

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 327**

21 Número de solicitud: 201601012

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.06.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/000148

71 Solicitantes:

**GEICAM - GRUPO ESPAÑOL DE INVESTIGACION
EN CANCER DE MAMA (100.0%)
Avenida de los Pirineos 7
28700 San Sebastián de los Reyes (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**PRAT, Aleix;
PEROU, Charles M. y
EMILIO, Alba**

54 Título: **CES: un índice quimioendocrino basado en PAM50 para el cáncer de mama con receptores hormonales positivos con un riesgo intermedio de recidiva**

57 Resumen:

CES: un índice quimioendocrino basado en PAM50 para cáncer de mama con receptores hormonales positivos con un riesgo intermedio de recidiva.

Este nuevo método hace referencia al desarrollo de un índice quimioendocrino (CES), basándose en el conocido análisis PAM50 para predecir si una paciente con cáncer de mama responde a quimioterapia o a terapia endocrina, concretamente en una paciente con cáncer de mama HR+/HER2- por encima del riesgo de recidiva (ROR) y de los subtipos intrínsecos de PAM50. Concretamente, la utilidad clínica de este predictor de CES se basa en el grupo de ROR intermedio de PAM50, donde la proporción de cada grupo CES (sensible a la terapia endocrina, intermedio y sensible a la quimioterapia) es superior al 25%.

ES 2 674 327 A1

CES: un índice quimioendocrino basado en PAM50 para el cáncer de mama con receptores hormonales positivos con un riesgo intermedio de recidiva

DESCRIPCIÓN

5

El nuevo método está relacionado con el campo de la predicción de la eficacia del tratamiento en pacientes con cáncer de mama. Concretamente, este nuevo método está relacionado con la predicción de la eficacia de quimioterapia o de terapia endocrina en pacientes con cáncer de mama con receptores hormonales positivos y
10 HER2 negativo (HR+/HER2-), independientemente del subtipo intrínseco y del riesgo de recidiva (ROR), preferentemente en el caso en el que clasifica a la paciente como paciente con riesgo intermedio de recidiva.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

Aproximadamente un 70 % de los cánceres de mama invasivos en el momento del diagnóstico son HR+/HER2- (TCGA: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature 2012; 490:61-70; Prat A, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2013, 31:203-209). Sin embargo, la enfermedad HR+/HER2- es clínica y
20 biológicamente heterogénea y son necesarias otras subclasificaciones para adaptar mejor los tratamientos actuales y futuros (Ades F., *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2014, 32:2794-2803; Prat A, *et al.* Mol Oncol. 2011, 5:5-23, Prat A, *et al.* Nat Rev Clin Oncol 2012, 9:48-57).

25

Durante la última década, estudios de caracterización molecular han identificado e investigado de forma exhaustiva los dos principales subtipos moleculares en la enfermedad HR+/HER2- (es decir, Luminal A y B) (TCGA: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012, 490:61-70; Prat A, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2013. 31:203-209; Perou CM, *et al.* Nature. 2000, 406:747-752). Los
30 tumores del subtipo Luminal A tienen un mejor pronóstico a los 5 y 10 años de seguimiento en comparación con los tumores del subtipo Luminal B independientemente de las variables clínico-patológicas clásicas (p. ej., el tamaño del tumor y el estado ganglionar) y el tratamiento (neo)adyuvante (es decir, terapia endocrina y quimioterapia) (TCGA: Comprehensive molecular portraits of human
35 breast tumours. Nature 2012; 490:61-70; Prat A, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2013, 31:203-209, Martín M, *et al.* Breast Cancer Research and Treatment. 2013, 138:457-466, Prat A, *et al.* Journal of the National Cancer Institute. 2014, 106). En

términos de sensibilidad al tratamiento, los tumores del subtipo Luminal A alcanzan tasas de respuesta patológica completa (RpC) significativamente inferiores a las de los tumores del subtipo Luminal B después de quimioterapia neoadyuvante con varios fármacos (Usary J, *et al.* *Clinical Cancer Research*. 2013, 19:4889-4899; von Minckwitz G, *et al.* *Journal of Clinical Oncology*. 2012, 30:1796-1804; Prat A, *et al.* *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012, 135:301-306; Prat A, *et al.* *BMC Medicine*. 2015, 13:1-11). Sin embargo, menos clara es la diferencia de sensibilidad a la terapia endocrina entre los dos subtipos luminales (Ellis MJ, *et al.* *Journal of Clinical Oncology*. 2011, 29:2342-2349; Dunbier AK, *et al.* *Steroids*. 2011,76:736-740).

10

Actualmente se recomienda la terapia endocrina adyuvante durante 5-10 años en todas las pacientes con cáncer de mama temprano HR+/HER2-, mientras que la quimioterapia se recomienda en pacientes con tumores de riesgo intermedio y alto (Goldhirsch A, *et al.* *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013*. *Annals of Oncology*). Sin embargo, la relación entre terapia y riesgo justifica la continuación de la investigación teniendo en cuenta que el riesgo está asociado a los dos factores relacionados con la biología tumoral y las características clínico-patológicas como el tamaño del tumor y el estado ganglionar, mientras que la capacidad de respuesta al tratamiento suele considerarse independiente de los factores clínico-patológicos.

15

20

En consecuencia, persiste la necesidad de herramientas para identificar los subgrupos heterogéneos con cáncer de mama HR+/HER2- con diferente pronóstico y diferente sensibilidad al tratamiento con el fin de seleccionar el tipo y el grado de tratamiento más adecuados para la paciente.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

30

El cáncer de mama con receptores hormonales positivos (HR+) es clínica y biológicamente heterogéneo y es necesario identificar los subgrupos con diferente pronóstico y sensibilidad al tratamiento. Aquí presentamos el desarrollo y la validación clínica en múltiples estudios de un predictor basado en la expresión génica, que utiliza el conocido análisis PAM50, que se asocia con la respuesta a quimioterapia y a terapia endocrina en cáncer de mama temprano más allá del riesgo de recidiva (ROR) y de los subtipos intrínsecos de PAM50. La utilidad clínica de este índice predictor quimioendocrino basado en PAM50 (CES) se encuentra en el grupo con ROR

35

intermedio de PAM50, donde la proporción de cada grupo CES (sensible a la terapia endocrina, intermedio y sensible a la quimioterapia) es superior al 25 %.

5 Nuestros resultados son los primeros en confirmar, en casos aleatorizados, una relación inversa entre sensibilidad a terapia endocrina y a quimioterapia en cáncer de mama receptor de estrógenos positivos (ER+). Pruebas anteriores han evidenciado una relación inversa entre proliferación y los procesos biológicos relacionados con RE en lo que respecta a sensibilidad a terapia endocrina y a quimioterapia en cáncer de mama ER+. Por ejemplo, dos estudios independientes demostraron una correlación
10 inversa entre un índice de 200 genes relacionado con ER, o entre la expresión de TAU, un gen relacionado con ER, y la sensibilidad a terapia endocrina y a quimioterapia (Symmans WF, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2010, 28:4111-4119; Andre F, *et al.* Clinical Cancer Research. 2007, 13:2061-2067). Asimismo, el alto índice de recurrencia medido por Oncotype DX (Genomic Health, Inc., Redwood, CA)
15 predijo poco o ningún beneficio del tratamiento adyuvante con tamoxifeno en el ensayo NSABP-B14, pero al mismo tiempo también predijo un beneficio considerable de la quimioterapia adyuvante con CMF en el ensayo NSABP-B20 (Paik S, *et al.* New England Journal of Medicine. 2004, 351:2817-2826; Paik S, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2006, 24:3726-3734). Estos resultados coinciden con nuestros resultados,
20 que muestran que prácticamente todas las pacientes con enfermedad con ROR alto se identifican como CES-C. Sin embargo, este nuevo método destaca también que, en la enfermedad con ROR alto/CES-C, no todas las muestras de ER+/HER2- son luminales (es decir, Luminal A o B) dado que también puede identificarse la enfermedad no luminal (es decir, Basal-like y HER2 *enriched*). Según nuestros resultados (**Fig. 2**), el beneficio de la quimioterapia en tumores con ROR alto/no luminales en la enfermedad HR+/HER2- es probablemente aún mayor que en tumores con ROR alto/luminales B.

Los resultados de este nuevo método también indican que el principal impulsor de la
30 sensibilidad a terapia endocrina y a la quimioterapia en la enfermedad RE+/HER2- es la biología intrínseca Basal-like frente a Luminal A. Para reflejar ambos estados biológicos en cada muestra, se han calculado los coeficientes de correlación de cada una de las muestras a ambos centroides PAM50 (es decir, Luminal A y Basal-like) y, a continuación, se restan ambos coeficientes (el coeficiente de correlación del luminal A
35 (CC Luminal A) frente al coeficiente de correlación de Basal-like (CC Basal-Like)). Por consiguiente, en lugar de elegir un perfil genético (p. ej., un perfil basado en la proliferación) de los numerosos perfiles que se pueden distinguir entre ambos subtipos

de una forma u otra, se decidió para cada tumor incorporar en un índice el estado intrínseco Basal-like frente a luminal A de cada tumor identificado por el predictor de subtipo PAM50. Cabe destacar que los genes de PAM50 se seleccionaron originalmente por su capacidad de reflejar la biología intrínseca mostrada por 1900 genes (la denominada lista de genes intrínsecos). De hecho, en el TCGA, el subtipo intrínseco definido por PAM50 reflejó la inmensa mayoría de la diversidad biológica mostrada por el conjunto de datos moleculares analizados (TCGA: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2012, 490:61-70).

Desde una perspectiva clínica, los datos de este nuevo método corroboran las guías actuales para el tratamiento sistémico del cáncer de mama temprano HR+/HER2-. Por un lado, se recomienda a las pacientes con un índice ROR bajo y una carga tumoral baja (es decir, <10 % de riesgo de recidiva distante a 10 años) que solo terapia endocrina (Harris LN, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2016). En efecto, los resultados mostrados con este nuevo método indican que estas pacientes tienen tumores con una alta sensibilidad a terapia endocrina y baja sensibilidad a quimioterapia. Por otro lado, se recomienda a las pacientes con enfermedad HR+/HER2 de alto riesgo que reciban tratamiento con terapia endocrina y quimioterapia. Según los datos de este nuevo método, este grupo es el único con un beneficio alto de quimioterapia y bajo de terapia endocrina. Con respecto a la terapia endocrina en este grupo, el principal problema es que no disponemos de datos de supervivencia que indiquen que los tumores CES-C no se benefician en absoluto de la terapia endocrina. Por tanto, a día de hoy no se recomienda la retirada de una estrategia de tratamiento potencialmente eficaz como la terapia endocrina en una paciente con un tumor ER+ (según lo definido por las guías de la ASCO/CAP) que se identifica como CES-C o ROR alto, aunque en pacientes cuyos tumores contengan niveles bajos de ER (del 1 % al 10 %), la ASCO/CAP recomienda debatir las ventajas y los inconvenientes de la terapia endocrina. Es poco probable que se lleve a cabo un ensayo adyuvante aleatorizado de gran tamaño en el que participen miles de pacientes para responder a esta pregunta en particular.

Aunque las implicaciones clínicas de CES en una enfermedad HR+/HER2- de riesgo bajo y alto son mínimas, la observación de que una enfermedad HR+/HER2- de riesgo intermedio, que representa ~30 % de los cánceres de mama con un diagnóstico reciente, sea biológicamente heterogénea y con una amplia gama de sensibilidades a quimioterapia podría tener implicaciones en la interpretación de dos ensayos clínicos prospectivos en curso. En el ensayo de fase III TailorX, 4500 pacientes con cáncer de

mama temprano HR+/HER2- con ganglios negativos y con un índice de recurrencia intermedio han sido aleatorizadas para recibir quimioterapia adyuvante o no recibir quimioterapia. Según nuestro análisis, este grupo intermedio podría estar compuesto por un mínimo de 3 grupos con diferentes sensibilidades a quimioterapia. Cabe destacar que el grupo CES-U parece estar muy poco definido y las decisiones relativas a la necesidad de quimioterapia podrían ser difíciles. Una situación similar podría producirse en el ensayo clínico de fase III RxPONDER en el que se está aleatorizando a pacientes con cáncer de mama temprano HR+/HER2-, y entre 1 y 3 ganglios linfáticos positivos, con riesgo bajo o intermedio, para recibir quimioterapia adyuvante o no. Una posible explicación es que el índice de recurrencia de Oncotype DX, así como otras pruebas pronósticas basadas en expresión génica, tales como PAM50 ROR o MammaPrint43, se han diseñado u obtenido específicamente para predecir los resultados y no la biología tumoral intrínseca ni la sensibilidad al tratamiento. Aunque se observa una alta correlación negativa entre ROR (riesgo) y CES (sensibilidad a los medicamentos), existen diferencias considerables entre ellos a nivel individual (discordancia de ~ 40 %).

Existen varias salvedades en nuestro estudio. En primer lugar, se trata de un estudio retrospectivo en poblaciones de pacientes heterogéneas y los resultados deben ser confirmados en uno o varios ensayos clínicos prospectivos. En segundo lugar, aunque los datos aquí presentados validan CES desde una perspectiva clínica, será necesario realizar una validación analítica posterior, dado que en la mayoría de conjuntos de datos, excepto el conjunto de Málaga, se ha utilizado la versión de PAM50 para investigación. Sin embargo, el hecho de que el CES (como variable continua y con los 2 puntos de corte) predijera la RpC en el conjunto de Málaga indica que la validación analítica de este biomarcador es factible. En tercer lugar, no podemos evaluar la asociación de CES con los datos de supervivencia de un ensayo clínico aleatorizado de quimioterapia adyuvante frente a la ausencia de quimioterapia adyuvante, o la terapia endocrina adyuvante frente a la ausencia de terapia endocrina adyuvante. Por tanto, el valor predictivo de estos perfiles solo se evaluó en terapia neoadyuvante donde se evaluaron las distintas variables de respuesta del tumor, la mayoría de las cuales se han relacionado con la supervivencia del paciente (Ogston KN, *et al.* The Breast. 2003, 12:320-327; Cortazar P, *et al.* The Lancet. 2014, 384:164-172). En cuarto lugar, algunos de los perfiles evaluados en el conjunto de datos basado en MDACC, como el índice de recurrencia de Oncotype DX o el índice de grado genómico, procedían de datos basados en microarrays y, por lo tanto, no se trata de las versiones comercializadas. En quinto lugar, no hemos podido demostrar una

asociación constante de CES con la respuesta endocrina en la enfermedad HR+ después de excluir los casos HER2-positivo. En el conjunto de datos Edinburgh, el estado de HER2 no estaba disponible en todas las pacientes. Aunque derivamos una definición subrogada basada en la expresión de ERBB2 del estado de HER2, que
5 demostró que el CES está asociado de manera independiente a la respuesta, esto no estaba pre-especificado y no cumplía las guías REMARK. Además, la asociación de CES con la respuesta endocrina no alcanzó una significatividad estadística ($p = 0,09$) en las pacientes con enfermedad HR+/HER2- en el conjunto de datos Marsden. Finalmente, las pacientes de cada uno de los conjuntos de datos recibieron diferentes
10 regímenes, programas y dosis de quimioterapia basada en antraciclinas/taxanos y, por lo tanto, no se pudo evaluar la capacidad de los perfiles para predecir la respuesta a determinados fármacos quimioterapéuticos o pautas de tratamiento.

Otra consideración importante de este nuevo método es que no hemos intentado
15 identificar uno o varios puntos de corte óptimos para CES, sino que nos hemos centrado en la asociación de la expresión continua de CES con cada variable. La razón principal es que en cada cohorte se utilizaron diferentes plataformas y protocolos basados en expresión génica y, por tanto, la normalización de un punto de corte de un biomarcador habría sido difícil de alcanzar y probablemente poco fiable.
20 En cualquier caso, el hecho de que los cuatro grupos de contraste presentaran asociaciones muy similares que se encontraron independientemente de la plataforma/protocolo utilizado, aboga en favor de una conclusión sólida.

Para concluir, CES es una firma genética única capaz de medir la sensibilidad a
25 quimioterapia y a terapia endocrina en cáncer de mama HR+/HER2-, más allá del subtipo intrínseco, de otras firmas genéticas y de variables patológicas estándar. CES podría tener un valor clínico considerable en pacientes con enfermedad HR+/HER2- de riesgo intermedio en la que no se puede determinar el beneficio de la quimioterapia multiagente adyuvante.

30 Según la información que figura en relación con este nuevo método, un primer aspecto hace referencia a un método *in vitro* para predecir si una paciente con cáncer de mama responde a quimioterapia o a terapia endocrina en una muestra aislada de HR+/HER2- de la paciente clasificada en el grupo de ROR intermedio mediante el kit
35 PAM50, cuyo método consiste en:

- a) obtener con el kit PAM50, el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo intrínseco Luminal A y el coeficiente de

correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo intrínseco Basal-like, en la muestra aislada, y

- b) obtener el índice quimioendocrino (CES) restando el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Basal-like del coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Luminal A (CES=CC Luminal A – CC Basal-Like);

donde el CES igual o superior a 0,7 indica que dicha paciente responde al tratamiento endocrino (CES-E), y donde el CES igual o inferior a 0,3 indica que dicha paciente responde a la quimioterapia (CES-C).

En una representación preferente del primer aspecto de este nuevo método, la muestra aislada es una muestra de biopsia.

En un segundo aspecto de este nuevo método, hace referencia al uso *in vitro* del CES para predecir si una paciente con cáncer de mama responde a la quimioterapia o a la terapia endocrina en una muestra aislada HR+/HER2- de la paciente clasificada en el grupo de ROR intermedio mediante el kit PAM50.

En una representación preferente, el CES se obtiene restando el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Basal-like del coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Luminal A mediante el kit PAM50.

En otra representación preferente de este aspecto del nuevo método, cabe señalar que un CES igual o superior a 0,7 indica que dicha paciente es CES-E. En otra representación preferente, un CES igual o inferior a 0,3 indica que dicha paciente es CES-C.

En otra representación preferente, la muestra aislada es una muestra de biopsia.

Salvo que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que suele entender un experto en la disciplina a la que corresponde este nuevo método. En la práctica de este nuevo método pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento. En la descripción y las afirmaciones, la palabra «incluir» y sus variaciones no tienen por objeto excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Otros objetos, ventajas y características del nuevo método se pondrán de

manifiesto para los expertos en la materia una vez analizada la descripción o podrán conocerse mediante la práctica del nuevo método. Los siguientes ejemplos e imágenes se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser restrictivos de este nuevo método.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Fig 1.** Asociación de la expresión génica con la sensibilidad a quimioterapia o a terapia endocrina. **(A)** Asociación entre la expresión de cada gen ($n = 542$) y la respuesta de Miller y Payne en cada grupo del ensayo GEICAM 2006-03. En la derecha figuran determinados genes principales cuya expresión está altamente asociada a la respuesta. **(B)** Expresión media de los 50 genes principales asociados a la sensibilidad a terapia endocrina (panel superior) y quimioterapia (panel inferior) en el ensayo GEICAM 2006-03 en los distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Los datos de expresión génica basada en la secuencia del ARN se han obtenido del portal de datos del proyecto de cáncer de mama *The Cancer Genome Atlas* (<https://tcgadata.nci.nih.gov/tcga/>). **(C)** Significado y puntuación de CES. **(D)** Asociación de CES (como variable continua) con respuesta a quimioterapia o a terapia endocrina en los 4 conjuntos de datos de validación.

20 **Fig. S1.** Asociación de CES con Miller y Payne tras quimioterapia en enfermedad HR+/HER2- de la cohorte de Málaga.

25 **Fig. S2.** Asociación de CES con sensibilidad a terapia endocrina en el conjunto de datos Edinburgh ($n = 120$). **(A)** Cambios en el volumen tumoral de cada paciente y clasificación de respuesta. **(B)** Asociación de CES y otras variables de respuesta (definidas como una disminución de al menos el 70 % en 90 días) en la población global. **(C)** Asociación de CES y otras variables de respuesta en la enfermedad HER2-negativa.

30 **Fig 2.** Pronóstico (ROR PAM50), subtipo intrínseco y CES en 6007 cánceres de mama primarios. **(A)** Se muestra un diagrama de dispersión de índice CES e índice ROR, coloreado por subtipo. Las dos líneas horizontales indican los puntos de corte de cada grupo de CES. Las dos líneas verticales indican los puntos de corte de cada grupo de ROR PAM50. **(B)** Número de pacientes en cada grupo de CES basándose en ROR. Cada barra está coloreada según el subtipo.

35 **Fig 3.** Resultados de supervivencia en el cáncer de mama temprano HR+ con ROR intermedio. **(A)** Enfermedad con ganglios negativos tratada sin terapia sistémica

adyuvante. **(B)** Enfermedad con ganglios negativos y con ganglios positivos tratada solo con tamoxifeno adyuvante. **(C)** Enfermedad con ganglios positivos tratada con quimioterapia adyuvante y terapia endocrina en el ensayo clínico GEICAM/9906. **(D)** Enfermedad con ganglios negativos y con ganglios positivos tratada con quimioterapia neoadyuvante y terapia endocrina adyuvante.

EJEMPLOS

10 **Métodos y materiales**

Ensayo clínico GEICAM/2006-03

Se evaluaron muestras de biopsia pre-tratamiento obtenidas con aguja gruesa en
 15 pacientes reclutadas de la cohorte luminal del ensayo clínico de fase II con terapia neoadyuvante GEICAM/2006-03 (NCT00432172) (Alba E, *et al.* Annals of Oncology. 2012). En este estudio, 95 pacientes que presentaban cáncer de mama receptor de estrógenos (ER) positivo (Allred 3-8), receptor de progesterona (PR) positivo (Allred 3-8), HER2- (según las guías de la ASCO/CAP (Wolff AC, *et al.* Journal of Clinical
 20 Oncology 25:118-145, 2006)), y citoqueratinas 8/18 positivas, fueron aleatorizadas para recibir quimioterapia neoadyuvante o terapia endocrina durante 24 semanas. La quimioterapia constaba de epirrubicina 90 mg/m² por vía intravenosa (i.v.) en combinación con ciclofosfamida 600 mg/m² i.v. el 1 día cada 21 días, durante 4 ciclos, seguida de docetaxel 100 mg/m² administrado i.v. el día 1 cada 21 días durante 4
 25 ciclos. La terapia endocrina constaba de exemestano 25 mg administrado por vía oral una vez al día. Las pacientes premenopáusicas recibieron goserelina 3,6 mg por vía subcutánea cada 28 días en 6 dosis. Después del tratamiento neoadyuvante, las pacientes se sometieron a una mastectomía o cirugía de conservación más disección de ganglios linfáticos axilares (salvo biopsia previa del ganglio linfático centinela con
 30 un resultado negativo).

Punto final de respuesta patológica en el ensayo GEICAM 2006-03

Se utilizó el sistema de clasificación histológica de Miller y Payne con escala de 5
 35 puntos (Ogston KN, *et al.* The Breast. 2003, 12:320-327) para medir la respuesta del tumor. Este sistema de clasificación consiste en una escala de 5 puntos que se centra en la reducción de la celularidad tumoral en el tumor de mama tratado (en la cirugía)

en comparación con las muestras previas al tratamiento. Grado 1: sin cambios en la celularidad global. Grado 2: hasta un 30 % de reducción de la celularidad. Grado 3: entre un 30 % y un 90% estimados de reducción en las células tumorales. Grado 4: más de un 90 % de reducción de células tumorales. Grado 5: respuesta patológica completa (RpC). Puede haber un carcinoma ductal *in situ*. En este estudio, la escala de Miller y Payne se redujo a una escala de 3 puntos para tener un buen número de casos en cada categoría y grupo: ausencia de respuesta (grados 1 y 2), respuesta intermedia (grado 3) y respuesta elevada (grados 4 y 5).

10 Análisis de expresión génica en GEICAM 2006-03

Se dispuso de 63 de las 95 muestras tumorales previas al tratamiento para los análisis de expresión génica. Para cada muestra, una sección de tejido mamario fijado en formalina y embebido en parafina (FFPE) se examinó en primer lugar con tinciones de hematoxilina y eosina para confirmar el diagnóstico y determinar el área del tumor. Se obtuvieron dos núcleos de 1 mm enriquecidos con tejido tumoral del bloque del tumor original y se purificó un mínimo de ~100 ng de ARN total para medir la expresión de 543 genes relacionados con el cáncer de mama mediante la plataforma nCounter (Nanostring Technologies, Seattle, WA, EE. UU.). Se hizo una transformación logarítmica en base 2 de los datos y se normalizaron mediante 5 genes constitutivos (ACTB, MRPL19, PSMC4, RPLP0 y SF3A1) y 14 controles negativos y positivos mediante la plataforma nCounter (Nanostring Technologies, Seattle, WA, EE. UU.) (GK Geiss, *et al.* Nat Biotech. 2008, 26:317-325).

25 Conjuntos de datos independientes/de contraste

Se evaluaron los datos de expresión génica y de respuesta a partir de 4 conjuntos de datos independientes de terapia neoadyuvante (Dunbier AK, *et al.* Steroids. 2011, 76:736-740; Hatzis C, *et al.* Jama. 2011, 305:1873-1881; Prat A, *et al.* Clinical Cancer Research. 2015; Dunbier AK, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2010, 28:1161-1167; Smith IE, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2007, 25:3816-3822; Turnbull AK, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2015). Se evaluaron los datos de expresión génica y de supervivencia a partir de 4 conjuntos de datos independientes de pacientes con cáncer de mama temprano (Prat A, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2013, 31:203-209; Hatzis C, *et al.* Jama. 2011, 305:1873-1881; Fan C, *et al.* BMC Medical Genomics. 2011, 4:1-15; Prat A, *et al.* Annals of Oncology. 2012, 23:2866-2873).

Conjunto de datos independiente Hatzis

5 Evaluamos el conjunto de datos, accesible al público, basado en la expresión genética de microarrays (GSE25066) notificado por Hatzis *et al.* (Hatzis C, *et al.* Jama. 2011, 305:1873-1881) que incluye 508 pacientes (272 con enfermedad HR+/HER2-) tratadas con quimioterapia neoadyuvante multiagente en diversos protocolos de investigación: LAB99-402, USO-02-103, 2003-0321 e I-SPY-1. La gran mayoría de las pacientes (96,4 %) recibieron pautas secuenciales basadas en antraciclinas/taxanos. Se analizó la expresión génica de las muestras previas al tratamiento y se dispuso de datos de respuesta tumoral después de la quimioterapia (es decir, RpC en la mama o axila frente a la ausencia de respuesta) para 488 pacientes (260 con enfermedad HR+/HER2-).

Conjunto de datos independiente Málaga

15 Como previamente descrito (Prat A, *et al.* Clinical Cancer Research, 2015), se seleccionó un total de 216 muestras tumorales HR+/HER2- conservadas en biobanco y evaluadas localmente de una cohorte multicéntrica independiente española de pacientes con cáncer de mama. A todas las pacientes se les prescribió un régimen de quimioterapia neoadyuvante estándar que constaba de 8-10 ciclos de antraciclinas y taxanos. Las muestras tumorales previas al tratamiento se evaluaron mediante el análisis PAM50 estándar (PROSIGNA[®]) a través de la plataforma de diagnóstico nCounter. La expresión génica de las muestras previas al tratamiento se analizó en el Hospital Universitario de Málaga, Nanostring Technologies normalizó los datos y el CES se aplicó en el VHIO de forma enmascarada respecto a los datos clínicos. Se dispuso de datos de respuesta del tumor (es decir, RpC en la mama/axila frente a ausencia de respuesta) de 180 pacientes. Además, se dispuso de datos de respuesta de Miller y Payne de 171 pacientes.

Conjunto de datos independiente Marsden

30 Evaluamos los perfiles de ARN (HumanWG-6 v2 Expression BeadChips [Illumina, San Diego, CA]) obtenidos de biopsias tumorales con aguja gruesa pre-tratamiento de 103 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama primario ER+ tratadas con anastrozol neoadyuvante durante 16 semanas en un ensayo clínico de fase II (Dunbier AK, *et al.* Steroids. 2011, 76:736-740; Dunbier AK, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2010, 28:1161-1167; Smith IE, *et al.* Journal of Clinical Oncology, 2007, 25:3816-

3822). Un subgrupo de pacientes recibió gefitinib durante las primeras 2 semanas; sin embargo, la adición de gefitinib a anastrozol no presentó ningún efecto clínico ni biológico adicional en Ki67. La respuesta tumoral clínica (respuesta completa y parcial frente a enfermedad estable y progresiva) se utilizó como variable. El CES se calculó en el IDIBAPS (Barcelona) de forma enmascarada respecto a los datos clínicos.

Conjunto de datos independiente Edinburgh

10 Evaluamos los perfiles de ARN (HumanWG-6 v2 Expression BeadChips [Illumina, San Diego, CA]) y Affymetrix U133A 2.0 [Santa Clara, California, EE. UU.]) obtenidos de biopsias tumorales con aguja gruesa pre-tratamiento de 120 pacientes postmenopáusicas con cáncer de mama primario ER+ tratadas con anastrozol neoadyuvante durante al menos 12 semanas (Turnbull AK, *et al.* Journal of Clinical Oncology, 2015). La respuesta se evaluó mediante ecografía. La respuesta tumoral
15 clínica se definió como una reducción en el volumen tumoral de al menos el 70 % durante 90 días de tratamiento. Los datos de expresión génica sin procesar se encuentran en Gene Expression Omnibus (GSE55374 y GSE20181). Se dispuso del estado clínico de HER2 en 45 casos. Los casos de HER2+ mostraron mayor expresión de ERBB2 en comparación con los casos de HER2-. Utilizamos el percentil 80 como
20 punto de corte para definir la positividad de HER2 en aquellos casos sin estado clínico de HER2. Un total de 89 casos resultaron ser HER2-.

Asignación de subtipos intrínsecos

25 Todos los tumores fueron asignados a un subtipo molecular intrínseco de cáncer de mama (Luminal A, Luminal B, HER2 enriched, Basal-like) y el grupo normal mediante el predictor de subtipo de PAM50 para investigación (Parker JS, *et al.* J Clin Oncol. 2009, 27:1160-1167; Nielsen TO, *et al.* Clin Cancer Res. 2010, 16:5222-5232), excepto para la cohorte Málaga en la que se utilizó un análisis estándar y
30 comercializado de PAM50 basado en nCounter. Antes de la subtipificación se normalizó cada conjunto de datos de acuerdo con lo notificado anteriormente (Prat A, *et al.* Br J Cancer. 2014, 111:1532-1541, 2014), excepto para la cohorte de Málaga que se normalizó mediante Nanostring de acuerdo con su algoritmo. Cabe destacar que el conjunto de datos Edinburgh basado en microarrays solo consta de muestras
35 ER+ y no fue posible centrar adecuadamente la denominada subtipificación intrínseca (Prat A, *et al.* Nat Rev Clin Oncol. 2012, 9). En este conjunto de datos, el CES se evaluó como una variable continua, ya que no se veía afectada por el centrado.

Conjunto de datos adyuvantes

Se evaluaron datos de expresión génica y de supervivencia a partir de 4 conjuntos de
 5 datos independientes de pacientes con cáncer de mama temprano con ROR
 intermedio (Wolff AC, *et al.* Journal of Clinical Oncology, 2006, 25:118-145; Hatzis C,
et al. Jama. 2011, 305:1873-1881; Fan C, *et al.* BMC Medical Genomics. 2011, 4:1-15;
 Prat A, *et al.* Annals of Oncology. 2012, 23:2866-2873). El primero es el conjunto de
 10 datos basado en MDACC descrito anteriormente, en el que se registró una
 supervivencia sin recidiva distante (Hatzis C, *et al.* Jama. 2011, 305:1873-1881, 2011).
 Todas las pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante y terapia endocrina. El
 segundo es una cohorte combinada y publicada anteriormente de 1318 pacientes con
 enfermedad HR+ tratada solo con tamoxifeno adyuvante (Prat A, *et al.* Annals of
 Oncology. 2012, 23:2866-2873). El tercero es una cohorte combinada y publicada
 15 anteriormente de pacientes que no recibieron ninguna terapia sistémica adyuvante
 (Fan C, *et al.* BMC Medical Genomics. 2011, 4:3). Por último, analizamos las
 muestras, tal como se ha descrito anteriormente (Prat A, *et al.* Br J Cancer. 2014;
 111:1532-1541), del ensayo clínico GEICAM/9906, en el que todas las pacientes
 recibieron quimioterapia adyuvante multiagente y terapia endocrina (Prat A, *et al.* J
 20 Clin Oncol. 2013, 31:203-9).

Cohorte combinada de cáncer de mama primario

Para evaluar la relación entre los subtipos de PAM50, pronóstico (ROR-P) y CES,
 25 hemos combinado los datos de PAM50 de 7 cohortes independientes y descritas
 anteriormente (TCGA: Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.
 Nature, 2012 490:61-70; Prat A, *et al.* Journal of Clinical Oncology. 2013, 31:203-209;
 Prat A, *et al.* Breast Cancer Research and Treatment. 2012, 135:301-306; Hatzis C, *et*
 30 *al.* Jama. 2011, 305:1873-1881; Curtis C, *et al.* Nature. 2012, 486:346-352; Horak CE,
et al. Clinical Cancer Research. 2013, 19:1587-1595; Fan C, *et al.* BMC Medical
 Genomics. 2011, 4:3), que representan un total de 6007 muestras de tumor primario.
 Se evaluó el CES en cada cohorte, y se creó una matriz combinada.

Análisis estadístico

35 El análisis biológico de las listas de genes se realizó con la herramienta de anotación
 DAVID 6.7 (Dennis G, *et al.* Genome Biol. 2003, 4:R60-543), utilizando la lista de 543

genes como referencia. Se evaluó la asociación entre la expresión de cada gen y la respuesta de Miller y Payne (3 categorías) mediante un análisis de significación de microarrays cuantitativo (SAM) (Tusher VG, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2001, 98:5116-5121). En ambos conjuntos de datos de contraste se evaluó la asociación entre cada variable y la RpC o respuesta clínica/radiológica mediante análisis de regresión logística simple y multivariante. Se evaluó el rendimiento predictivo del CES mediante el análisis de la curva «característica operativa del receptor» (ROC). Las estimaciones de supervivencia se obtuvieron a partir de las curvas de Kaplan-Meier y la existencia de diferencias se comprobó mediante el test de *log rank*. Se utilizaron modelos de Cox simples y multivariantes para determinar la significatividad del carácter pronóstico independiente de cada variable. Los p-valores notificados son bilaterales.

Resultados

15

Conjunto de datos de GEICAM/2006-03

63 pacientes premenopáusicas y postmenopáusicas fueron evaluadas en este estudio (Tabla 1). La mayoría de las pacientes presentaban carcinomas ductales (83 %), tumores de un tamaño de 2-5 cm (76 %), tumores histológicos de grado 3 (59 %), ganglios negativos (54 %) y subtipo luminal por PAM50 (84 %). Tras quimioterapia, los tumores del subtipo Luminal B mostraron una respuesta de Miller y Payne más elevada que los tumores del subtipo Luminal A (media de 2,0 frente a 1,4, P = 0,048). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en la respuesta entre los dos subtipos luminales después de la terapia endocrina (P = 0,407). Además, no se observó ninguna interacción estadísticamente significativa (P = 0,429) entre el subtipo y el tratamiento (terapia endocrina frente a quimioterapia) en la respuesta tumoral. Cabe destacar que la única paciente que alcanzó una RpC (es decir, Miller y Payne de grado 5) tenía un tumor Basal-like y estaba incluida en el grupo de quimioterapia.

30

Tabla 1. Características clínico-patológicas y distribución de subtipos en el estudio GEICAM 2006-03*.

	QT	%	TE	%	P-valor
Núm.	32	-	31	-	-
Edad (media)	53.7	-	52.3	-	0.596
Estado menopáusico					

	QT	%	TE	%	P-valor
Pre-menopáusica	14	44%	14	45%	1.000
Post-menopáusica	18	56%	17	55%	
Estadio tumoral					
T1	1	3%	2	6%	0.420
T2	23	72%	25	81%	
T3	8	25%	4	13%	
Tamaño medio tumoral (cm)	4.2		3.8		0.278
Ganglios					
N0	15	47%	19	61%	0.501
N1	16	50%	11	35%	
N2	1	3%	1	3%	
Grado					
G1	0	0%	0	0%	0.862
G2	8	25%	6	19%	
G3	18	56%	19	61%	
G4	6	19%	6	19%	
Tipo histológico					
Ductal	26	81%	26	84%	1.000
Lobular	2	6%	2	6%	
Otros	4	13%	3	10%	
Ki-67 IHQ (media)	31.1		33.5		0.720
Respuesta Miller-Payne (media)	2.6		2.2		0.124
PAM50					
Luminal A	16	50%	13	42%	0.564
Luminal B	11	34%	13	42%	
HER2-E	0	0%	1	3%	
Basal-like	2	6%	0	0%	
Normal-like	3	9%	4	13%	

*QT, brazo quimioterapéutico; TE, brazo terapia endocrina

Asociación de la expresión génica con la sensibilidad al tratamiento

- 5 Para comprender la biología asociada a la sensibilidad a quimioterapia o a terapia endocrina en la enfermedad HR+/HER2-, investigamos la asociación entre la expresión de 543 genes relacionados con el cáncer de mama y la respuesta de Miller y Payne en cada grupo de tratamiento. La alta expresión de 70 (12,9 %) y 17 (3,1 %) genes estaba significativamente relacionada ($P < 0,05$ no corregido para múltiples comparaciones) con la respuesta después de terapia endocrina y quimioterapia, respectivamente. La lista de genes asociados a la respuesta a la terapia endocrina se enriqueció en los siguientes procesos biológicos: vascularización (p. ej., AKT1 y catenina beta 1), desarrollo de los conductos (p. ej., FOXA1 y gremlin 1) y crecimiento
- 10

celular (p. ej., receptor de andrógenos y receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1). Por otro lado, la lista de genes asociados a la respuesta a la quimioterapia se enriqueció en el ciclo celular (p. ej., EXO1 y MKI67) y la matriz extracelular (p. ej., netrina 4 y trombospondina 1). A continuación, se evaluó la interacción entre las expresiones de cada gen con la respuesta a la terapia (terapia endocrina frente a quimioterapia). Cabe destacar que 41 de los 70 genes asociados a la respuesta a la terapia endocrina y 8 de los 17 genes asociados a la respuesta a la quimioterapia mostraron una interacción significativa con el tratamiento ($P < 0,05$ no corregido en múltiples comparaciones). Por consiguiente, los factores biológicos asociados a la sensibilidad endocrina parecían estar asociados también a la resistencia a quimioterapia, y viceversa. De hecho, se observó un patrón inverso global entre la expresión de la mayoría de los genes y la respuesta al tratamiento (**Fig. 1A**).

Para comprender mejor los factores biológicos asociados a la respuesta al tratamiento, evaluamos la media de la expresión de los genes asociados a una alta sensibilidad a terapia endocrina, pero baja a quimioterapia o una baja sensibilidad a terapia endocrina, pero alta a quimioterapia, en 1034 tumores primarios que representan todos los subtipos moleculares intrínsecos del cáncer de mama (**Fig. 1B**). Los resultados revelaron que la biología asociada a la sensibilidad a la quimioterapia y a la terapia endocrina se basa principalmente en la biología Luminal A (es decir, alta sensibilidad a la terapia endocrina, pero baja a la quimioterapia) frente a la biología Basal-like (es decir, baja sensibilidad a terapia endocrina, pero alta a quimioterapia).

25 Desarrollo de un CES basado en PAM50

Reflejar las diferencias relativas entre la biología Luminal A y la Basal-like en HR+/HER2- podría ayudar a predecir mejor la sensibilidad a terapia endocrina y a quimioterapia. Para reflejar este estado biológico en cada tumor, hemos obtenido, a partir del algoritmo de clasificación de PAM50, los coeficientes de correlación (CC) de cada muestra a los centroides PAM50 del subtipo Luminal A y al Basal-like y, a continuación, hemos restado los 2 valores para obtener el índice quimioendocrino ($CES = CC \text{ a Luminal A} - CC \text{ a Basal-like}$). De tal manera, las muestras con una puntuación positiva presentaban una mayor sensibilidad a la terapia endocrina que a quimioterapia, mientras que las muestras con una puntuación negativa presentaban una mayor sensibilidad a la quimioterapia (CES-C) que a la terapia endocrina (CES-E) (**Fig. 1C**). A partir de los resultados con muestras del ensayo GEICAM 2006-03 se

determinaron puntos de corte basados en terciles (grupo CES-E frente a CES incierto [CES-U], punto de corte = 0,70; grupo CES-U frente a CES-C, punto de corte = 0,30). La interacción del índice CES (como variable continua) con el tratamiento en el ensayo GEICAM 2006-03 proporciona cierta evidencia de asociación (P = 0,059).

5

Conjunto de datos basado en MDACC

10 Evaluamos un conjunto de datos combinados de 272 pacientes con enfermedad HR+/HER2- tratada con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas/taxanos en varios ensayos con terapias neoadyuvantes (**Tabla 2**).

15 **Tabla 2.** Características clínico-patológicas y distribución de subtipos en los 4 grupos de contraste*.

	MDACC		Málaga		Marsden		Edinburgh	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Tratamiento	QT		QT		TE		TE	
N	272		180		103		120	
HER2 status[‡]								
HER2-negativo	272	100%	180	100%	89	86%	31	69%
HER2-positivo	0	0%	0	0%	14	14%	14	31%
Edad (media)	50.1		50.0		53.7		76.1	
Estado menopáusico								
Pre-menopáusico	ND		108	60%	0	0%	0	0%
Post-menopáusico	ND		72	40%	103	100%	120	100%
Estadio tumoral								
T0-T1	19	7%	18	10%	60	58%	10	9%
T2	142	52%	115	67%	43	42%	63	55%
T3-T4	111	41%	39	23%	43	42%	63	55%
Ganglios								
N0	96	35%	67	37%	61	59%	86	72%
N1	133	49%	61	34%	39	38%	34	28%
N2-N3	43	16%	52	29%	3	3%	34	28%
Grado								
G1	28	11%	27	16%	15	15%	13	11%
G2	136	53%	96	57%	63	62%	82	68%
G3	91	36%	46	27%	24	23%	25	21%
TE índice de respuesta[§]	ND		ND		53%		72%	
QT índice de respuesta								
RpC mama/axila	8.8%		6.7%		ND		ND	

PAM50

Luminal A	141	52%	54	30%	37	36%	-	-
Luminal B	102	38%	105	58%	20	19%	-	-
HER2-E	6	2%	7	4%	12	12%	-	-
Basal-like	7	2%	14	8%	4	4%	-	-
Normal-like	16	6%	-	-	30	29%	-	-

*, TE, Terapia Endocrina; QT, Quimioterapia. †, En el conjunto de datos Edinburgh hay 75 pacientes sin determinación del estado clínico de Her2. § La definición de respuesta a TE es distinta entre los conjuntos Marsden y Edinburgh. La respuesta clínica tumoral (respuesta completa y parcial frente a una enfermedad estable y progresiva) se ha utilizado como punto final en el conjunto Marsden. La respuesta se evaluó mediante ecografía en el conjunto Edinburgh. La respuesta clínica tumoral se definió como disminución del volumen tumoral por lo menos del 70% tras 90 días de tratamiento

En este conjunto de datos, el 51,5 %, 25,8 % y 22,7 % de las muestras fueron identificadas como CES-E, CES-U y CES-C, respectivamente. Las tasas de RpC en los grupos CES-E, CES-U y CES-C fueron del 2,4 %, 9,0 % y 23,7 %, respectivamente ($P < 0,0001$), y se observó que eran similares, aunque se eliminan los tumores no luminales (2,2 %, 8,8 % y 25,0 %). La capacidad predictiva de la quimioterapia neoadyuvante del CES fue independiente de las variables clínico-patológicas y del subtipo intrínseco (**Tabla 3 y Tabla S1**). Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó la carga tumoral residual como variable (**Tablas S2-S3**).

Tabla 3. Asociación de CES con sensibilidad a quimioterapia en el conjunto de datos basado en MDACC.

Firmas	Análisis Univariante					Análisis Multivariante				
	N	Índice R _{PC}	OR	Inferior 95%	Superior 95%	Superior p-valor	OR	Inferior 95%	Superior 95%	Superior p-valor
Edad (variable cont.)	-	-	1.0	0.93	1.02	0.251	1.0	0.92	1.02	0.205
Tamaño tumoral										
T0-T2	153	8%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
T3-T4	107	9%	1.1	0.47	2.63	0.813	0.6	0.22	1.70	0.341
Ganglios										
N0	96	7%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
N1	125	9%	1.2	0.46	3.29	0.685	0.9	0.30	2.78	0.882
N2-3	39	13%	1.9	0.56	6.29	0.312	1.0	0.24	4.51	0.965
Grado										
1	26	4%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
2	130	4%	1.0	0.11	8.93	1.000	0.7	0.07	6.88	0.753
3	89	17%	5.1	0.64	40.34	0.125	1.8	0.18	18.42	0.608
PAM50										
Luminal A	134	3%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
Luminal B	99	15%	5.8	1.86	18.08	0.002	1.2	0.25	6.28	0.792
HER2-E	6	0%	0.0	-	-	0.989	0.0	-	-	0.991
Basal-like	7	29%	13.0	1.91	88.50	0.009	0.4	0.02	9.97	0.586
Normal-like	14	14%	5.4	0.90	32.69	0.065	1.7	0.23	12.75	0.602
CES										
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-	-	-	-	-
CES-U	67	9%	4.3	1.04	17.75	0.044	-	-	-	-
CES-C	59	24%	13.6	3.73	49.46	<0.001	-	-	-	-
CES (variable cont.)	-	-	0.2	0.08	0.40	<0.001	0.2	0.03	0.77	0.022

Tabla S1. Asociación de CES con sensibilidad a quimioterapia (medida como RpC) en el conjunto de datos basado en MDACC.

Firmas	N	Índice RpC	Análisis Univariante			Análisis Multivariante				
			OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
Edad (variable cont.)	-	-	1.0	0.93	1.02	0.251	1.0	0.91	1.01	0.776
Tamaño tumoral										
T0-T2	153	8%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
T3-T4	107	9%	1.1	0.47	2.63	0.813	0.7	0.26	1.99	0.540
Ganglios										
N0	96	7%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
N1	125	9%	1.2	0.46	3.29	0.685	0.9	0.31	2.70	0.861
N2-3	39	13%	1.9	0.56	6.29	0.312	0.9	0.20	3.81	0.846
Grado										
1	26	4%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
2	130	4%	1.0	0.11	8.93	1.000	0.8	0.09	7.91	0.866
3	89	17%	5.1	0.64	40.34	0.125	2.43	0.25	24.13	0.447
ROR-P										
Bajo	75	5%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
Med	133	6%	1.1	0.33	3.91	0.840	0.5	0.11	2.08	0.333
High	52	21%	4.8	1.42	15.93	0.011	0.7	0.12	3.61	0.642
CES										
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-	-	-	-	-
CES-U	67	9%	4.3	1.04	17.75	0.044	-	-	-	-
CES-C	59	24%	13.6	3.73	49.46	<0.001	-	-	-	-
CES (variable cont.)	-	-	0.2	0.08	0.40	<0.001	0.2	0.07	0.68	0.008

Tabla S2. Asociación de CES con sensibilidad a quimioterapia (medida como carga tumoral residual [RCB]) en el conjunto de datos basado en MDACC. Modelo A

Firmas	Análisis Univariante					Análisis Multivariante				
	N	Índice R _{PC}	OR	Inferior 95%	Superior 95%	Superior p-valor	OR	Inferior 95%	Superior 95%	Superior p-valor
Edad (variable cont.)	-	-	1.0	0.93	1.02	0.251	1.0	0.91	1.01	0.776
Tamaño tumoral										
T0-T2	153	8%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
T3-T4	107	9%	1.1	0.47	2.63	0.813	0.7	0.26	1.99	0.540
Ganglios										
N0	96	7%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
N1	125	9%	1.2	0.46	3.29	0.685	0.9	0.31	2.70	0.861
N2-3	39	13%	1.9	0.56	6.29	0.312	0.9	0.20	3.81	0.846
Grado										
1	26	4%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
2	130	4%	1.0	0.11	8.93	1.000	0.8	0.09	7.91	0.866
3	89	17%	5.1	0.64	40.34	0.125	2.43	0.25	24.13	0.447
ROR-P										
Bajo	75	5%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
Med	133	6%	1.1	0.33	3.91	0.840	0.5	0.11	2.08	0.333
High	52	21%	4.8	1.42	15.93	0.011	0.7	0.12	3.61	0.642
CES										
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-	-	-	-	-
CES-U	67	9%	4.3	1.04	17.75	0.044	-	-	-	-
CES-C	59	24%	13.6	3.73	49.46	<0.001	-	-	-	-
CES (variable cont.)	-	-	0.2	0.08	0.40	<0.001	0.2	0.07	0.68	0.008

Tabla S3. Asociación de CES a la sensibilidad a la quimioterapia (medida como carga tumoral residual [RCB]) en el conjunto de datos basado en MDACC. Modelo B

Firmas	Análisis Univariante					Análisis Multivariante				
	N	Índice CTR 0/1	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
Edad (variable cont.)	-	-	1.0	0.94	1.01	0.166	1.0	0.92	1.0	0.078
Tamaño tumoral										
T0-T2	127	18%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
T3-T4	82	13%	0.7	0.0.34	1.58	0.424	0.6	0.25	1.60	0.330
Ganglios										
N0	82	22%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
N1	105	12%	0.5	0.23	1.1	0.084	0.3	0.13	0.81	0.016
N2-3	32	13%	0.5	0.16	1.6	0.260	0.3	0.06	1.16	0.078
Grado										
1	24	4%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
2	102	14%	3.3	0.41	26.0	0.266	3.0	0.35	25.90	0.314
3	71	24%	7.2	0.91	57.6	0.061	5.6	0.60	51.47	0.130
Subtipo										
Luminal A	115	10%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
Luminal B	80	21%	2.3	1.04	5.17	0.040	0.6	0.16	2.48	0.537
HER2-E	6	17%	1.7	0.18	15.94	0.635	0.4	0.02	7.71	0.566
Basal-like	4	25%	2.9	0.28	29.73	0.380	0.4	0.02	8.40	0.522
Normal-like	14	29%	3.4	0.93	12.70	0.064	1.4	0.28	7.01	0.687
CES										
CES-E	115	10%	1.0	-	-	-	-	-	-	-
CES-U	48	15%	1.5	0.61	3.91	0.358	-	-	-	-
CES-C	45	31%	3.9	1.63	9.25	0.002	-	-	-	-
CES (variable cont.)	-	-	0.34	0.16	0.71	0.004	0.2	0.05	0.88	0.032

En este conjunto de datos se describieron anteriormente siete firmas genéticas basadas en la expresión (es decir, índice de proliferación de PAM50, ROR-P, índice de grado genómico, índice SET, quimiopredicador, DLDA30 y predicador de carga tumoral residual [RCB]) (Hatzis C, *et al.* Jama. 2011, 305:1873-1881). Además, hemos aplicado una versión basada en microarrays del índice de recurrencia Oncotype DX (Fan C, *et al.* New England Journal of Medicine. 2006, 355:560-569; Paik S, *et al.* New England Journal of Medicine. 2004, 351:2817-2826). Aquí, evaluamos la capacidad de

CES en predecir RpC en la enfermedad HR+/HER2- en comparación con estas siete firmas genéticas. Curiosamente, el CES proporcionó la mayor aROC (**Tabla S4-S12**) bien como variable continua (aROC = 0,770) o como categorías de grupo (aROC = 0,765). El segundo perfil más predictivo fue el predictor RCB (aROC = 0,740). Cabe señalar que el predictor RCB se obtuvo utilizando 165 de 272 muestras (60,7 %) HR+/HER2- de este conjunto de datos (es decir, el conjunto de datos de entrenamiento). Cuando no se consideraron estas muestras de entrenamiento, CES mostró un mayor rendimiento, bien como variable continua (aROC = 0,805) o como categorías de grupo (aROC = 0,786) que el predictor RCB (aROC = 0,640).

Tabla S4. Asociación univariante de CES y varias firmas con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- en el conjunto de datos basado en MDACC.

Firmas	N	Índice RpC	AUC	Análisis Univariante			
				OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES							
CES-E	134	2%	0.765	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%		4.3	1.04	17.75	0.044
CES-C	59	24%		13.6	3.73	49.46	<0.001
CES	-	-	0.770	0.17	0.08	0.40	<0.001
GHI							
GHI	-	-	0.648	1.31	1.06	1.63	0.013
GHI PROLIF	-	-	0.663	1.33	1.08	1.62	0.007
ROR-P							
Bajo	75	5%	0.659	1.0	-	-	-
Med	133	6%		1.1	0.33	3.91	0.840
Alto	52	21%		4.8	1.42	15.93	0.011
PAM50 PROLIF	-	-	0.700	0.2	0.08	0.40	<0.001
CHEMOPRED							
RxInsensitive	159	6%	0.597	1.0	-	-	-
RxSensitive	101	13%		2.2	0.93	5.23	0.074
GGI							
Bajo	126	3%	0.670	1.0	-	-	-
Alto	134	14%		5.0	1.66	15.26	0.004
SET							
ALTO	21	5%	0.525	1.0	-	-	-
INTERM	35	9%		1.9	0.18	19.29	0.597
BAJO	204	9%		2.1	0.26	16.16	0.494

Firmas	N	Índice RpC	AUC	Análisis Univariante			
				OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CTRPRED							
CTR II/III	159	3%	0.740	1.0	-	-	-
CTR 0/I	101	19%		9.0	2.96	27.27	<0.001
DLDA30							
RD	254	2%	0.511	1.0	-	-	-
RpC	6	17%		2.1	0.24	18.87	0.504

5 **Tabla S5.** Asociación de CES y del perfil de proliferación de PAM50 con sensibilidad a la quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Firmas	N	Índice RpC	Análisis Bivariante			
			OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	4.6	1.02	20.99	0.047
CES-C	59	24%	15.8	2.93	85.36	0.001
PAM50 PROLIF	-	-	0.82	0.21	3.28	0.783

Tabla S6. Asociación de CES y del perfil CHEMOPRED con sensibilidad a la quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Firmas	N	Índice RpC	Análisis Bivariante			
			OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	5.0	1.18	20.83	0.029
CES-C	59	24%	15.3	4.12	56.72	<0.001
CHEMOPRED						
RxInsensitive	159	6%	1.00	-	-	-
RxSensitive	101	13%	2.73	1.09	6.87	0.032

Tabla S7. Asociación de CES y del componente de proliferación del Genomic Health Index (GHI; índice de recurrencia Oncotype DX) con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	5.5	1.19	25.18	0.029
CES-C	59	24%	22.7	3.93	131.45	<0.001
GHI Proliferación	-	-	0.87	0.65	1.18	0.387

5

Tabla S8. Asociación de CES y del perfil del Genomic Grade Index (GGI) con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	3.7	0.79	17.16	0.097
CES-C	59	24%	10.6	2.15	52.00	0.004
GGI						
Bajo	126	3%	1.00	-	-	-
Alto	134	14%	1.43	0.35	5.77	0.615

10

Tabla S9. Asociación de CES y del SET Index Signature con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	4.7	1.09	19.85	0.038
CES-C	59	24%	15.3	3.99	59.02	<0.001
SET						
ALTO	21	5%	1.00	-	-	-
INTERM	35	9%	2.37	0.20	27.94	0.494

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
BAJO	204	9%	1.20	0.14	10.62	0.868

Tabla S10. Asociación de CES y de la firma RCBPRED con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	4.3	1.01	18.35	0.048
CES-C	59	24%	11.8	3.14	44.47	<0.001
CTRPRED						
CTR II/III	159	3%	1.00	-	-	-
CTR 0/I	101	19%	7.97	2.55	24.94	<0.001

5

Tabla S11. Asociación de CES y de la firma DLDA30 con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	4.3	1.04	17.83	0.044
CES-C	59	24%	13.9	3.79	51.25	<0.001
DLDA30						
RD	254	2%	1.00	-	-	-
RpC	6	17%	0.72	0.08	6.75	0.773

10

Tabla S12. Asociación de CES y de la firma ROR-P con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos basado en MDACC.

Análisis Bivariante

Firmas	N	Índice RpC	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES						
CES-E	134	2%	1.0	-	-	-
CES-U	67	9%	5.38	1.15	25.06	0.032
CES-C	59	24%	17.29	3.22	92.88	<0.001
ROR-P						
Bajo	75	5%	1.00	-	-	-
Med	133	6%	0.44	0.10	1.86	0.264
Alto	52	21%	0.60	0.12	3.12	0.546

Conjunto de datos Málaga

5 Evaluamos un conjunto de datos de 180 pacientes con enfermedad HR+/HER2-
tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas/taxanos (**Tabla 2**).
En este conjunto de datos, el 46,1%, 16,1% y 37,8% de las muestras fueron
identificadas como CES-E, CES-U y CES-C, respectivamente. Las tasas de RpC y
RCB 0/1 en los grupos de CES-E, CES-U y CES-C fueron del 2,4 %/9,6 %,
10 3,4 %/17,2 % y 13,2 %/30,9 %, respectivamente (P = 0,022 y 0,004).

Para evaluar la capacidad del CES para predecir la respuesta a quimioterapia,
independientemente de las variables clínico-patológicas conocidas y del subtipo
intrínseco, realizamos un análisis de regresión logística multivariante utilizando RCB
15 (0/1 frente a 2/3) como variable, ya que solo 12 muestras alcanzaron una RCB 0 (es
decir, RpC) en este conjunto de datos. Los resultados revelaron que el CES
proporcionaba información predictiva independiente, por encima del subtipo intrínseco
(**Tabla 4**), de Ki-67 determinado por IHQ (**Tabla S13**) y del índice de ROR PAM50
(**Tabla S14**). El aROC de CES para predecir una RCB 0/1 fue 0,746. Por último, se
20 observó una asociación significativa entre el CES y los datos de respuesta de Miller y
Payne (**Fig. S1**).

25 **Tabla 4.** Asociación de CES con sensibilidad a quimioterapia en el conjunto de datos
Málaga.

Firmas	N	Índice RpC	Análisis Univariante				Análisis Multivariante			
			OR	Inferior 95%	Superior 95%	p- valor	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
Edad (variable cont.)	-	-	1.0	0.95	1.02	0.331	1.0	0.96	1.07	0.599
Tamaño tumoral										
T0-T2	133	22%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
T3-T4	39	10%	0.4	0.13	1.25	0.116	0.4	0.09	1.90	0.260
Grado										
1	27	7%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
2	96	16%	2.3	0.50	10.82	0.286	1.6	0.26	9.31	0.625
3	46	35%	6.7	1.40	31.82	0.017	3.0	0.40	23.34	0.283
PAM50										
Luminal A	54	9%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
Luminal B	105	20%	2.4	0.87	6.91	0.090	0.9	0.19	4.34	0.905
HER2-E	7	14%	1.6	0.16	16.43	0.677	0.1	0.00	3.19	0.188
Basal-like	14	50%	9.8	2.43	39.51	0.001	0.1	0.00	3.40	0.214
CES										
CES-E	83	10%	1.0	-	-	-	-	-	-	-
CES-U	29	17%	2.0	0.58	6.54	0.277	-	-	-	-
CES-C	68	31%	4.2	1.72	10.22	0.002	-	-	-	-
CES ((variable cont.)	-	-	0.2	0.09	0.44	<0.001	0.2	0.07	0.76	0.016

Tabla S13. Asociación de CES y Ki-67 determinado mediante IHQ con sensibilidad a quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos Málaga.

Análisis Bivariante

Firmas	N	Índice CTR 0/1	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES	-	-	0.46	0.23	0.89	0.022
Ki67 IHQ	-	-	1.02	0.99	1.04	0.194

Tabla S14. Asociación de CES y del ROR PAM50 con sensibilidad a la quimioterapia en la enfermedad HR+/HER2- del conjunto de datos de Málaga.

Análisis Bivariante						
Firmas	N	Índice CTR 0/1	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
CES	-	-	0.27	0.14	0.51	<0.001
PAM50 ROR	-	-	0.98	0.95	1.02	0.308

5

Conjunto de datos basado en Marsden: CES y sensibilidad a terapia endocrina

Evaluamos un conjunto de datos de 103 pacientes postmenopáusicas con enfermedad HR+ tratada con anastrozol durante 16 semanas con terapia neoadyuvante (**Tabla 2**).

10

En este conjunto de datos, el 23,5 %, 34,3 % y 42,2 % de las muestras fueron identificadas como CES-E, CES-U y CES-C, respectivamente. La respuesta tumoral clínica (respuesta completa y parcial frente a enfermedad estable y progresiva) se utilizó como variable. En este conjunto de datos no se observó ninguna RpC. Las tasas de respuesta tumoral clínica en los grupos de CES-E, CES-U y CES-C fueron del 75,0 %, 48,6 % y 44,2 %, respectivamente (P = 0,043). CES fue la única variable con una asociación significativa a la respuesta (**Tabla S15**), independientemente del estado de HER2 (**Tablas S15-S16**).

15

20

Tabla S15. Asociación de CES con sensibilidad a terapia endocrina en el conjunto de datos Marsden (n = 103).

Firmas	N	Índice respuesta	Análisis Univariante				Análisis Bivariante			
			OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor	OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
Edad (variable cont.)	103	-	1.0	0.95	1.04	0.865				
Tamaño tumoral										
T0-T2	60	52%	1.0	-	-	-				
T3-T4	43	55%	1.0	0.47	2.29	0.925				
BRAZO										
Brazo B	46	48%	1.0	-	-	-				
Brazo C	57	56%	1.3	0.53	2.95	0.467				
Grado										
1	15	53%	1.0	-	-	-				
2	63	52%	1.0	0.32	3.20	0.965				
3	24	46%	0.8	0.21	2.97	0.740				
HER2 status										
Negativo	89	56%	1.0	-	-	-	1.0	-	-	-
Positivo	25	28%	0.3	0.07	0.98	0.058	0.4	0.10	1.40	0.170
PAM50										
Basal-like	4	50%	1.0	-	-	-				
Luminal A	37	65%	2.0	0.22	18.41	0.510				
Luminal B	20	40%	0.67	0.07	6.50	0.710				
HER2-E	12	25%	0.38	0.03	3.78	0.361				
Normal-like	30	57%	1.31	0.14	12.12	0.801				
CES (variable cont.)	103	-	2.9	1.34	6.55	0.009	2.4	1.08	5.50	0.036

Tabla S16. Asociación de CES con sensibilidad a terapia endocrina en el conjunto de datos de Marsden en la enfermedad HER2- (n = 89).

Firmas	N	Índice Respuesta	Análisis Univariante			
			OR	Inferior 95%	Superior 95%	p-valor
Edad (variable cont.)	89	-	1.0	0.18	293	0.38
Tamaño tumoral						
T0-T2	54	60%	1.0	-	-	-
T3-T4	35	54%	0.8	0.35	2.00	0.697
BRAZO						
Brazo B	38	50%	1.0	-	-	-
Brazo C	51	60%	1.5	0.62	3.48	0.379
Grado						
1	14	57%	1.0	-	-	-
2	54	59%	1.1	0.32	3.57	0.886
3	20	45%	0.7	0.16	2.69	0.579
PAM50						
Basal-like	4	50%	1.0	-	-	-
Luminal A	35	66%	2.09	0.23	19.39	0.489
Luminal B	17	41%	0.70	0.07	7.00	0.750
HER2-E	7	29%	0.40	0.03	5.32	0.480
Normal-like	26	61%	1.60	0.17	15.16	0.660
CES (variable cont.)	89	-	2.00	0.90	4.89	0.090

5 Conjunto de datos basado en Edinburgo: CES y sensibilidad a terapia endocrina

10 Evaluamos un conjunto de datos de 120 pacientes postmenopáusicas con enfermedad HR+ tratada con letrozol durante al menos 12 semanas con terapia neoadyuvante (**Fig. S2A**). Dos pacientes de 120 alcanzaron una respuesta completa. De forma similar a anteriores resultados, CES como variable continua resultó ser la única variable con una asociación significativa a una reducción $\geq 70\%$ del volumen tumoral antes de 90 días (**Fig. S2B**), incluso en la enfermedad HER2- (**Fig. S2C**).

15 Pronóstico, subtipo intrínseco y sensibilidad a quimioterapia y a terapia endocrina

Para comprender mejor la relación entre el pronóstico, la biología intrínseca y la sensibilidad a quimioterapia y a terapia endocrina, agrupamos los datos de PAM50 de numerosos conjuntos de datos diferentes para obtener un total de 6007 cánceres de mama primarios que representan todos los subtipos (**Fig. 2**). Los resultados revelaron

que en el grupo de ROR bajo, el 94,9 % de los casos se identificaron como CES-E y el 100 % fueron de subtipo Luminal A. En el grupo de ROR alto, el 92,1 % de las muestras se identificaron como CES-C; los subtipos no luminal y Luminal B representaban el 64,3 % y el 35,7 % de los casos de ROR alto/CES-C, respectivamente.

En el grupo de ROR intermedio se observó una alta heterogeneidad. En términos de biología intrínseca, los subtipos Luminal A, Luminal B y no luminal representaban el 44,4 %, 31,5 % y 24,1 %, respectivamente. En términos de sensibilidad a quimioterapia y a terapia endocrina, CES-E, CES-U y CES-C representaban el 40,6 %, 30,3 % y 29,1 %, respectivamente. Según lo previsto, la inmensa mayoría de muestras de ROR intermedio/CES-E (77,3 %) eran de subtipo Luminal A.

Resultados de supervivencia de CES en la enfermedad HR+/ROR intermedio

Para continuar estudiando el valor de CES en la enfermedad HR+/ROR intermedio, hemos evaluado la asociación de CES con los resultados de supervivencia en el cáncer de mama temprano HR+/ROR intermedio en 4 conjuntos de datos independientes de pacientes tratadas sin ninguna terapia sistémica adyuvante (n = 189), solo con tamoxifeno adyuvante (n = 846) o con quimioterapia y terapia endocrina adyuvantes (n = 322 y n = 148). En pacientes con enfermedad con ganglios negativos tratada sin terapia sistémica adyuvante, CES (como variable continua o como categorías de grupo) resultó tener una asociación significativa con la supervivencia sin recidiva distante (**Fig. 3A**). El *hazard ratio* entre los grupos CES-C y CES-E fue 2,68 (intervalo de confianza al 95 % de 0,163-0,858). Se obtuvieron resultados similares en el conjunto de datos donde las pacientes fueron tratadas solo con tamoxifeno adyuvante (**Fig. 3B**).

Sin embargo, el CES (como variable continua o como categorías de grupo) no resultó tener una asociación significativa a los resultados de supervivencia en 2 cohortes independientes de pacientes tratadas con quimioterapia (neo)adyuvante y terapia endocrina (**Fig. 3C y D**).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir si una paciente con cáncer de mama responde a quimioterapia o a terapia endocrina en una muestra aislada de HR+/HER2- de la paciente clasificada en el grupo de ROR intermedio mediante el kit PAM50, cuyo método comprende en:
 - (a) obtener el kit PAM50, el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo intrínseco Luminal A y el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo intrínseco Basal-like, en la muestra aislada, y
 - (b) obtener el índice quimioendocrino (CES) restando el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Basal-like del coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Luminal A;

donde el CES igual o superior a 0,7 indica que dicha paciente responde al tratamiento endocrino (CES-E), y donde el CES igual o inferior a 0,3 indica que dicha paciente responde a la quimioterapia (CES-C).
2. Un método *in vitro* según la reivindicación 1 en el que la muestra aislada es una muestra de biopsia.
3. El uso *in vitro* del CES para predecir si una paciente con cáncer de mama responde a la quimioterapia o al tratamiento endocrino en una muestra aislada de HR+/HER2- de la paciente clasificada en el grupo de ROR intermedio mediante el kit PAM50.
4. El uso *in vitro* según la reivindicación 3 en el que el CES se obtiene restando el coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Basal-like del coeficiente de correlación correspondiente a la muestra clasificada como de subtipo Luminal A, mediante el kit PAM50.
5. El uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 en el que un CES igual o superior a 0,7 indica que dicha paciente es CES-E.
6. El uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 en el que un CES igual o inferior a 0,3 indica que dicha paciente es CES-C.
7. El uso *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en el que la muestra aislada es una muestra de biopsia.

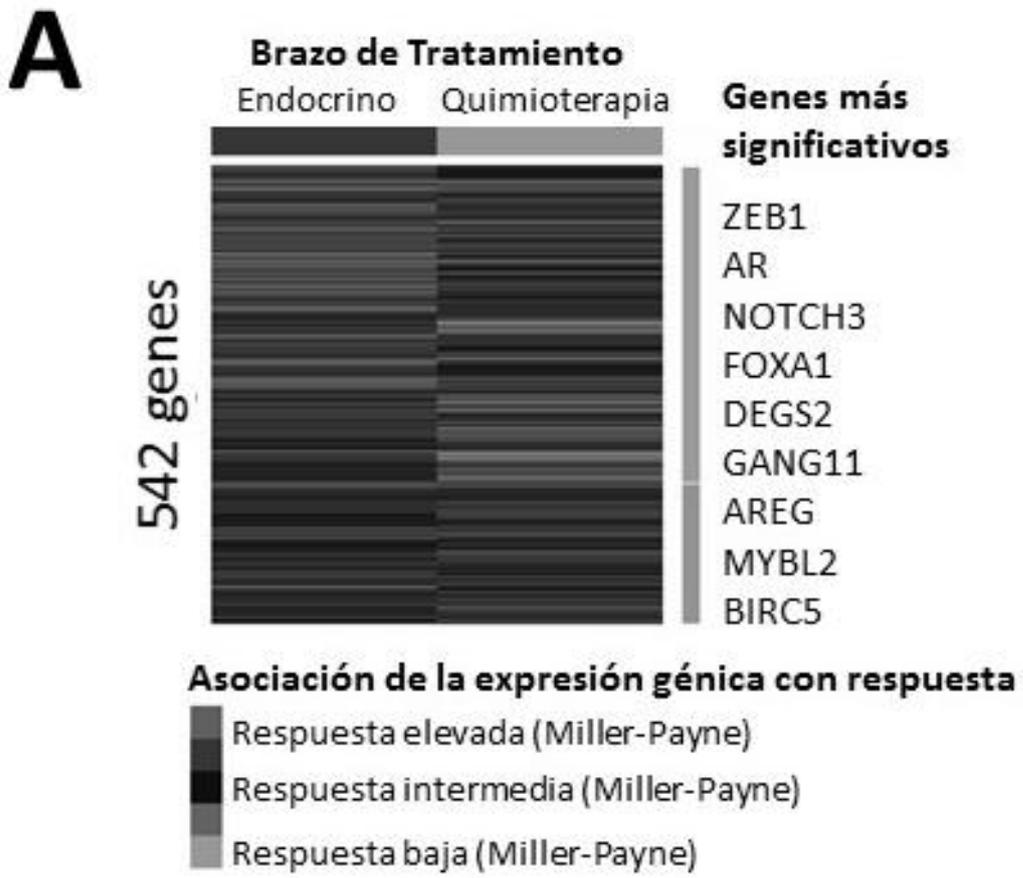


FIG. 1

B

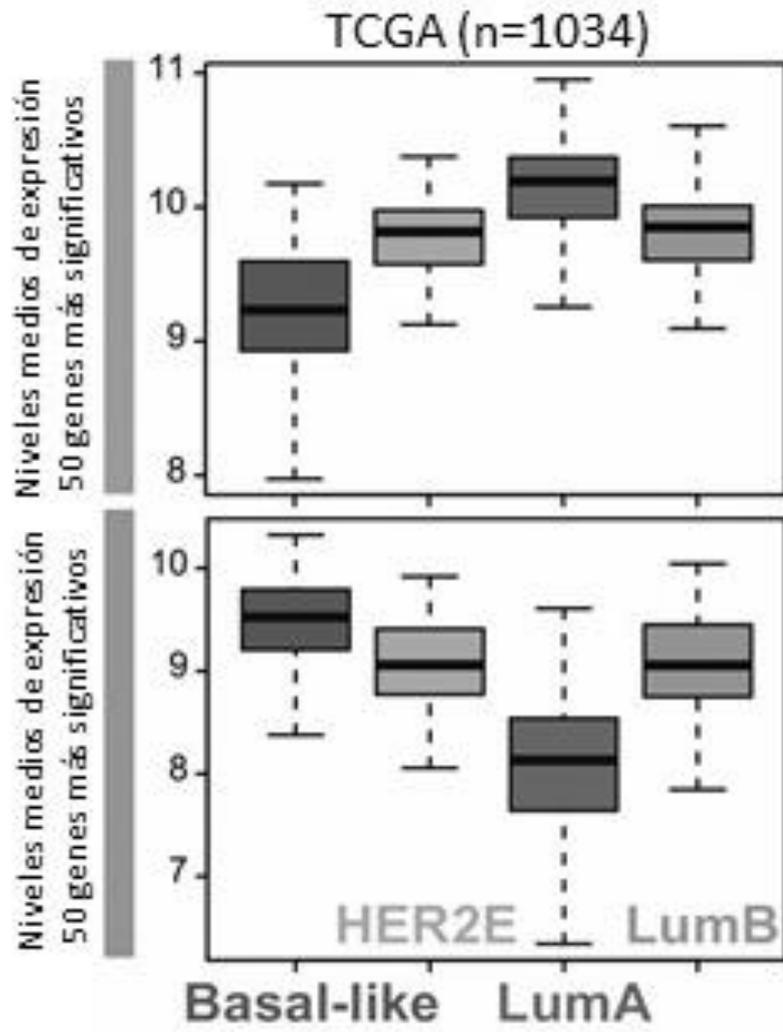
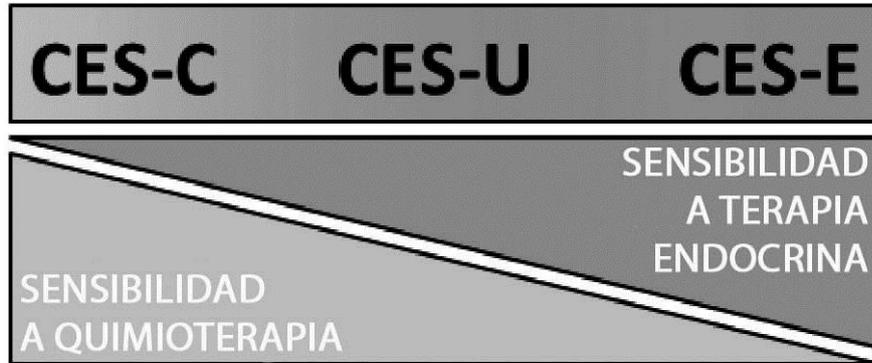


FIG. 1 cont.

C



D

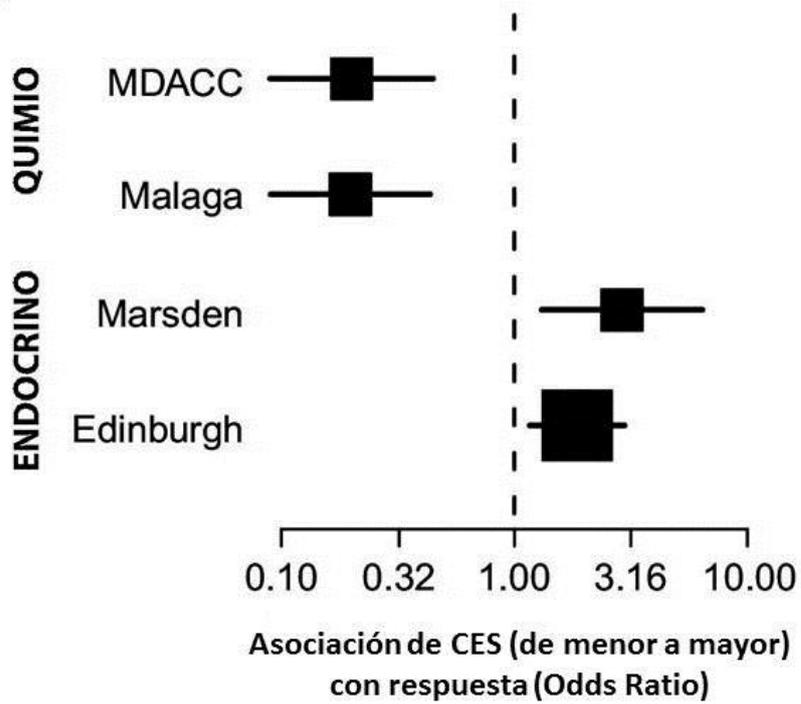


FIG. 1 (cont.)

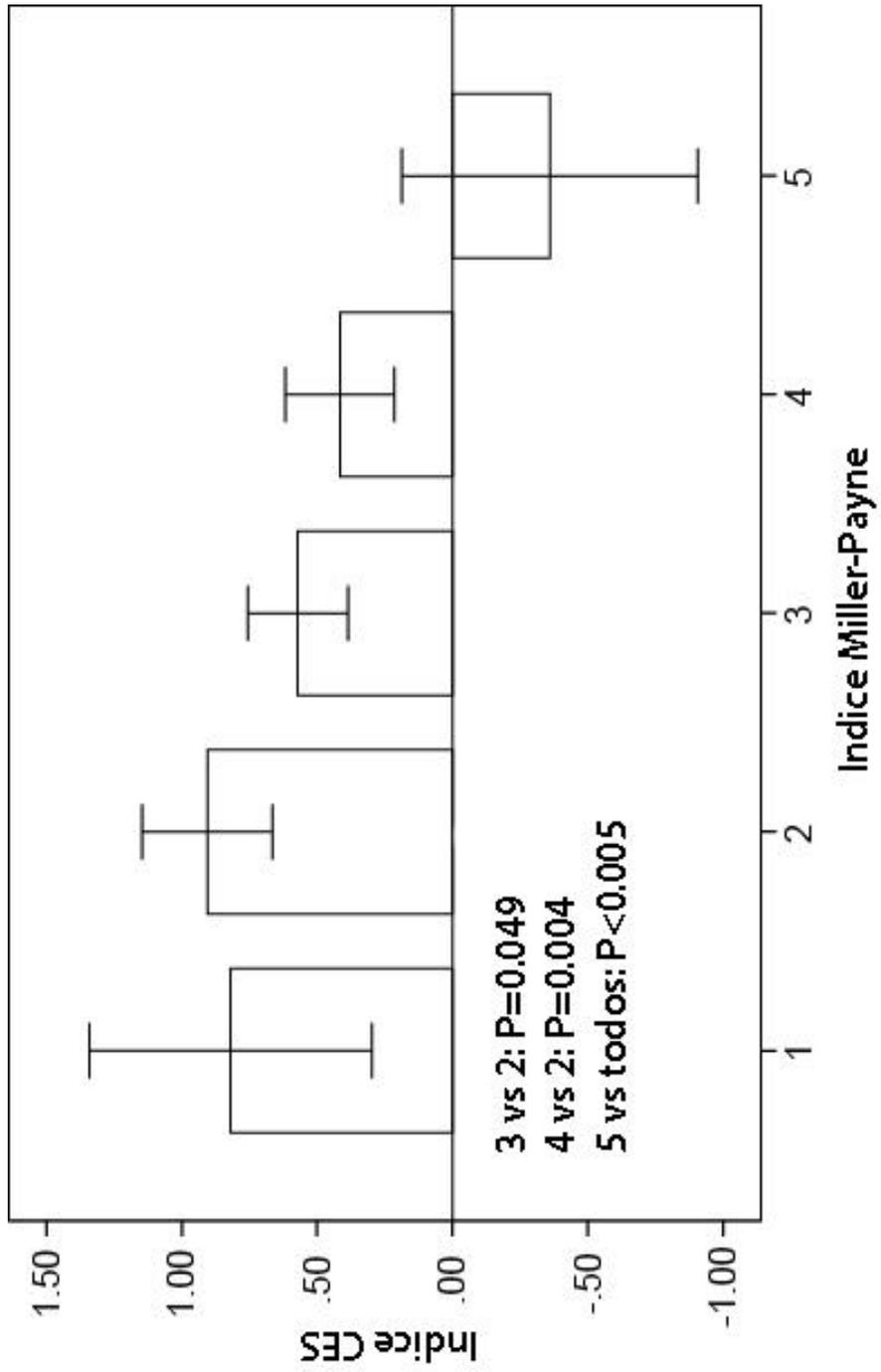


FIG. S1

A

RER	Respuesta Estable Rápida - Reducción del tumor por lo menos del 50% en 45dd y por lo menos del 70% en 90dd
RL	Respuesta Lenta - Reducción del tumor hasta el 50% en 45dd y por lo menos del 70% en 90dd
RP	Respuesta Parcial - Reducción parcial del tumor seguida por enfermedad estable (reducción siempre <70%)
RN	Respuesta Negativa - Aumento o reducción parcial (reducción siempre <50%)
RN-Temp	Respuesta Negativa Temprana - Aumento de tamaño al día 45 y rápida reducción al día 90
RN-Tardía	Respuesta Negativa Tardía - Reducción del tamaño al día 45 seguida por aumento al día 90

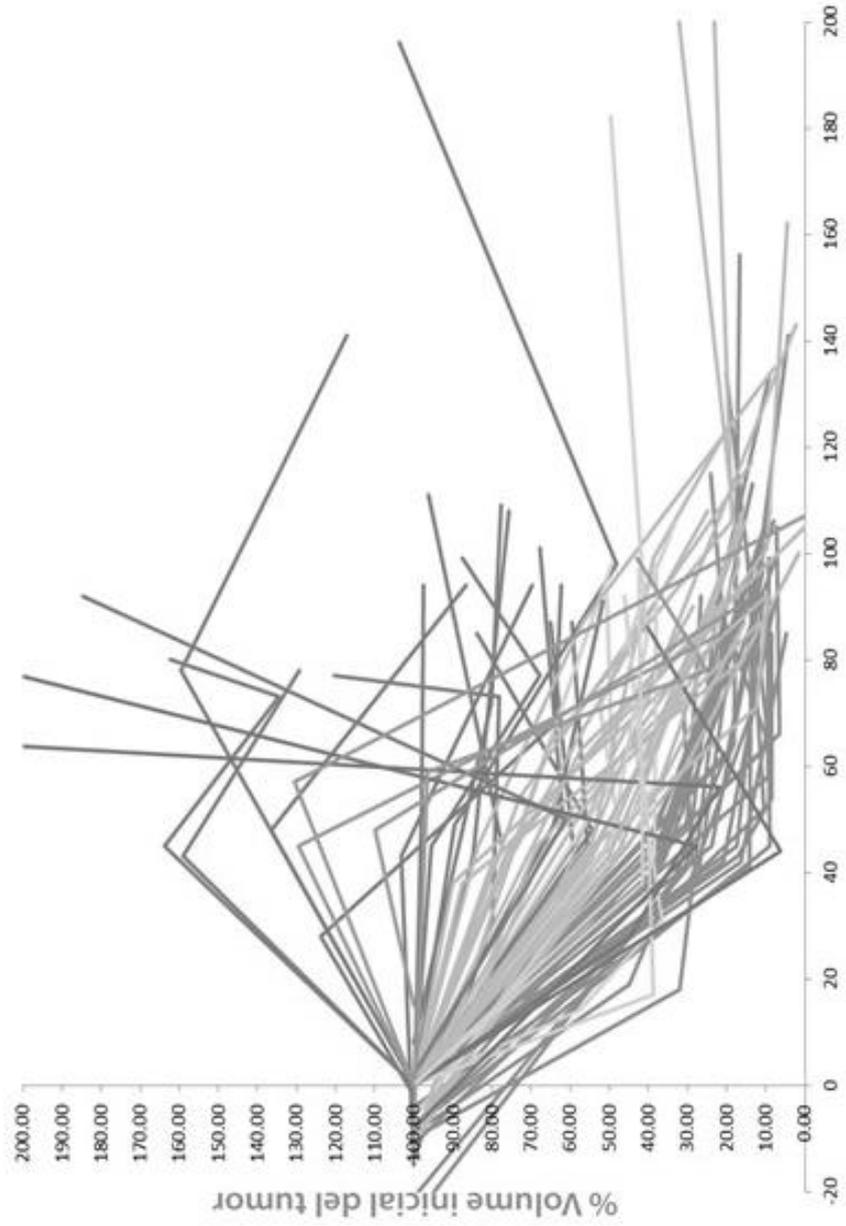


Fig. S2

B

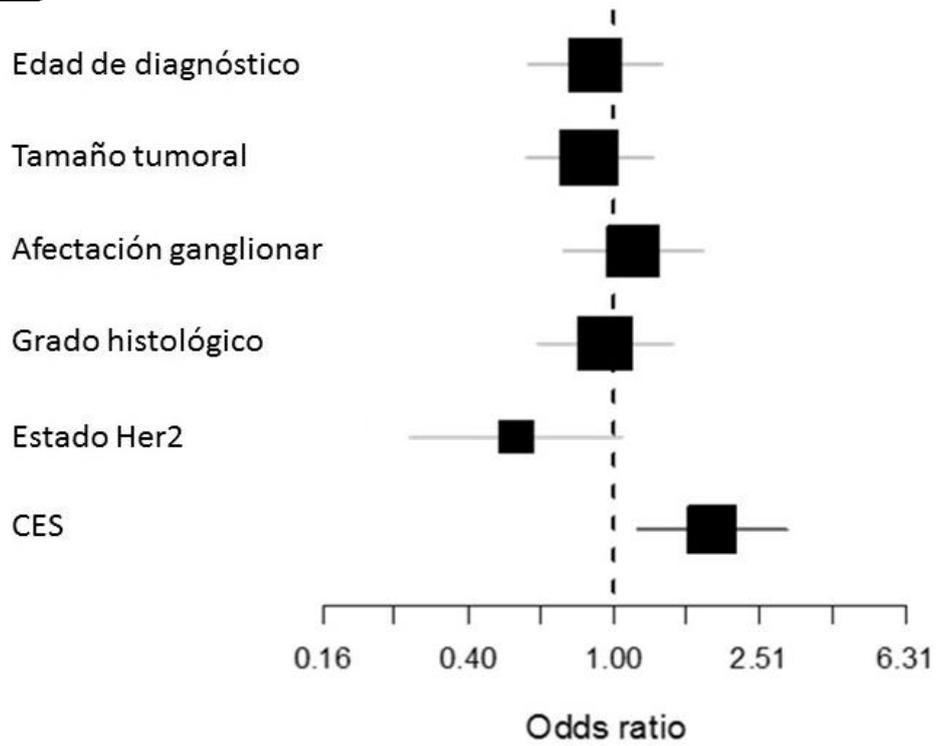


Fig. S2 (cont.)

C

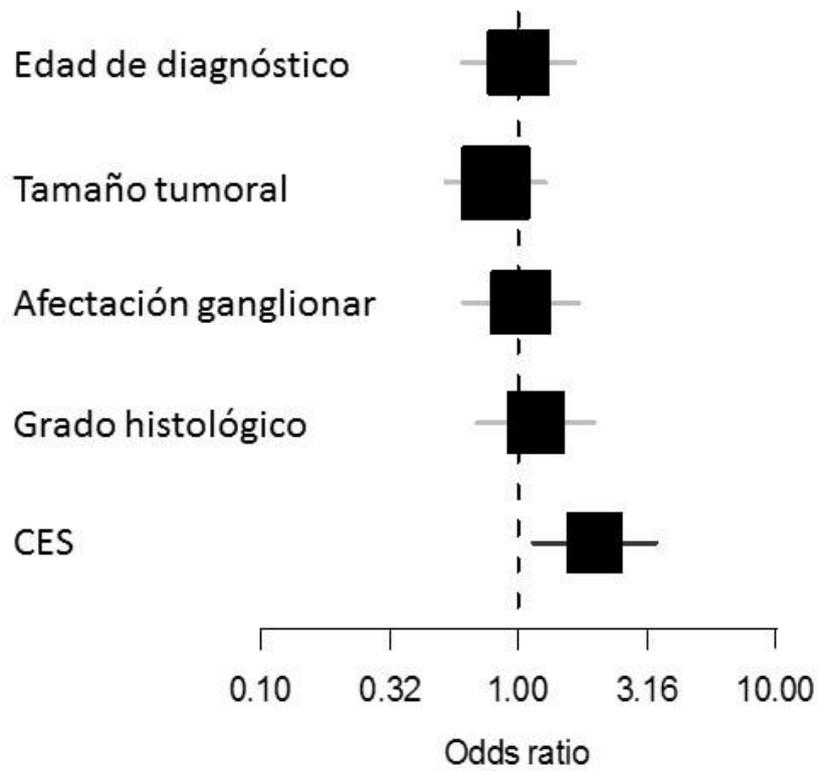


Fig. S2 (cont.)

A

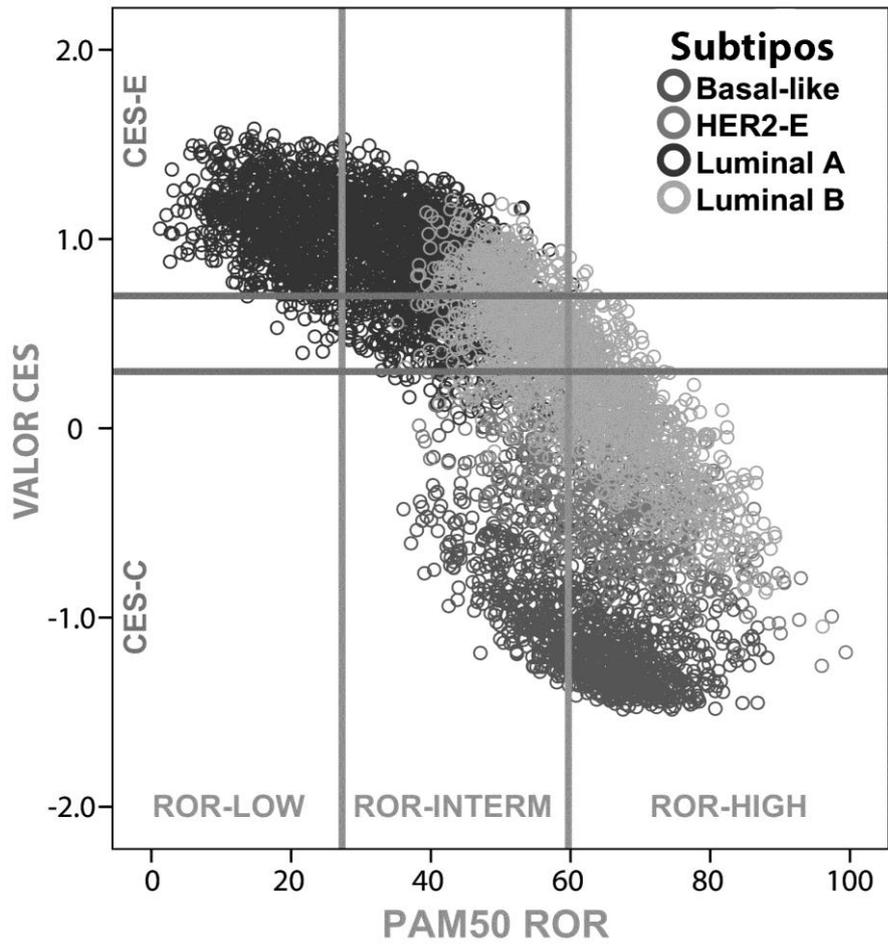


FIG. 2

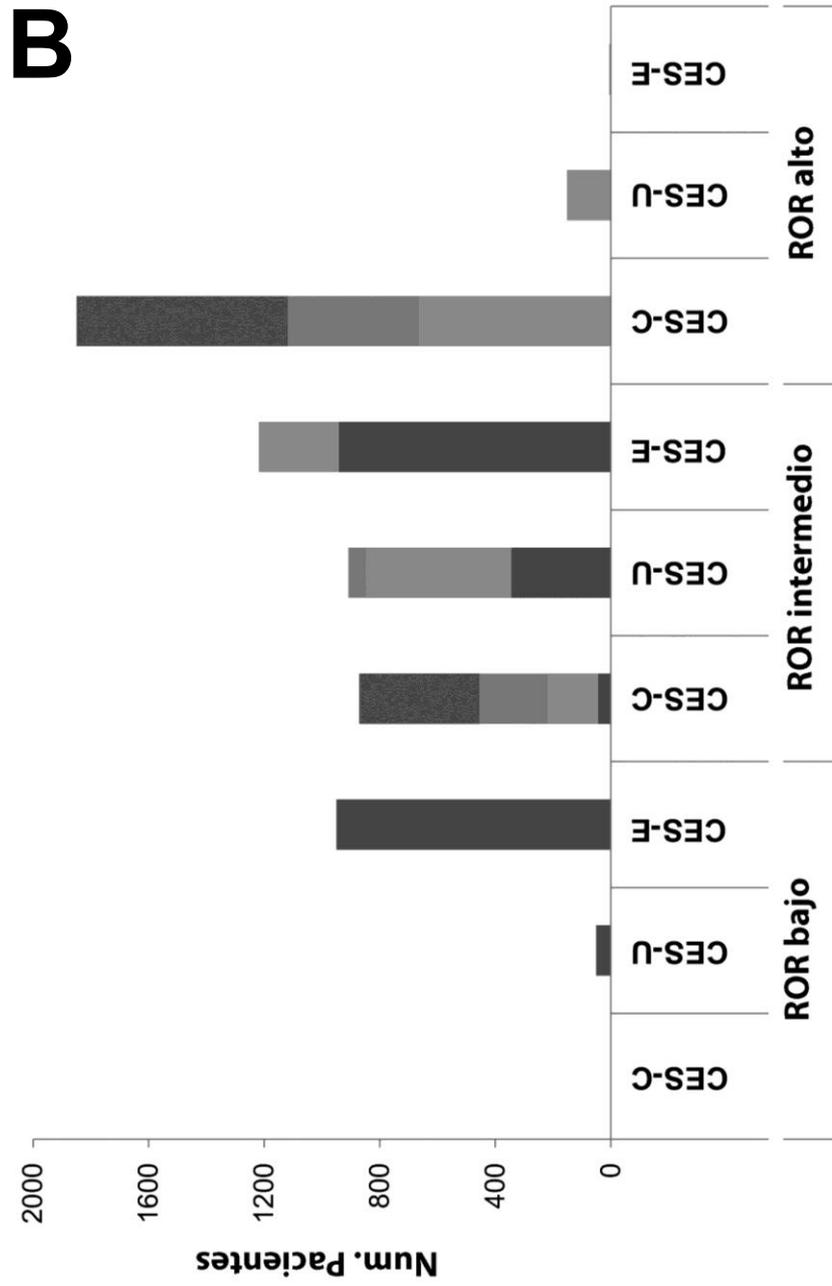


FIG. 2 (cont.)

A

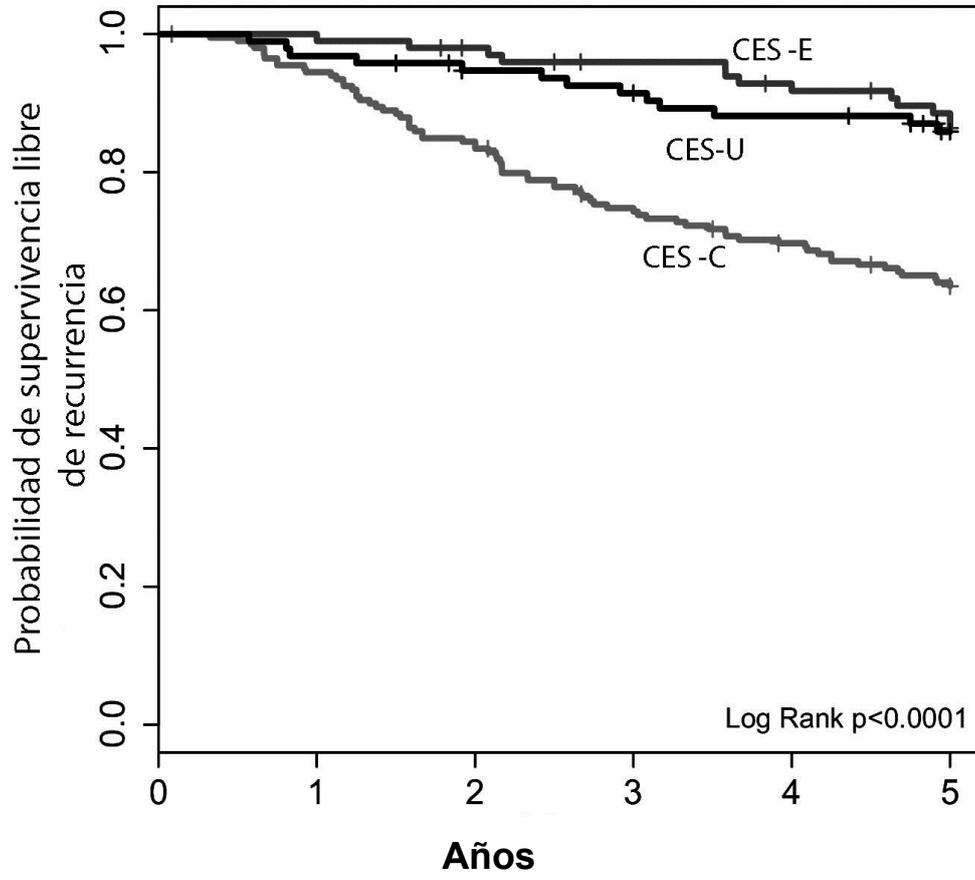


FIG. 3

B

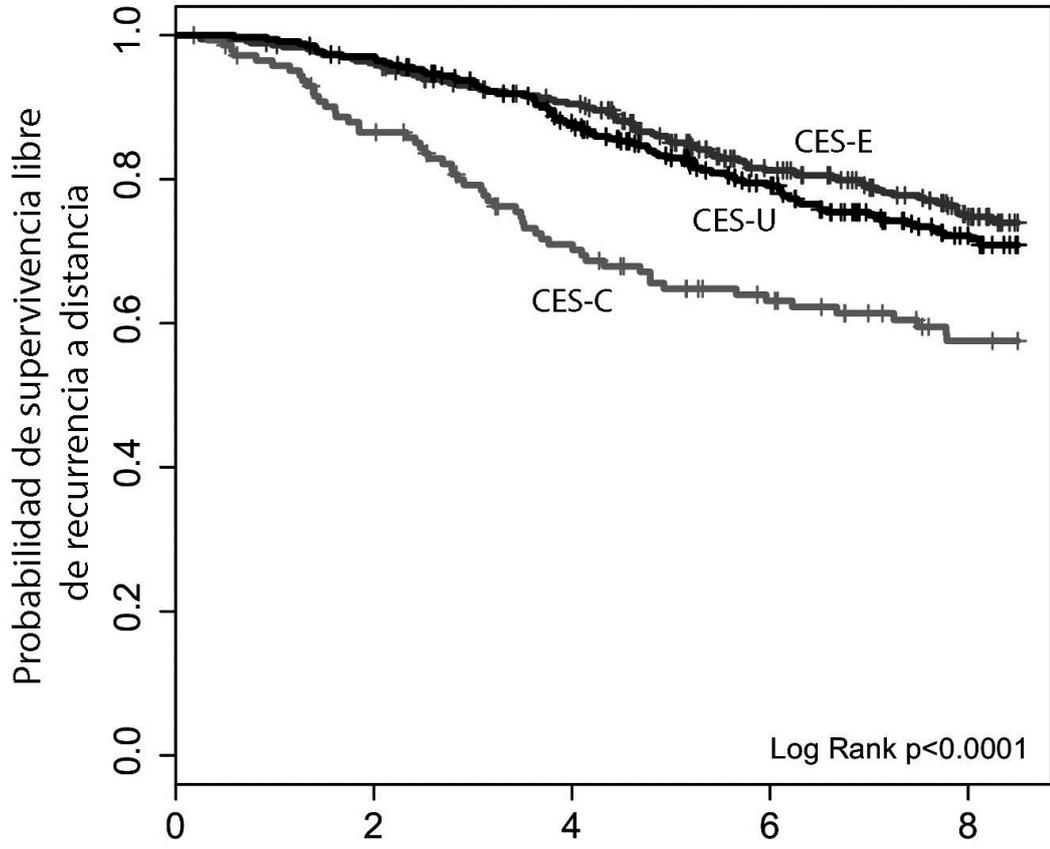


FIG. 3 (cont.)

C

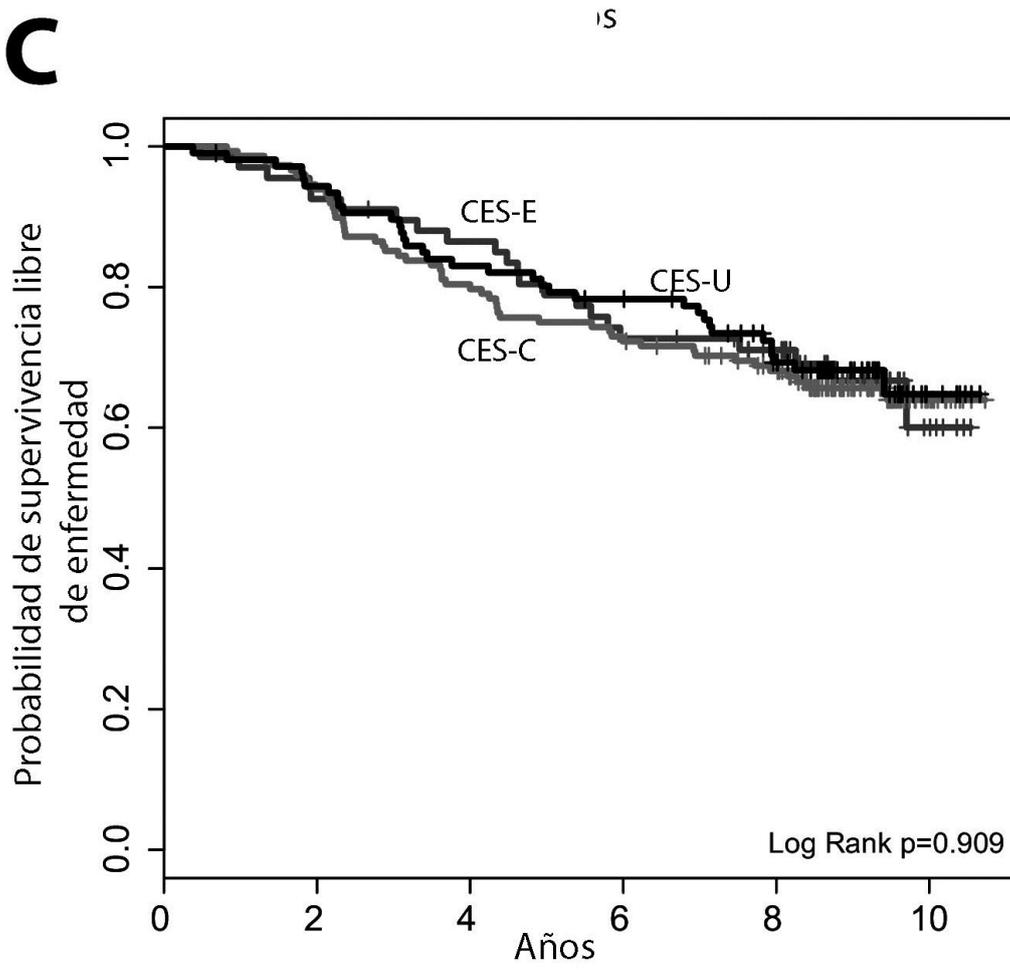


FIG. 3 (cont.)

D

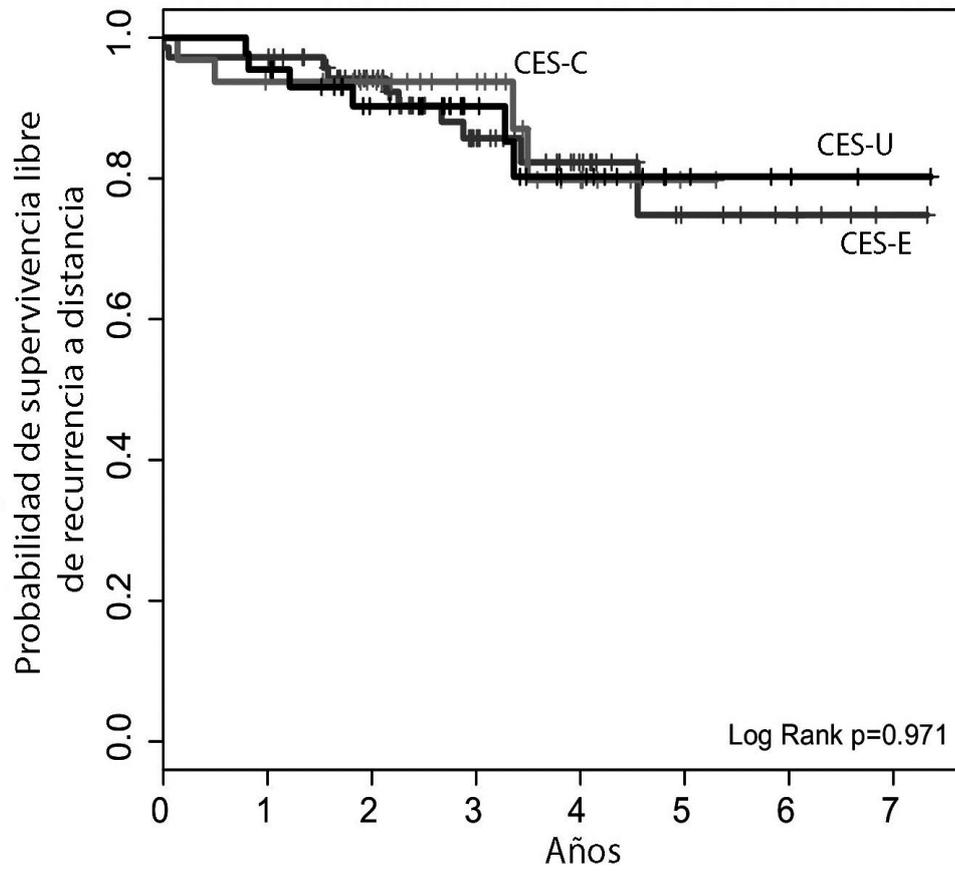


FIG. 3 (cont.)