pares de unión a la sonda que tengan marcadores de interacción, tales como los desvelados en la Patente de los EE.UU. N.º 5.928.862, para su uso en la presente invención. Los sistemas de detección adicionales incluyen "interruptores moleculares", como se desvelan en la Publ. de los EE.UU. N.º 20050042638. Otras sondas, tales como las que comprenden colorantes intercalantes y/o fluorocromos, también son útiles para la detección de productos de amplificación en la presente invención. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.814.447.

B. Detección de proteínas

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos de detección de proteína marcadora tumoral y/o niveles de proteína marcadora tumoral. Las proteínas se detectaron usando una diversidad de técnicas de proteínas conocidas por los expertos habituales en la materia, incluyendo, pero no limitadas a: secuenciación de proteínas; e, inmunoensayos.

1. Secuenciación

Los ejemplos no limitantes ilustrativos de técnicas de secuenciación de proteínas incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas y degradación de Edman.

La espectrometría de masas puede, en principio, secuenciar una proteína de cualquier tamaño, pero se vuelve computacionalmente más difícil a medida que aumenta el tamaño. Una proteína es digerida por una endoproteasa y la solución resultante se hace pasar a través de una columna de cromatografía líquida de alta presión. Al final de esta columna, la solución se pulveriza desde una boquilla estrecha cargada a un potencial positivo alto en el espectrómetro de masas. La carga en las gotitas hace que se fragmenten hasta que solo queden los iones individuales. Los péptidos después se fragmentan y se miden las relaciones de masa-carga de los fragmentos. El espectro de masas se analiza por ordenador y, con frecuencia se compara con una base de datos de proteínas previamente secuenciadas con el fin de determinar las secuencias de los fragmentos. Después, el procedimiento se repite con una enzima de digestión diferente y los solapamientos en las secuencias se usan para construir una secuencia para la proteína.

En la reacción de degradación de Edman, el péptido que se va a secuenciar se adsorbe sobre una superficie sólida (por ejemplo, una fibra de vidrio revestida con polibreno). El reactivo de Edman, fenilisotiocianato (PTC), se añade al

péptido adsorbido, junto con una solución tampón ligeramente básica de trimetilamina al 12 % y reacciona con el grupo amina del aminoácido N-terminal. El derivado de aminoácido terminal después puede separarse selectivamente mediante la adición de ácido anhídrido. El derivado se isomeriza para proporcionar una feniltiohidantoína sustituida, que puede retirarse por lavado e identificarse mediante cromatografía, y el ciclo puede repetirse. La eficiencia de cada etapa es de aproximadamente el 98 %, lo que permite que se determinen de forma fiable aproximadamente 50 aminoácidos.

2. Inmunoensayos

Los ejemplos ilustrativos no limitantes de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a: inmunoprecipitación; transferencia Western; ELISA; inmunohistoquímica; inmunocitoquímica; citometría de flujo; e, inmuno-RCP. Los anticuerpos policlonales o monoclonales marcados detectablemente usando diversas técnicas conocidas por los expertos habituales en la materia (por ejemplo, colorimétrica, fluorescente, quimioluminiscente o radiactiva) son adecuados para su uso en los inmunoensayos.

La inmunoprecipitación es la técnica de precipitación de un antígeno en la solución usando un anticuerpo específico para ese antígeno. El procedimiento puede usarse para identificar complejos de proteínas presentes en los extractos de células mediante el direccionamiento a una proteína que se cree que está en el complejo. Los complejos se extraen fuera de la solución mediante proteínas de unión a anticuerpo insolubles aisladas inicialmente de bacterias, tales como Proteína A y Proteína G. Los anticuerpos también pueden acoplarse a perlas de sefarosa que pueden aislarse fácilmente de la solución. Después del lavado, el precipitado puede analizarse mediante espectrometría de masas, transferencia Western o cualquier número de otros procedimientos para la identificación de componentes en el complejo.

Una transferencia Western, o inmunotransferencia, es un procedimiento para detectar proteína en una muestra dada de homogeneizado o extracto de tejido. Usa la electroforesis en gel para separar proteínas desnaturalizadas en masa. Las proteínas después se transfirieron fuera del gel y sobre una membrana, normalmente fluoruro de polivinilo o nitrocelulosa, donde se sondan usando anticuerpos específicos para la proteína de interés. Como resultado, los investigadores pueden examinar la cantidad de proteína en una muestra dada y comparar los niveles entre varios grupos.

Un ELISA, acrónimo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, es una técnica bioquímica para detectar la presencia de un anticuerpo o un antígeno en una muestra. Utiliza un mínimo de dos anticuerpos, uno de los cuales es específico para el antígeno y el otro se acopla a una enzima. El segundo anticuerpo hará que un sustrato cromógeno o fluorógeno produzca una señal. Las variaciones de ELISA incluyen ELISA sándwich, ELISA competitivo y ELISPOT. Debido a que el ELISA puede realizarse para evaluar ya sea la presencia de antígeno o la presencia de anticuerpos en una muestra, es una herramienta útil tanto para determinar las concentraciones de anticuerpos en suero y también para detectar la presencia de antígeno.

La inmunohistoquímica e inmunocitoquímica se refieren al procedimiento de localización de proteínas en una sección de tejido o célula, respectivamente, a través del principio de que los antígenos en el tejido o las células se unen a sus respectivos anticuerpos. La visualización se permite mediante el marcaje del anticuerpo con marcadores productores de color o fluorescentes. Los ejemplos típicos de marcadores de color incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Los ejemplos típicos de marcadores fluoróforos incluyen, pero no se limitan a, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE).

La citometría de flujo es una técnica para el recuento, el examen y la clasificación de partículas microscópicas suspendidas en una corriente de fluido. Permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de células individuales que fluyen a través de un aparato de detección óptico/electrónico. Un haz de luz (por ejemplo, un láser) de una sola frecuencia o color se dirige a una corriente de fluido enfocada hidrodinámicamente. Un número de detectores se dirige al punto donde la corriente pasa a través del haz de luz; una en línea con el haz de luz (dispersión frontal o FSC del inglés *forward scatter*) y varios perpendiculares al mismo (dispersión lateral (SSC, del inglés *Side Scatter*) y uno o más detectores fluorescentes). Cada partícula suspendida que pasa a través del haz dispersa la luz de alguna manera y los productos químicos fluorescentes en la partícula pueden excitarse en la luz que se emite a una frecuencia más baja que la fuente de luz. La combinación de luz dispersada y fluorescente es recogida por los detectores y, mediante el análisis de las fluctuaciones en el brillo en cada detector, uno para cada pico de emisión fluorescente, es posible deducir diversos hechos acerca de la estructura física y química de cada partícula individual. La FSC se correlaciona con el volumen celular y la SSC se correlaciona con la densidad o la complejidad interna de la partícula (por ejemplo, la forma del núcleo, la cantidad y el tipo de gránulos citoplasmáticos o la rugosidad de la membrana).

La reacción en cadena de la inmunopolimerasa (RCIP) utiliza técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para aumentar la generación de señales en inmunoensayos basados en anticuerpos. Debido a que no existe ninguna equivalencia de proteínas de la RCP, es decir, las proteínas no pueden replicarse de la misma manera que se replica el ácido nucleico durante la RCP, la única forma de aumentar la sensibilidad de detección es mediante la amplificación de la señal. Las proteínas diana se unen a anticuerpos que están conjugados directa o indirectamente con oligonucleótidos. Los anticuerpos no unidos se lavan y los anticuerpos unidos restantes tienen sus

oligonucleótidos amplificados. La detección de proteínas se produce a través de la detección de oligonucleótidos amplificados usando procedimientos de detección de ácidos nucleicos convencionales, incluyendo los procedimientos en tiempo real.

5 En algunos ejemplos, se utiliza la detección inmunomagnética. En algunos ejemplos, la detección es automatizada. Los procedimientos de detección inmunomagnéticos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los disponibles en el mercado de Veridex (Raritan, NJ).

C. Análisis de los datos

10 En algunos ejemplos, se usa un programa de análisis de ordenador para traducir los datos en bruto generados por el ensayo de detección (por ejemplo, la presencia, ausencia o cantidad de la expresión del marcador tumoral y/o el nivel de CTC) en datos de valor predictivo para un médico (por ejemplo, elección de la terapia contra el cáncer). El médico puede acceder a los datos de predicción usando cualquier medio adecuado. Por tanto, en algunos ejemplos preferidos, se proporciona la ventaja adicional de que el médico, que no es probable esté entrenado en genética o biología molecular, no tiene por qué comprender los datos en bruto. Los datos se presentan directamente al médico en su forma más útil. El médico entonces es capaz de utilizar inmediatamente la información con el fin de optimizar la atención del sujeto.

15 La presente descripción contempla cualquier procedimiento capaz de recibir, procesar y transmitir la formación hacia y desde los laboratorios que realizan los ensayos, los proveedores de información, el personal médico y los sujetos. Por ejemplo, en algunos ejemplos de la presente descripción, una muestra (por ejemplo, una biopsia o una muestra de sangre o suero) se obtiene de un sujeto y se somete a un servicio de realización de perfiles (por ejemplo, un laboratorio clínico en un centro médico, una empresa de realización de perfiles genómicos, etc.), ubicado en cualquier parte del mundo (por ejemplo, en un país diferente del país donde el sujeto reside o donde la información se usa en última instancia) para generar datos en bruto. Cuando la muestra comprende un tejido u otra muestra biológica, el sujeto puede visitar un centro médico para la obtención de la muestra y que se envíe al centro de realización de perfiles, o los sujetos pueden recoger la muestra por sí mismos (por ejemplo, una muestra de orina) y enviarla directamente a un centro de realización de perfiles. Cuando la muestra comprende información biológica determinada previamente, la información puede ser enviada directamente al servicio de realización de perfiles por el sujeto (por ejemplo, una tarjeta de información que contiene la información puede escanearse mediante un ordenador y los datos pueden transmitirse a un ordenador del centro de realización de perfiles usando un sistema electrónico de comunicación). Una vez recibida por el servicio de realización de perfiles, la muestra se procesa y se produce un perfil (es decir, datos de expresión), específico para la información de diagnóstico o pronóstico deseada para el sujeto.

20 Después, los datos del perfil se preparan en un formato adecuado para la interpretación por un médico especialista. Por ejemplo, en lugar de proporcionar los datos en bruto, el formato preparado puede representar una evaluación de diagnóstico o de riesgo (por ejemplo, la probabilidad de que un tratamiento contra el cáncer tenga éxito) para el sujeto, junto con recomendaciones para opciones de tratamiento particulares. Los datos pueden presentarse al médico mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, el servicio de realización de perfiles puede generar un informe que puede imprimirse para el médico (por ejemplo, en el punto de atención) o puede mostrarse al médico en un monitor de ordenador.

25 En algunos ejemplos, la información se analiza primero en el punto de atención o en una instalación regional. Los datos en bruto se envían a una instalación de procesamiento central para su análisis adicional y/o para convertir los datos en bruto en información útil para un médico o paciente. La instalación de procesamiento central proporciona la ventaja de la privacidad (todos los datos se almacenan en una instalación central con protocolos de seguridad uniformes), la velocidad y la uniformidad del análisis de los datos. Después, la instalación de procesamiento central puede controlar el destino de los datos después del tratamiento del sujeto. Por ejemplo, usando un sistema de comunicación electrónico, la instalación central puede proporcionar datos al médico, al sujeto o a investigadores.

30 En algunos ejemplos, el sujeto es capaz de acceder directamente a los datos usando el sistema de comunicación electrónico. El sujeto puede elegir intervención adicional o asesoramiento basado en los resultados. En algunos ejemplos, los datos se usan con fines de investigación. Por ejemplo, los datos pueden usarse para optimizar adicionalmente la inclusión o eliminación de marcadores como indicadores útiles de una condición o estado particular de la enfermedad.

D. Composiciones y Kits

Las composiciones para su uso en los procedimientos de diagnóstico de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sondas, oligonucleótidos de amplificación y anticuerpos. Las composiciones particularmente preferidas detectan la presencia de nivel de expresión de marcadores tumorales en una muestra de CTC.

35 Cualquiera de estas composiciones, solas o en combinación con otras composiciones como se describen en el presente documento, pueden proporcionarse en forma de un kit. Por ejemplo, la sonda marcada solo una vez y el par de oligonucleótidos de amplificación pueden proporcionarse en un kit para la amplificación y detección de marcadores tumorales. Los kits pueden comprender adicionalmente controles apropiados y/o reactivos de detección.

Las composiciones de sonda y anticuerpo como se describen en el presente documento también pueden proporcionarse en forma de un ensayo de matriz o panel.

IV. Determinación de un ciclo de tratamiento

5 En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona sistemas, kits y procedimientos para la determinación de un ciclo de tratamiento.

En algunos ejemplos, se determina un Índice de Terapia Endocrina-CTC (ITE-CTC). En algunos ejemplos, el ITE-CTC se calcula mediante la asignación de puntos a los niveles de CTC y marcadores tumorales (Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). En algunos ejemplos, un ITE-CTC bajo es indicativo de que es probable que un sujeto responda a la terapia endocrina (por ejemplo, antiestrogénica). En algunos ejemplos, una puntuación de ITE-CTC alta es indicativa de que no es probable que un sujeto responda a la terapia endocrina y se trata mejor con quimioterapia.

EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención.

15 **Ejemplo 1**

Desarrollo de un Índice de Terapia Endocrina-CTC (ITE-CTC)

El nivel de CTC puede enumerarse reproduciblemente y fiablemente usando un sistema inmunomagnético disponible en el mercado, automatizado (por ejemplo, sistema CellSearch®; Veridex LLC). Niveles altos de CTC predicen una progresión rápida en pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) (Cristofanilli, y col. *NEJM* 2004). Solo el ~50 % de los pacientes con CMM positivo para el receptor de estrógeno (RE) se benefician de la terapia endocrina (TE). Los pacientes con CMM refractario a fármacos endocrinos se palian mejor con quimioterapia. Este ejemplo describe un ensayo multiparamétrico usando CellSearch® que identifica pacientes con CMM positivo para el RE que tienen pocas probabilidades de beneficiarse de la TE y están mejor servidos con quimioterapia.

25 **Procedimientos.** El sistema CellSearch® tenía cuatro canales fluorescentes. Tres de ellos se usaron para diferenciar las CTC de los glóbulos blancos (DAPI, anti-citoqueratina, anti-CD45). El 4º canal "vacío" se usó para medir la expresión de RE, Bcl-2, HER2 y Ki67 con anticuerpos marcados con fluorescencia específica de antígeno. Estos cuatro marcadores se eligieron debido a sus asociaciones con la sensibilidad (RE, Bcl-2) o la resistencia (HER2, Ki-67) a la TE. Se añadieron células de cáncer de mama humano cultivadas (**MCF-7**: RE +, BCL-2 +, HER2 -, Ki67 +; **MDA-MB-231**: RE -, Bcl-2 -, HER2 -, Ki67 +; **BT-474**: RE +, Bcl-2 +, HER2 +, Ki67 +) en 7,5 ml de sangre completa humana de donantes normales y se separaron y se caracterizaron usando el kit CXC CellSearch®.

La Tabla 1 muestra la asociación de diversos marcadores a la respuesta a la TE.

Tabla 1	
<i>Fenotipo</i>	<i>ALTO Predice para la TE:</i>
n.º de CTC	Resistencia ¹
Biología de CTC:	
RE	Sensibilidad ²
Bcl-2	Sensibilidad ³
HER-2	Resistencia ⁴
Ki-67	Resistencia ⁵

La Tabla 2 muestra anticuerpos y parámetros experimentales.

Tabla 2

Marcador	Ac (todos AcM)	Fuente	Estirpes celulares de control		Tiempo de INTEGRACIÓN
			POS	NEG	
RE	RE-119.3	Veridex, LLC	MCF-7*	Sk-Br-3	0,222
Bcl-2	Abcl-2/(100)	BD Pharmingen	MCF-7	MDA-MB-231	0,222
HER-2	Her81	Veridex, LLC	Sk-Br-3 (3+IHC)	MCF-7 (1+ IHC)	0,02
Ki-67	B56	BD Pharmingen	MCF-7	MCF-7*	0,222

Resultados. Cada estirpe celular teñida apropiadamente para los marcadores respectivos, con controles negativos apropiados, aunque la tinción fue heterogénea, incluso dentro de una única estirpe celular (Figuras 1-3).

- 5 Usando estos datos, se desarrolló un ITE-CTC, en el que las puntuaciones se asignaron a las categorías individuales que consistían en recuentos de células emparejados con el porcentaje relativo y el grado de positividad de las células para cada marcador, prediciendo las puntuaciones más bajas (pocas o ninguna CTC o CTC con un alto % e intensidad de RE y Bcl-2; HER2 y Ki-67 bajos) = una respuesta favorable a la TE (Tablas 3 y 4).

Tabla 3

<i>Suponer 1-2 puntos de CTC + punto de BioScore = 3</i>			
<i>Categoría de ITE-CTC</i>	<i>Puntuación de ITE-CTC</i>	<i>Resultados clínicos para el paciente con tratamiento endocrino</i>	<i>Estrategia de tratamiento sugerida</i>
<i>Bajo</i>	0-3	Favorable <i>Responde a TE y/o enfermedad poco maligna</i> <i>TTP largo</i>	<i>Tratamiento con TE</i>
<i>Int</i>	4-6	<i>Probablemente responde o moderadamente poco maligna</i> <i>Tiempo TTP modesto</i>	<i>Tratamiento con TE</i>
<i>Alto</i>	7-14	<i>Malos</i> <i>Resistente a TE</i> <i>Progresión rápida</i>	<i>Tratamiento si RE neg con CTX</i>

Tabla 4

Puntos asignados a CTC basándose en el número de CTC

	BAJO (bueno)	INT	ALTO (malo)
n.º de CTC/7,5 ml (media 4 alicuotas)	0-4	5-10	>10
Puntos asignados	0	1	2

Puntos asignados ALTOS = Resistencia

Puntos biológicos asignados por CTC: (Suponer ≥ 5 CTC/7,5 ml)

	Bueno		Intermedio		Malo	
	% de CTC POS	Asignación de Bio-Puntos	% de CTC positivas	Asignación de Bio-Puntos	% de CTC positivas ¹	Asignación de Bio-Puntos
RE	>10%	0	1-10% ¹	2	0%	6
Bcl-2	>10%	0	1-10%	1	0%	2
HER-2	0%	0	1-10%	1	>10%	2
Ki-67	0%	0	1-10%	1	>10%	2

NOTAS:

¹ La expresión de RE se asigna en mayor peso que los otros marcadores

² Intervalo BioScore total: de 0 (RE y Bcl-2 altos; HER-2 y Ki-67 neg) a 12 (RE y Bcl-2 neg; HER-2 y Ki-67 altos)

CTC-ETI: Final Calculation

n.º de CTC/7,5 ml de GB	Puntos asignados por CTC	Categoría de BioScore	Puntos asignados por BioScore			Puntuación de ITE-CTC (Puntos de CTC + BioScore)
			Bueno	Intermedio	Malo	
0-4	0	NA				0
5-10	1	RE	0	2	6	1-13
		Bcl-2	0	1	2	
		HER-2	0	1	2	
		Ki-67	0	1	2	
10	2	RE	0	2	6	2-14
		Bcl-2	0	1	2	
		HER-2	0	1	2	
		Ki-67	0	1	2	

Categorías de ITE-CTC

Categoría de ITE-CTC	Puntuación de ITE-CTC	Resultados clínicos para el paciente con TE	Estrategia de tratamiento sugerida
Bajo	0-3	Favorable; Responde a TE/poco maligna TTP modesto	TE
Int	4-6	Probablemente favorable; Responde a TE/poco maligna TTP modesto	TE
Alto	7-14	Malos; Resistente a TE Progresión rápida	Quimioterapia (= RE NEG)

El ITE-CTC se determinó para 3 pacientes con cáncer de mama metastásico usando los procedimientos descritos anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 4.

- 5 En estudios adicionales se estudiaron 21 pacientes. El diseño del estudio y los resultados se muestran en las Figuras 7-8. Un paciente no fue elegible. Cinco de los 20 pacientes tuvieron un recuento bajo de CTC (<5 CTC/7,5 ml de sangre total) y se espera que tengan un pronóstico relativamente favorable. El ITE-CTC se determinó en 10 pacientes (50 %): 2 pacientes tuvieron un ITE-CTC bajo, mientras que 3 tuvieron uno intermedio y 5 tuvieron un alto. Las dificultades técnicas impidieron un ITE-CTC preciso en los 4 pacientes restantes. Cabe destacar que la expresión de los biomarcadores entre CTC en pacientes individuales fue heterogénea.
- 10

Se contempla que las puntuaciones de ITE-CTC más bajas (pocas o ninguna CTC o CTC con RE y Bcl-2 de CTC altos y HER2 y Ki-67 de CTC altos) se asocian a una respuesta favorable a la TE. El ITE-CTC se calcula en pacientes con CMM para determinar si un ITE-CTC alto predice la resistencia y la progresión rápida con TE.

REIVINDICACIONES

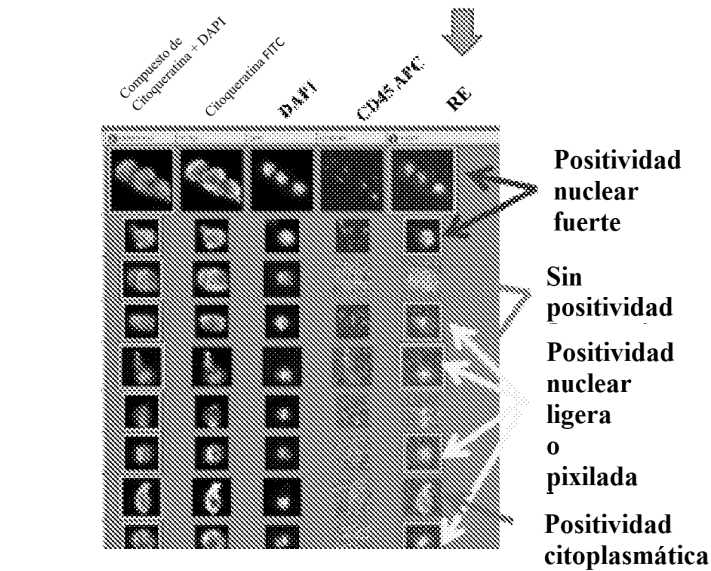
1. Un procedimiento de determinación de un ciclo de tratamiento, que comprende
 - a) detectar el nivel de células tumorales circulantes (CTC) en una muestra de un sujeto con cáncer de mama metastásico;
 - 5 b) determinar el número de CTC positivas para la expresión del receptor de estrógeno, HER-2, bcl-2 y Ki67;
 - c) calcular un Índice de Terapia Endocrina-CTC (ITE-CTC) numérico basado en dicho número de CTC positivas para la expresión de dicho receptor de estrógeno (RE), HER-2, bcl-2, Ki67, y el número total de CTC mediante la asignación de puntos basándose en el número de CTC positivas para la expresión de RE, HER-2, bcl-2 y Ki67 en las CTC, en el que dicho ITE-CTC se calcula
 - 10 i) asignando cero puntos cuando el número de CTC es de 0-4 por 7,5 ml, 1 punto cuando el número de CTC es de 5-10 por 7,5 ml y 2 puntos cuando el número de CTC es superior a 10 por 7,5 ml;
 - ii) asignando cero puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión del receptor de estrógeno es superior al 10 %, asignando 2 puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión del receptor de estrógeno es del 1-10 % y asignando 6 puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión del receptor de estrógeno es cero;
 - 15 iii) asignando cero puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión de HER-2 es del 0 %, asignando 1 punto cuando el número de CTC positivas para la expresión de HER-2 es del 1-10 % y asignando 2 puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión de HER-2 es superior al 10 %;
 - iv) asignando cero puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión de bcl-2 es superior al 10 %, asignando 1 punto cuando el número de CTC positivas para la expresión de bcl-2 es del 1-10 % y asignando 2 puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión de bcl-2 es del 0 %;
 - 20 v) asignando cero puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión de Ki67 es del 0 %, asignando 1 punto cuando el número de CTC positivas para la expresión de Ki67 es del 1-10 % y asignando 2 puntos cuando el número de CTC positivas para la expresión de Ki-67 es superior al 10 %; y
 - 25 vi) sumando dichos puntos para obtener dicho ITE-CTC; y
 - d) recomendar la administración de una terapia antiestrogénica a dicho sujeto cuando dicho ITE-CTC es de 0-3 y la administración de quimioterapia a dicho sujeto cuando dicho ITE-CTC es de 7-14, en el que un ITE-CTC de 0-3 es indicativo de una respuesta favorable a la terapia antiestrogénica, un ITE-CTC de 4-6 es indicativo de una respuesta moderada a la terapia antiestrogénica y un ITE-CTC de 7-14 es indicativo de una respuesta mala a la
 - 30 terapia antiestrogénica.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ciclo de tratamiento comprende una terapia antiestrogénica.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha terapia antiestrogénica comprende tamoxifeno.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicha terapia antiestrogénica se selecciona entre el grupo que
 - 35 consiste en letrozol, anastrozol y exemestano.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ciclo de tratamiento comprende quimioterapia.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que uno o más de dichos marcadores tumorales se detectan usando un procedimiento de RCP múltiple.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos marcadores tumorales se detectan usando un ensayo
 - 40 inmunomagnético.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cáncer de mama es positivo para el receptor de estrógeno.

Figura 1

% de células positivas para RE

	Sin POS = 0	POS Citopl = 0	POS ligera, pero POS nuclear = +1	POS nuclear fuerte = +2
MCF-7* + Ac Anti-RE	5%	9%	11%	75%

*RE heterogéneo en MCF-7**



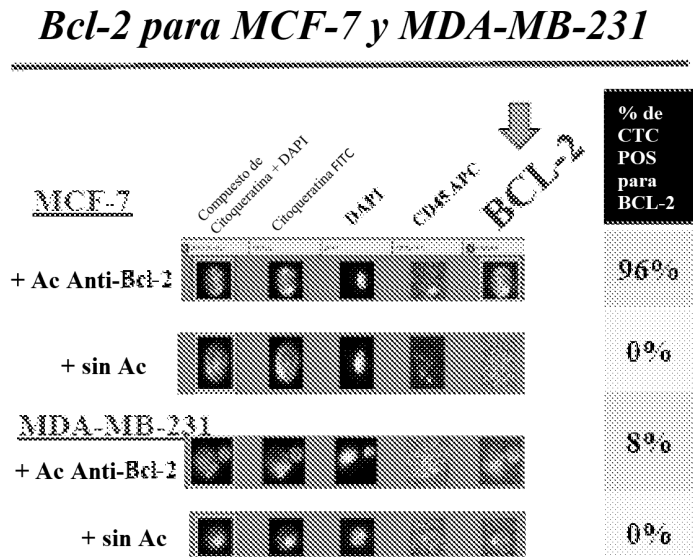
RE para MCF-7 y SK-Br-3*

	Complejo de Citokeratina + DAPI	Citokeratina FITC	DAPI	CD45 AEC	RE	% de CTC POS para RE
<u>MCF-7*</u> + Ac Anti-RE						75%
+ sin Ac						0%
<u>Sk-Br-3</u> + Ac Anti-RE						0%
+ sin Ac						0%

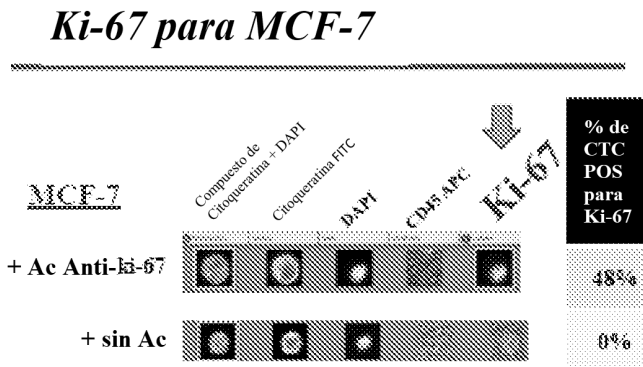
Puntos biológicos asignados por CTC

Figura 2

A



B



C

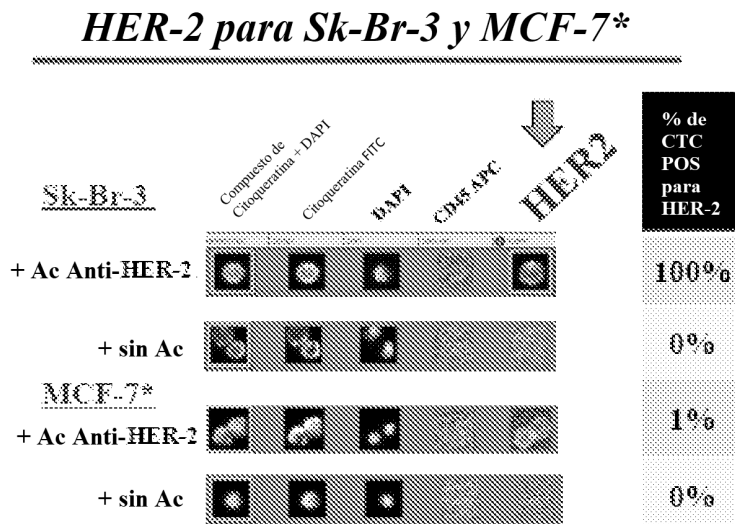


Figura 3

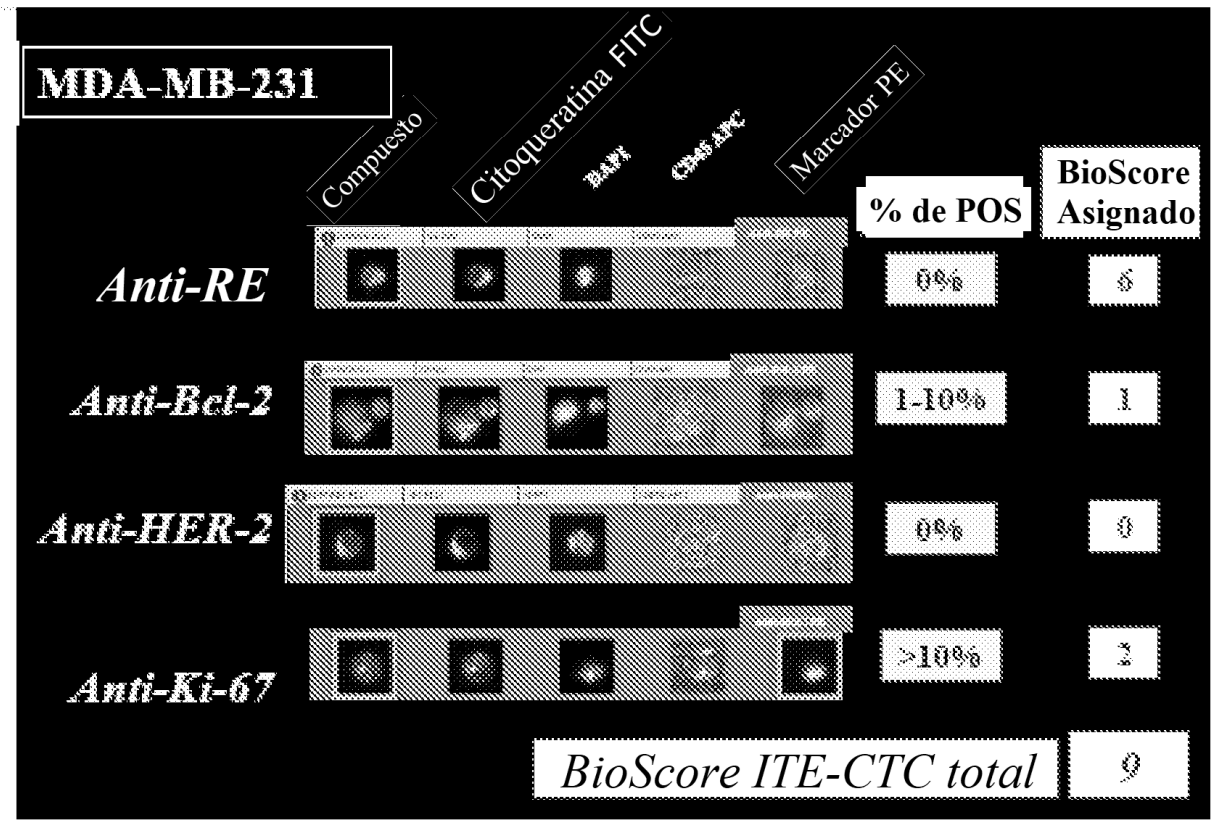
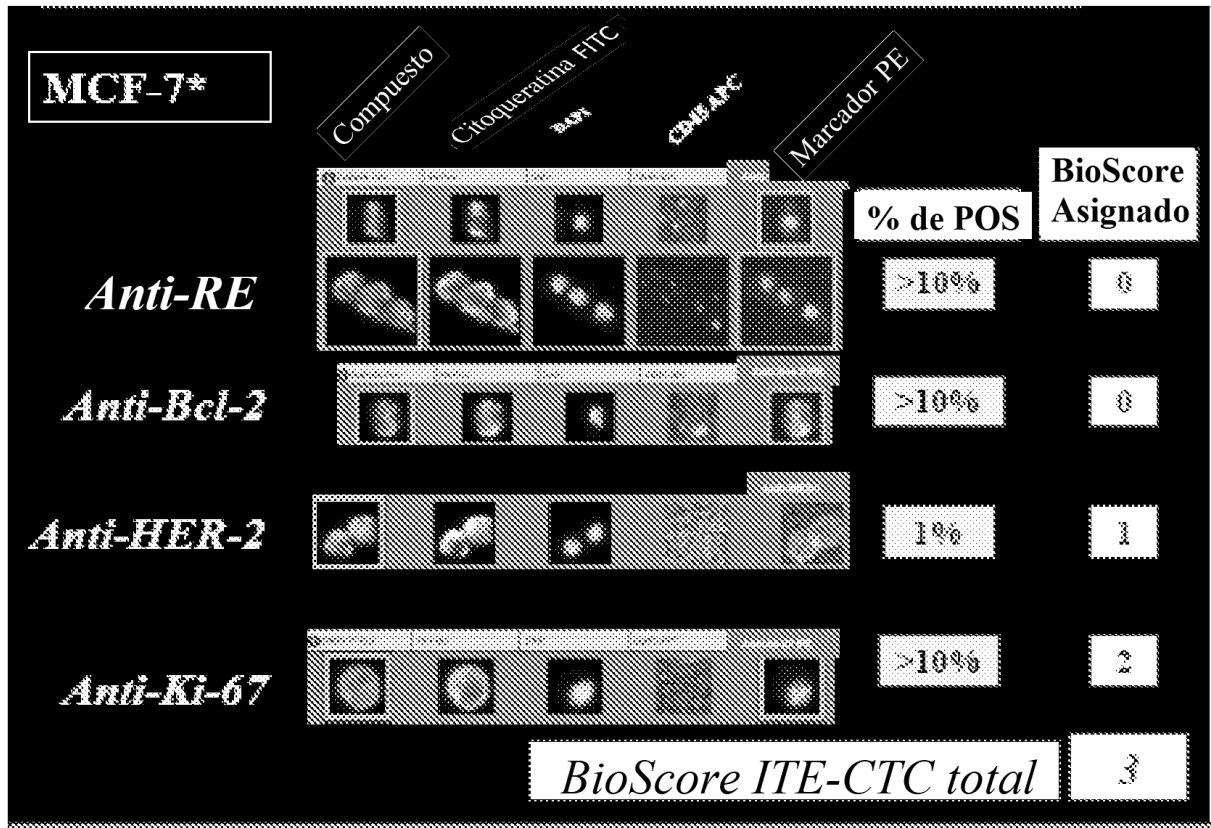


Figura 4

Paciente n.º 1 (tejido: POS para RE, NEG para HER-2)

Tubo	n.º de células/7,5 ml/Tubo		Puntos de CTC totales	Marcador	Bio-puntos totales				
	n.º de CTC/tubo	Media de CTC/7,5 ml			Compuesto Marcador PE	% de CTC positivas		Bio-Puntos Asignados	
RE	811	3362/4 = 840	2	RE		61	0	2	ITE-CTC = 4 <i>Int</i>
Bcl-2	934			Bcl-2		38	0		
HER-2	841			HER-2		0	0		
Ki-67	776			Ki-67		50	2		

Paciente n.º 2 (tejido: POS para RE, NEG para HER-2)

Tubo	n.º de células/7,5 ml/Tubo		Puntos de CTC totales	Marcador	Bio-puntos totales				
	n.º de CTC/tubo	Media de CTC/7,5 ml			Compuesto Marcador PE	% de CTC positivas		Bio-Puntos Asignados	
RE	6	25/4 ~ 6	1	RE		33	0	2	ITE-CTC = 3 <i>Bajo</i>
Bcl-2	5			Bcl-2		60	0		
HER-2	6			HER-2		0	0		
Ki-67	3			Ki-67		12	2		

Paciente n.º 3 (tejido: POS para RE, NEG para HER-2)

Tubo	n.º de células/7,5 ml/Tubo		Puntos de CTC totales	Marcador	Bio-puntos totales				
	n.º de CTC/tubo	Media de CTC/7,5 ml			Compuesto Marcador PE	% de CTC positivas		Bio-Puntos Asignados	
RE	8	14	2	RE		0%	6	8	ITE-CTC = 10 <i>Alto</i>
Bcl-2	16			Bcl-2		62%	0		
HER-2	17			HER-2		0%	0		
Ki-67	15			Ki-67		20%	2		

Figura 5

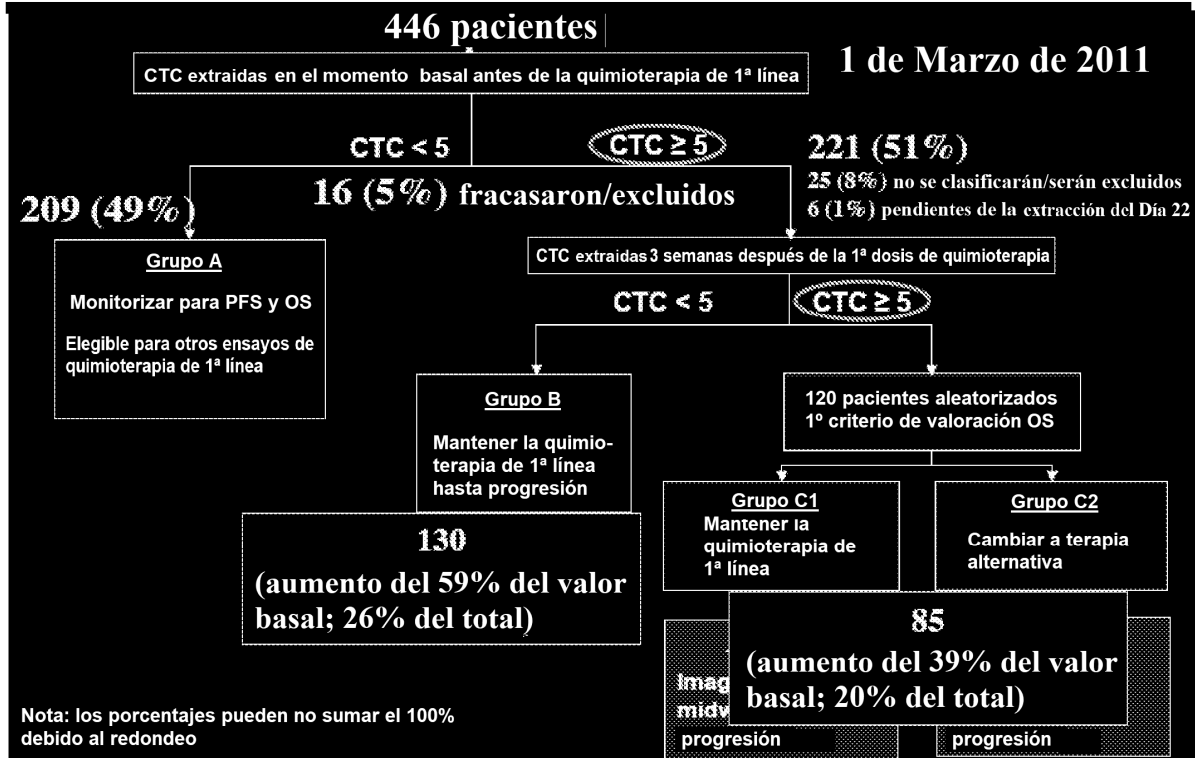


Figura 6

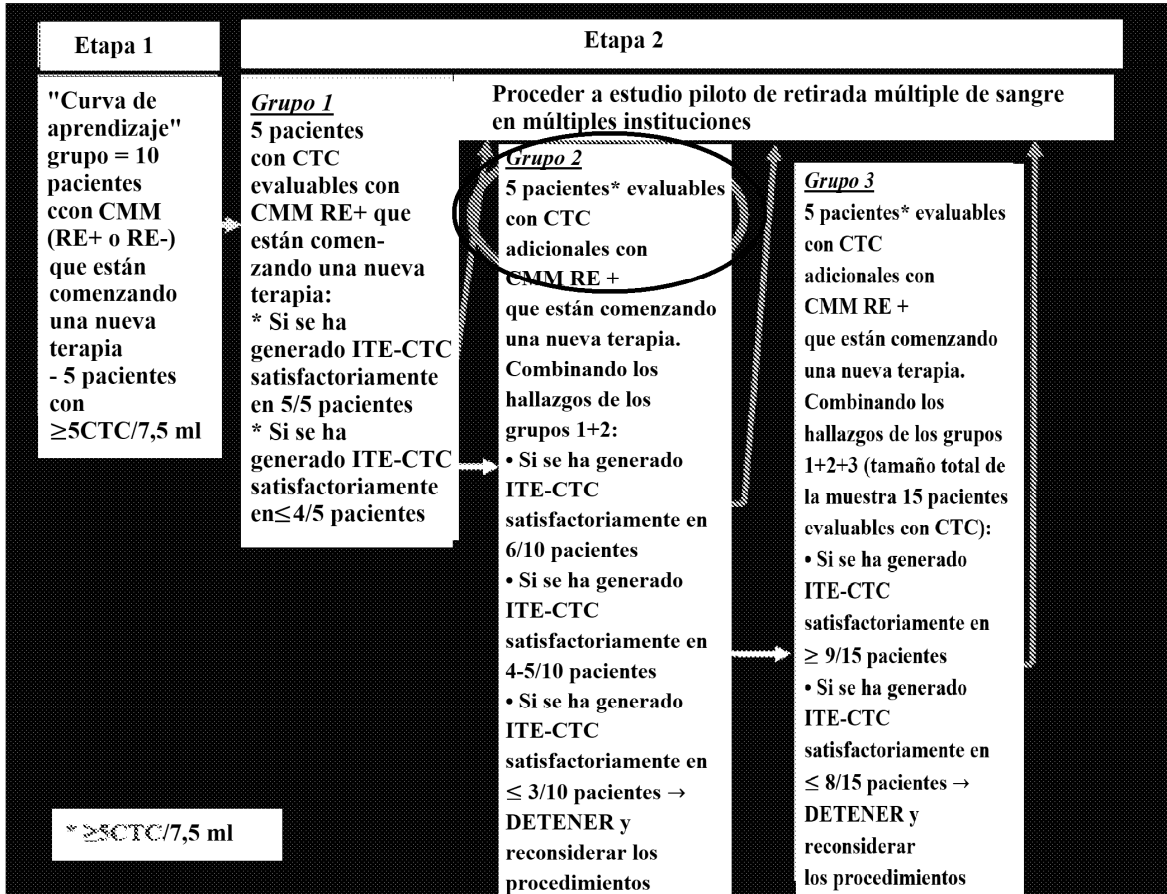


Figura 7

	Etapa 1	Etapa 2										
		Grupo 1					Grupo 2					Grupo 3
Fecha de inicio	19/01/2011	15/03/2011					29/03/2011					
N=	8	7					6					
Entraron	8	7					6					
Elegibles	8	6 (1 fallo de detección RE-: pt 11)					5					
Media + CTC ≥ 5	5	5					4					
Éxito de ITE_CTC	5	3 (pts: n.º12, n.º13, n.º14)					1 (pt n.º16)					
Fallo de la máquina/técnico	X	1 (pt n.º15)					1 (pt n.º20)					
Sin éxito	N/A	2	RE	BCL-2	KI-6 7	HER-2	3	RE	HER-2	KI-6 7	BCL-2	
		Pt 10	✓	✓	✓	Recuento bajo	Pt 17	✓	✓	✓	Recuento bajo	
		Pt 15	✓	X (fallo técnico)	✓	✓	Pt 19	✓	✓	✓	Recuento bajo	
							Pt 20	X	X	✓	X	
		Éxito en 3/5					Éxito en 1/4 (grupo 2-9 + éxito en 3/5 (grupo 1) = éxito en 4/9 (grupo 1 + grupo 2)					

Figura 8

Datos de pacientes individuales: ETAPA 1

Pat. n.º	Clínicos				CTC-Tubo						CTC-Marcadores						ITE-CTC	C			
	n.º		Medias		RE	Bcl-2	HER-2	Ki-67	Media	No. puntos asignados tubo	RE		Bcl-2		HER-2				Ki-67		No. puntos asignados marcadores
	+	-	+	-							%	P	%	P	%	P			%	P	
1	-	+	-	+	0	0	0	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	L
2	+	X	+	-	11	7	6	7	9	1	0	6	14	0	0,00	0	14	2	8	9	H
3	+	-	-	-	8	16	17	15	14	2	0	6	62	0	0	0	20	2	8	10	H
4	+	-	X	X	811	934	841	776	840	2	61	0	38	0	0	0	50	2	2	4	I
5	+	X	+	-	6	5	6	8	8	1	33	0	60	0	0	0	12	2	2	3	L
6	+	-	+	-	4	0	2	2	2	0	25	X	X	X	0	X	0	X	X	X	L
7	+	-	+	-	2	5	5	4	4	0	0	X	40	X	0	X	25	X	X	X	L
8	+	X	+	-	12	17	14	16	15	2	0	6	23,53	0	0	0	37	2	8	10	H

	=ITE-CTC Bajo (secundario <SCTC/7,5ml)
	=ITE-CTC Bajo
	=ITE-CTC Int
	=ITE-CTC Alto

Abreviaturas:
C = Categoría
X = N/A
H = Alto
I = Int
L = Bajo
P = Puntos

ETAPA 2: Grupo 1

Pat. n.º	Clínicos				CTC-Tubo						CTC-Marcadores						ITE-CTC	C			
	n.º		Medias		RE	Bcl-2	HER-2	Ki-67	Media	No. puntos asignados tubo	RE		Bcl-2		HER-2				Ki-67		No. puntos asignados marcadores
	+	-	+	-							%	P	%	P	%	P			%	P	
9	+	-	+	+	1	3	3	4	3	0	0,00	X	0	X	100	X	25	X	X	X	L
10	X	X	+	-	9	9	1	14	8	1	11	X	33	X	0,00	X	22	X	X	X	X
11 FALLO EN LA DETECCIÓN																					
12	+	-			9	8	17	9	11	2	0	0	0	2	0	0	11	2	10	12	H
13	+	-			10	14	16	9	12	2	0	6	57	0	0	0	0	0	6	8	H
14	+	-	+	-	114	90	87	78	92	2	51	0	92	0	0	0	32	2	2	4	I
15	+				88	N/A*	56	65	N/A	N/A	49	0	N/A	X	0	0	15	1	X	X	X

	=ITE-CTC Bajo (secundario <SCTC/7,5ml)
	=ITE-CTC Bajo
	=ITE-CTC Int
	=ITE-CTC Alto

Abreviaturas:
C = Categoría
X = N/A
H = Alto
I = Int
L = Bajo
P = Puntos

* Muestra abortada

ETAPA 2: Grupo 2

Pat n.º	Clínicos				CTC-Tubo						CTC-Marcadores								ITE-CTC	C	
	Nº	Muestra	Muestra	Muestra	RE	Bcl-2	HER-2	Ki-67	Medin	Bios. puntos asignados totales	RE		Bcl-2		HER-2		Ki-67				Bio. puntos asignados totales
											%	P	%	P	%	P	%	P			
16	+	-	X	X	8	6	9	8	8	1	37	0	67	0	0	0	37	2	2	3	L
17	+	-			9	3	5	14	8	1	0	X	67	X	0	X	57	X	X	X	X
18	+	-	+	-	0	0	0	0	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	L
19	+	-			8	3	8	15	8	1	0	X	67	X	0	X	33	X	X	X	X
20	+	+			X	X	X	13	N/A	X	X	X	X	X	X	X	23	X	X	X	X
21					4	4	5	6	4,75	0	50	0	0	2	0	0	40	2	X4	4	N I

	=ITE-CTC Bajo (secundario <SCTC/7,5ml)
	=ITE-CTC Bajo
	=ITE-CTC Int
	=ITE-CTC Alto

Abreviaturas:
 C = Categoría
 X = N/A
 H = Alto
 I = Int
 L = Bajo
 P = Puntos
 * Muestra abortada