

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 367**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2015 PCT/EP2015/057946**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158652**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2015 E 15716510 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3132266**

54 Título: **Nuevos biomarcadores para el cáncer de mama metastásico**

30 Prioridad:

**16.04.2014 EP 14164865**

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

**15.02.2019**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM,  
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS  
(100.0%)  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**BURWINKEL, BARBARA;  
YANG, RONGXI;  
PENG, CIKE y  
SCHNEEWEISS, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 700 367 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

Nuevos biomarcadores para el cáncer de mama metastásico

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para el diagnóstico, pronóstico, estratificación y/o seguimiento de una terapia, de cáncer de mama en un paciente de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas. El procedimiento se basa en el uso de ácido hialurónico y S100P como biomarcadores combinados en el plasma de pacientes con cáncer de mama. Los nuevos biomarcadores de la invención permiten diagnosticar e incluso estratificar el cáncer de mama, en particular el cáncer de mama metastásico. El procedimiento proporciona una alternativa interesante a los presentes procedimientos, tal como el análisis del estado de las células tumorales circulantes (CTC). Los biomarcadores de la invención, además, permiten realizar un seguimiento del éxito de la terapia de los pacientes con cáncer de mama y estimar el pronóstico de un paciente.

### Descripción

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres. Las tasas de incidencia de cáncer de mama en los últimos años fueron de aproximadamente 90-100/100.000 en Estados Unidos y de aproximadamente 50-70/100.000 en Europa, y las tasas de incidencia de la enfermedad siguen creciendo constantemente en todo el mundo. El cáncer de mama generalmente se puede dividir en varios estadios principales: temprano, localmente avanzado, localmente recurrente y metastásico. En Europa se ha diagnosticado la enfermedad a aproximadamente 450.000 mujeres, con 140.000 muertes, de las cuales la metástasis es la principal causa de muerte. Aunque el pronóstico de supervivencia a 5 años para el cáncer de mama en estadio temprano es generalmente superior al 60 %, este número baja a un 40-60 % para el cáncer de mama avanzado. El pronóstico de supervivencia a 5 años es generalmente de aproximadamente un 15 % para el cáncer de mama metastásico. Los sitios más comunes de metástasis a distancia para el cáncer de mama incluyen pulmón, hígado, huesos, ganglios linfáticos, piel y SNC (cerebro). Una vez diagnosticado el cáncer de mama metastásico, de media, la esperanza de vida del paciente es de 18-24 meses más. La cura para el cáncer de mama metastásico es poco probable y los modos de terapia para esta enfermedad sistémica son en gran medida de naturaleza paliativa.

Las opciones terapéuticas actuales para el tratamiento del cáncer de mama, incluido el cáncer de mama metastásico, incluyen cirugía (por ejemplo, resección, trasplante autólogo de médula ósea), radioterapia, quimioterapia (por ejemplo, antraciclinas como doxorubicina, agentes alquilantes como ciclofosfamida y mitomicina C, taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel, antimetabolitos como capecitabina, inhibidores de los microtúbulos, tales como el alcaloide de la vinca navelbina), terapia endocrina (por ejemplo, antiestrógenos, como tamoxifeno, progestágenos, tal como acetato de medroxiprogesterona y acetato de megastrol, inhibidores de la aromataasa, tales como aminoglutetamida y letrozol, y productos biológicos (por ejemplo, citocinas, agentes inmunoterapéuticos tales como anticuerpos monoclonales). En la mayoría de los casos, el cáncer de mama metastásico se trata con uno o una combinación de quimioterapia (los medicamentos más eficaces, incluidos ciclofosfamida, doxorubicina, navelbina, capecitabina y mitomicina C) y terapia endocrina.

Las opciones de diagnóstico para el cáncer de mama incluyen análisis microscópico de una muestra del paciente, o una biopsia, obtenida del área afectada de la mama del paciente. Los dos enfoques de diagnóstico más utilizados son la exploración física de las mamas por un médico y una mamografía. Cuando estos exámenes no son concluyentes, por lo general, se envía una muestra de líquido del bulto del paciente para un análisis microscópico para ayudar a establecer el diagnóstico. Otras opciones para la biopsia incluyen tomografía computarizada (TC), imágenes de resonancia magnética (RM), un examen con ultrasonidos y una biopsia con punción con aguja gruesa o una biopsia de mama asistida por vacío, que son procedimientos en los cuales se extrae una sección del bulto de la mama; o una biopsia por escisión, en el que se extirpa todo el bulto.

Durante las últimas décadas, se han probado muchos factores y se han validado con valor predictivo para el pronóstico de pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM). Está bien documentado que los fenotipos de positivo para receptor hormonal (receptor de estrógenos/progesteronas, ER/PR) o negativos para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) están asociados con un resultado favorable en comparación con las mujeres con enfermedad negativa para ER y/o PR. Sin embargo, estos marcadores están basados en tejidos que se pueden observar solo mediante biopsia o cirugía, y no se pueden aplicar como un seguimiento en tiempo real del progreso de la enfermedad.

Los marcadores mínimamente invasivos, como los marcadores en sangre, son más apreciados por el seguimiento del CMM durante la aplicación clínica. CA 15-3 se utiliza principalmente para el seguimiento de pacientes que sufren CMM. Se encuentran niveles elevados en sangre de este marcador en aproximadamente el 70 % de los pacientes con enfermedad avanzada. Sin embargo, la variabilidad en los niveles de CA 15-3 en las mujeres con y sin cáncer de mama limita su aplicación como biomarcador para el CM. El antígeno carcinoembrionario (CEA) es un marcador tumoral relevante en EL CMM pero tiene una sensibilidad baja (53,5 % a 68,6 % en diferentes estadios de la progresión de la enfermedad). Por tanto, solo se recomienda considerar los marcadores CEA y CA 15-3 con otros factores pronósticos.

Recientemente, se ha considerado el recuento de células tumorales circulantes (CTC) como marcador pronóstico para pacientes con CMM. Un punto de corte esencial de más de 5 CTC por 7,5 ml de sangre se ha definido como positivo para CTC. En comparación con los pacientes con estado negativo para CTC, aquellos que son positivos mostraron una supervivencia sin progresión más corta (11,7 frente a 30,3 semanas) en un ensayo clínico prospectivo multicéntrico. En un estudio prospectivo de pacientes con CMM, se demostró que el estado de CTC era un factor pronóstico independiente de supervivencia sin progresión en una razón de riesgos instantáneos de 1,76. Además, también es importante tener en cuenta que aproximadamente el 50 % de los pacientes con metástasis a distancia manifiesta son negativos para las CTC. A esto podría contribuir en parte al hecho de la transición epitelial-mesenquimática en las CTC, en cuyo caso se pueden pasar por alto las técnicas de recuento que explotan la expresión de marcadores epiteliales, tales como EpCAM o citoqueratina.

Delpech y col., ("Serum hyaluronan (hyaluronic acid) in breast cancer patients", 1990) observaron una diferencia significativa de los niveles en suero de hialuronano (ácido hialurónico, AH) en pacientes con cáncer metastásico en comparación con los pacientes con cáncer no metastásico.

De la Torre y col.: (en: "Localization of hyaluronan in normal breast tissue, radial scar, and tubular breast carcinoma", 1993) observaron una mayor cantidad de AH en el carcinoma de mama tubular y la cicatriz radial en comparación con las muestras de tejido mamario normal.

Corte et al. (en: "Expression and clinical significance of cytosolic hyaluronan levels in invasive breast cancer", 2006) notificaron una correlación positiva significativa entre los niveles de AH intratumoral y la supervivencia de los pacientes.

En vista de la técnica precedente descrita anteriormente, el objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de prueba simple, mínimamente invasivo, pero específico y sensible para el diagnóstico o seguimiento del cáncer de mama y, en particular, del cáncer de mama metastásico. Además, la presente invención busca proporcionar estrategias de diagnóstico que permitan realizar un seguimiento directo del éxito del tratamiento en curso de la terapia del cáncer de mama en la clínica, y evaluar el pronóstico para una paciente que recibe terapia para cáncer de mama.

El problema anterior se resuelve en un primer aspecto mediante un procedimiento para el diagnóstico, pronóstico, estratificación y/o seguimiento de una terapia, de cáncer de mama en un paciente, que comprende las etapas de

- a. Proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente,
- b. Determinar el nivel de ácido hialurónico (AH) y S100P en dicha muestra de sangre y
- c. Comparar el nivel de AH y S100P como se determina en b. con un control,

en el que un aumento en el nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre en comparación con dicho control es indicativo de la presencia de cáncer de mama en dicho paciente.

El más preferente en el contexto de la invención es el cáncer de mama metastásico.

Un "diagnóstico" o el término "diagnóstico" en el contexto de la presente invención significa identificar la presencia o la naturaleza de una afección patológica. Los procedimientos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de "positivos verdaderos"). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son "falsos negativos". Los sujetos que no están enfermos y que tienen un resultado negativo en el ensayo se denominan "verdaderos negativos". La "especificidad" de un ensayo de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, estando la tasa de "falsos positivos" definida como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dieron positivo. Si bien un procedimiento de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el procedimiento proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

El término "pronóstico" se refiere a una previsión sobre el resultado probable de la enfermedad, así como a la perspectiva de recuperación de la enfermedad según lo indicado por la naturaleza y los síntomas del caso. Por consiguiente, un pronóstico negativo o malo viene definido por un término de supervivencia o tasa de supervivencia posterior al tratamiento más bajo. Por el contrario, un pronóstico positivo o bueno viene definido por un término de supervivencia o tasa de supervivencia postratamiento elevado. Por lo general, el pronóstico se proporciona como el tiempo de supervivencia sin progresión o la supervivencia global.

El término "estratificación" para los fines de la presente invención se refiere a la ventaja de que el procedimiento de acuerdo con la invención proporciona posibles decisiones para el tratamiento y la terapia del paciente, si se trata de la hospitalización del paciente, el uso, efecto y/o dosis de uno o más medicamentos, una medida terapéutica o el seguimiento de la evolución de la enfermedad y el curso de la terapia o etiología o clasificación de una enfermedad, por ejemplo, en un subtipo nuevo o existente o la diferenciación de enfermedades y sus pacientes. En particular con respecto al cáncer de mama, "estratificación" significa en este contexto una clasificación de una enfermedad de cáncer de mama de un paciente individual con respecto al estado metastásico, o la presencia o ausencia de células tumorales circulantes. Asimismo, el término "estratificación" cubre en particular la estratificación de riesgo con el pronóstico de un resultado de un acontecimiento de salud negativo.

La expresión "seguimiento de una terapia" significa, a los fines de la presente invención, observar la progresión de la enfermedad en un paciente que recibe una terapia para el cáncer de mama. En otras palabras, se realiza un seguimiento regular del paciente durante la terapia para determinar el efecto de la terapia aplicada, lo que permite al profesional médico estimar en un estadio temprano durante la terapia si el tratamiento prescrito es eficaz o no, y por lo tanto, ajustar el régimen de tratamiento en consecuencia.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, pero sin limitaciones, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que es el receptor de un tratamiento particular. Habitualmente, los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sujeto sospechoso de tener cáncer" se refiere a un sujeto que presenta uno o más síntomas indicativos de un cáncer (por ejemplo, un bulto o masa notable). Un sujeto sospechoso de tener cáncer también puede tener uno o más factores de riesgo. En general, a un sujeto sospechoso de tener cáncer no se le han realizado exploraciones para detectar cáncer. Sin embargo, un "sujeto sospechoso de tener cáncer" abarca a un individuo que ha recibido un diagnóstico inicial (por ejemplo, una TC que muestra una masa) pero para quien no se conoce el subtipo o estadio del cáncer. El término incluye además a las personas que alguna vez tuvieron cáncer (por ejemplo, un individuo en remisión) y las personas que tienen cáncer y se sospecha que tienen una diseminación metastásica del tumor primario.

Los términos "cáncer" y "células cancerosas" se refieren a cualquier célula que muestre un crecimiento descontrolado en un tejido u órgano de un organismo multicelular. Se entiende que la expresión "cáncer de mama" significa cualquier cáncer o lesión cancerosa asociada con el tejido mamario o las células de tejido mamario y puede incluir precursores del cáncer de mama, por ejemplo, hiperplasia ductal atípica o hiperplasia no atípica. El cáncer de mama es una enfermedad en la cual existe un tumor primario o múltiples tumores primarios individuales en la mama o en las mamas. De manera general, esto significa que ninguna célula cancerosa se ha separado (aún) del tumor primario en la mama y no se ha diseminado a una "ubicación distinta". El término "tumor" se refiere a una masa anormal de tejido benigna o maligna que no es inflamatoria y no posee función fisiológica.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "cáncer de mama metastásico" debe entenderse como una enfermedad en la que al menos una célula transformada, es decir, cancerosa, de un tumor primario de la mama se ha separado del tumor primario y ha seguido creciendo y formando un tumor en una ubicación distinta de la del tumor primario (en adelante, "ubicación distinta"). La ubicación distinta puede estar, por ejemplo, dentro de la misma mama en la que se encuentra el tumor primario (mama ipsolateral) o en la otra mama (mama contralateral). Otros ejemplos incluyen metástasis en uno o más ganglios linfáticos, ya sean móviles o fijas, ipsolateral o contralateral al tumor primario, supraclavicular, axilar o localizado en otro lugar. Dentro del contexto de la clasificación de los tumores TNM, un "cáncer de mama metastásico" como se usa en el presente documento incluiría, por ejemplo, todos los tumores cuya estadificación incluya M = 1 (es decir, cáncer de mama en estadio IV), es decir, todos los tumores para los cuales existe algún grado de metástasis en lugares distantes, como, por ejemplo, pulmón, hígado, huesos, ganglios linfáticos, piel, cerebro y/o una ubicación distinta dentro de una mama ipsolateral y/o contralateral.

Debe observarse que la expresión "cáncer de mama metastásico", como se usa en el presente documento, no implica que dicha metástasis existente en una "ubicación distinta" debe haber surgido de un tumor primario de mama en particular. Es decir, el origen de la metástasis en la "ubicación distinta" es irrelevante para la designación de la enfermedad como "cáncer de mama metastásico" siempre que el tumor primario que origina la metástasis se origine en el tejido mamario. A tal fin, debe entenderse que la expresión "tejido mamario" incluye los lóbulos y los conductos mamarios, es decir, el tejido que más frecuentemente da lugar a tumores de mama.

La expresión "muestra biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra que se obtuvo y puede analizarse para determinar los niveles de AH y S100P como se desvela en la presente invención, o su expresión génica. La muestra puede incluir un fluido biológico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, plasma, suero), biopsia de tejido y similares. La muestra también puede incluir una muestra de tejido, por ejemplo, tejido tumoral, y puede ser fresco, congelado o tejido incluido en parafina para archivo. Las muestras para los fines de la presente invención son muestras de sangre.

Un "biomarcador" o "marcador" en el contexto de la presente invención se refiere a una biomolécula orgánica, particularmente un polipéptido o polisacárido, que está presente diferencialmente en una muestra tomada de pacientes que tienen una cierta afección en comparación con una muestra comparable tomada de sujetos que no tienen dicha afección (por ejemplo, diagnóstico negativo, sujeto normal o sano, o pacientes con cáncer de mama no metastásico, dependiendo de si el paciente es examinado para cáncer de mama o cáncer de mama metastásico). Como ejemplos, un marcador puede ser un polipéptido o polisacárido (que tiene un peso molecular aparente particular) que está presente a un nivel elevado o disminuido en muestras de pacientes con cáncer de mama metastásico en comparación con muestras de pacientes con un diagnóstico negativo o pacientes con cáncer de mama no metastásico.

La expresión "determinar el nivel de" un biomarcador en una muestra, de control o de referencia, como se describe en el presente documento, se referirá a la cuantificación de la presencia de dichos biomarcadores en la muestra de testículos. Por ejemplo, la concentración de los biomarcadores en dichas muestras puede cuantificarse directamente

mediendo la cantidad de proteína/polipéptido/polisacárido presente en la muestra analizada. Sin embargo, también es posible cuantificar la cantidad de biomarcador indirectamente a través de la evaluación de la expresión génica del gen codificador del biomarcador, por ejemplo, mediante la cuantificación del ARNm expresado que codifica el biomarcador respectivo. La presente invención no se limitará a ningún procedimiento particular para determinar el nivel de un biomarcador dado, pero abarcará todos los medios que permitan una cuantificación, o estimación, del nivel de dicho biomarcador, ya sea directa o indirectamente. "Nivel" en el contexto de la presente invención es, por lo tanto, un parámetro que describe la cantidad absoluta de un biomarcador en una muestra dada, por ejemplo como peso absoluto, volumen o cantidades molares; o, como alternativa, "nivel" se refiere a las cantidades relativas, por ejemplo, y preferentemente, la concentración de dicho biomarcador en la muestra analizada, por ejemplo mol/l, g/l, g/mol, etc. En realizaciones preferidas, el "nivel" se refiere a la concentración de los biomarcadores analizados en g/l.

El "incremento" del nivel de un biomarcador en una muestra en comparación con un control en las realizaciones preferidas se referirá a un aumento estadísticamente significativo en los aspectos preferidos de la invención.

En el curso de la presente invención, se investigó un conjunto de datos relacionados con pacientes con cáncer de mama, incluido un conjunto completo de características clínicas y datos de seguimiento, con el objetivo de encontrar posibles marcadores para la detección y el pronóstico del cáncer de mama. Sorprendentemente, el ácido hialurónico (AH) y la proteína S100P se identificaron como marcadores de diagnóstico interesantes que se expresaron de manera significativa en el plasma de los pacientes observados. El nivel en plasma de AH/S100P, por lo tanto, sirve como un marcador de pronóstico independiente del estado de CTC de acuerdo con la presente invención, y es incluso mejor que la prueba basada en CTC aprobada por la FDA. Dado que los biomarcadores de la invención se detectaron a través de metodologías inmunes a nivel de molécula, la presente invención es particularmente ventajosa debido a la simplicidad de un inmunoensayo, que es mínimamente invasivo y aún muy sensible incluso si solo se pueden proporcionar cantidades mínimas del material de muestra. Los procedimientos descritos en el presente documento también son rentables.

S100P es una proteína de 95 aminoácidos que es miembro de la familia S100. Estas proteínas de unión a Ca<sup>2+</sup> están involucradas en muchas actividades intracelulares y extracelulares, incluyendo la fosforilación de proteínas y la activación de enzimas, la transcripción de genes, la proliferación y diferenciación celular, y afectan a la dinámica del citoesqueleto. S100P puede iniciar la proliferación de células tumorales y la supervivencia contra agentes quimioterapéuticos como el 5-fluorouracilo mediante la unión de Ca<sup>2+</sup> y la activación de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK).

El ácido hialurónico (AH) es un glicosaminoglicano aniónico no sulfatado distribuido ampliamente en los tejidos conjuntivo, epitelial y neural. Es único entre los glicosaminoglicanos, ya que no está sulfatado, se forma en la membrana plasmática en lugar de en el aparato de Golgi y puede ser muy grande, y un peso molecular que suele llegar a millones. Es un macropolisacárido importante en la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos, que se ha probado experimentalmente asociado con la proliferación y migración celular.

El cáncer de mama acorde con la invención objeto del procedimiento para el diagnóstico, pronóstico, estratificación y/o seguimiento es cáncer de mama metastásico o cáncer de mama recurrente, o cáncer de mama con células tumorales circulantes (CTC).

El control, tal como se usa en el procedimiento de la presente invención descrito en el presente documento, corresponde al nivel de AH y S100P en una muestra de control de un individuo sano, o una muestra de control de un paciente con cáncer de mama no metastásico, o una muestra de control de un paciente con cáncer de mama negativo para células tumorales circulantes (CTC). Por lo tanto, el control siempre corresponderá al nivel del biomarcador que se va a determinar, en una muestra de control que es comparable a la muestra de sangre como se usa en el procedimiento de la invención.

Una realización preferida de la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente que se aplica para el diagnóstico, pronóstico, estratificación y/o seguimiento de una terapia, de cáncer de mama positivo para CTC en un paciente.

Las células epiteliales que se exfolian de tumores sólidos se han encontrado en concentraciones muy bajas en la circulación de pacientes con cánceres de mama avanzados y la presencia o el número relativo de estas células en la sangre se ha correlacionado con el pronóstico general y la respuesta al tratamiento. Estas células epiteliales exfoliadas, también llamadas células tumorales circulantes, pueden ser un indicador temprano de expansión tumoral o metástasis antes de la aparición de síntomas clínicos.

Las células tumorales circulantes típicamente tienen una semivida corta de aproximadamente un día, y su presencia generalmente indica una entrada reciente de un tumor en proliferación. Por lo tanto, las células tumorales circulantes representan un proceso dinámico que puede reflejar el estado clínico actual de la enfermedad del paciente y la respuesta terapéutica. En algunos casos, las células tumorales circulantes pueden lisarse y/o sufrir apoptosis, dejando fragmentos de células tumorales circulantes.

El procedimiento de la invención comprende que dicho control corresponde al nivel de AH y S100P en una muestra

de un paciente con cáncer de mama negativo para CTC y en la que un aumento del nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre en comparación con dicho control es indicativo de cáncer de mama positivo para CTC en dicho paciente. Por lo tanto, en este contexto, a la paciente examinada ya se le ha diagnosticado cáncer de mama primario o cáncer de mama metastásico, sin embargo, que se sospecha que tiene cáncer de mama positivo para CTC. Dado que el fenotipo de cáncer de mama positivo para CTC es un factor pronóstico importante para el tiempo de supervivencia sin progresión y la supervivencia global de un paciente con cáncer de mama, el diagnóstico del fenotipo CTC por el procedimiento de la invención es ventajoso para los médicos en la clínica, ya que evita el laborioso recuento de CTC.

El objeto de la presente invención se resuelve además mediante un procedimiento para evaluar el éxito del tratamiento de un paciente con cáncer de mama que recibió un tratamiento para el cáncer de mama, comprendiendo el procedimiento las etapas de

- a. proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente de cáncer de mama que recibió un tratamiento para el cáncer de mama,
- b. determinar el nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre, y
- c. comparar el nivel de AH y S100P como se determina en b. con una referencia,

en la que una disminución de al menos un 20 %, preferentemente 25 %, preferentemente 30 %, más preferentemente, del 35 % al 45 % del nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre en comparación con dicha referencia es una indicación de la respuesta del paciente a dicho tratamiento.

La "referencia" en el contexto del aspecto de la invención descrito en el presente documento corresponde al nivel de AH y S100P en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente antes de recibir dicho tratamiento. Por lo tanto, la referencia corresponde a un control no tratado.

Como alternativa, el procedimiento puede incluir que dicha referencia sea proporcionada por las etapas adicionales del procedimiento, que comprende (i.) proporcionar una segunda muestra de sangre de dicho paciente obtenida antes de que dicho paciente reciba dicho tratamiento, (ii.) determinar el nivel de AH y S100P en dicha segunda muestra de sangre, en la que dicho nivel de AH y S100P en dicha segunda muestra de sangre constituye dicha referencia. Por lo tanto, la segunda muestra de sangre se obtuvo en un momento en que el paciente aún no había recibido dicho tratamiento para su evaluación por el procedimiento, mientras que la muestra de sangre se obtuvo en un momento posterior al inicio de dicho tratamiento que se va a evaluar, en particular, en un momento durante o después de finalizado dicho tratamiento que se va a evaluar.

Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento para el pronóstico de un paciente con cáncer de mama, que comprende

- a. Proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente de cáncer de mama,
- b. Determinar el nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre,

en la que un nivel elevado de AH y S100P en dicha muestra de sangre es una indicación de un tiempo reducido de supervivencia sin progresión (SSP) y/o supervivencia global (SG).

Por supuesto, en el caso de que se utilicen otros biomarcadores en el contexto del procedimiento anterior, también una disminución de dicho nivel en dicha muestra puede ser indicativa de un tiempo reducido de supervivencia sin progresión (SSP) y/o supervivencia global (SG). Si la disminución de los niveles del biomarcador se asocia con un mal pronóstico, también una disminución de dicho biomarcador en dicha muestra puede ser indicativa de un tiempo reducido de supervivencia sin progresión (SSP) y/o supervivencia global (SG).

En el contexto de la invención, un nivel elevado de AH es una concentración de AH en dicha muestra de sangre de al menos aproximadamente 250 ng/ml, y/o en el que un nivel elevado de S100P en dicha muestra de sangre es una concentración de al menos aproximadamente 7 ng/ml. Sin embargo, los niveles de concentración absolutos dependen en gran medida del procedimiento de manipulación y cuantificación de la muestra utilizado. Los niveles anteriores se aplican a una manipulación de la muestra correspondiente a los procedimientos utilizados en el contexto de los ejemplos. Por lo tanto, los expertos en la materia aprecian que, sin ser confrontados por una experimentación indebida, los nuevos valores de referencia deben determinarse de acuerdo con un cambio de un protocolo de tratamiento de la muestra.

En el presente documento se supone que todos los valores numéricos están modificados por el término "aproximadamente", esté o no explícitamente indicado. El término "aproximadamente" se refiere generalmente a un intervalo de números que un experto en la técnica consideraría equivalente al valor citado (es decir, que tiene la misma función o resultado). En muchos casos, el término "aproximadamente" puede incluir números que se redondean a la cifra significativa más cercana. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el término "aproximadamente" puede referirse a una desviación del valor numérico respectivo de un máximo del 20 % del valor numérico, sin embargo es más preferido es un 15 %, un 10 %, un 5 % y, de la forma más preferente, un 4 %, un 3 %, un 2 %, y de la forma más preferente un 1 %.

En una realización preferida, dicha muestra de sangre se selecciona del grupo que consiste en una muestra de plasma o suero.

5 En otra realización preferida de la invención descrita en el presente documento, dicho paciente es un mamífero, preferentemente un ser humano, más preferentemente un paciente humano diagnosticado con cáncer de mama o un paciente humano diagnosticado con cáncer de mama metastásico. Dado que la invención permite diagnosticar no solo el cáncer de mama, sino también el cáncer de mama metastásico e incluso cáncer de mama positivo para CTC, el paciente/sujeto de la invención puede variar dependiendo de cuál de las etapas anteriores de la enfermedad se diagnostica, pronostica, estratifica o analiza. El experto sabe que a un paciente al que ya se le haya diagnosticado cáncer de mama metastásico no se le realizará una prueba de la presencia general de cáncer de mama como tal.  
10 Sin embargo, por supuesto, esto no debe interpretarse como una restricción del ámbito de la invención, ya que también los diagnósticos ya establecidos pueden verificarse con uno cualquiera de los procedimientos de la invención descritos en el presente documento.

15 En todos los aspectos y realizaciones de la presente invención, puede preferirse que el nivel de AH y S100P en dicha muestra se determine por medio de un procedimiento de detección de ácido nucleico o un procedimiento de detección inmunológica. Sin embargo, los procedimientos de detección de ácido nucleico solo son aplicables cuando una proteína expresada es el biomarcador. En general, todos los medios estarán comprendidos en la presente invención que permitirá una cuantificación de la expresión de tales proteínas. Por lo tanto, el análisis del promotor y los procedimientos que evalúan el estado epigenético de un locus génico que codifica un biomarcador proteico de la invención están comprendidos en la invención descrita en el presente documento. Además, el AH, por ejemplo,  
20 como una molécula de polisacárido no se expresa genéticamente y, por lo tanto, se detecta preferentemente utilizando un procedimiento que permite cuantificar una molécula en función de su estructura (anticuerpos) o a través de su masa. Como alternativa, se puede evaluar la presencia o expresión de enzimas que regulan el metabolismo del AH, lo cual es indicativo de la presencia o nivel de AH.

25 Los procedimientos de detección que se prefieren en el contexto de la invención descrita en el presente documento, el nivel de AH y S100P en dicha muestra se determina por medio de un procedimiento de detección seleccionado del grupo que consiste en espectrometría de masas, inmunoensayo de espectrometría de masas (MSIA), chips de proteínas basadas en anticuerpos, electroforesis en gel bidimensional, captura de isótopos estables estándar con anticuerpos anti-péptidos (SISCAPA), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), transferencia Western, matriz de perlas de citometría (CBA), inmunoprecipitación de proteínas, radioinmunoensayo, ensayo de unión al  
30 ligando y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), preferentemente, en el que dicho procedimiento de detección de proteínas es ELISA. Los expertos en la técnica conocen procedimientos de detección alternativos adecuados para la cuantificación de un biomarcador de la invención.

Los procedimientos de la invención descrita en el presente documento son, preferentemente, procedimientos *in vitro*, preferentemente los procedimientos *in vitro* que no comprenden ninguna de las etapas del procedimiento realizadas en el cuerpo humano o animal.  
35

En otro aspecto más, la invención proporciona un kit de diagnóstico de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones adjuntas para ayudar a un diagnóstico de cáncer de mama o cáncer de mama metastásico o cáncer de mama positivo para CTC, en el que el kit de diagnóstico puede usarse para detectar AH y S100P.

40 Por ejemplo, el kit de diagnóstico se puede usar para detectar si AH y S100P están presentes de manera diferente en muestras de pacientes con cáncer de mama o cáncer de mama metastásico o cáncer de mama positivo para CTC, y pacientes normales. El kit de diagnóstico de la invención tiene muchas aplicaciones. Por ejemplo, el kit de diagnóstico se puede usar para diferenciar si un sujeto tiene cáncer de mama o cáncer de mama metastásico o cáncer de mama positivo para CTC o tiene un diagnóstico negativo, ayudando así a un diagnóstico de cáncer de mama. En otro ejemplo, el kit de diagnóstico se puede usar para identificar compuestos que modulan la expresión de  
45 AH y S100P en células de cáncer de mama *in vitro* o modelos animales *in vivo* para el cáncer de mama.

Opcionalmente, el kit de diagnóstico puede comprender además instrucciones para parámetros operativos adecuados en forma de un marcador o un inserto separado. Por ejemplo, el kit de diagnóstico puede tener instrucciones estándar que informen a un consumidor cómo lavar la sonda después de que una muestra de plasma se ponga en contacto con la sonda.

50 El kit de diagnóstico puede comprender además (a) un anticuerpo que se une específicamente a AH y S100P; y (b) un reactivo de detección. Dichos kits de diagnóstico pueden prepararse a partir de los materiales descritos anteriormente y la discusión previa sobre los materiales (por ejemplo, anticuerpos, reactivos de detección, soportes inmovilizados, etc.) es completamente aplicable a esta sección y no necesita repetirse.

55 El kit de diagnóstico puede opcionalmente comprender además una información estándar o de control para que la muestra de prueba pueda compararse con el estándar de la información de control para determinar si la cantidad de prueba de un marcador detectado en una muestra es una cantidad de diagnóstico consistente con un diagnóstico de cáncer, preferentemente cáncer de mama.

El kit de diagnóstico de la invención es un kit de diagnóstico que comprende medios para cuantificar el nivel de AH y

S100P. Tales medios para cuantificar son, por ejemplo, al menos un anticuerpo, preferentemente en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a AH o S100P. Tales anticuerpos son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

5 El kit de diagnóstico de la invención también puede comprender un primer anticuerpo que se une específicamente a AH y un segundo anticuerpo que se une específicamente a S100P, preferentemente en el que dichos primer y segundo anticuerpos son anticuerpos monoclonales.

Se prefiere particularmente que el kit de diagnóstico de la invención comprenda medios para realizar un ELISA.

El objeto de la presente invención se resuelve en un aspecto adicional mediante el uso de AH y S100P como biomarcador en un procedimiento de cribado para la terapéutica del cáncer de mama.

10 El cribado puede realizarse en un cultivo celular o en un modelo animal, por ejemplo, un modelo de cáncer de mama de ratón o rata. En dicho procedimiento de cribado, preferentemente se incluye el uso de un animal que padece cáncer de mama. La progresión del cáncer de mama en dicho modelo basado en los biomarcadores de la presente invención puede controlarse en respuesta al contacto de dicho modelo con un candidato a régimen terapéutico o terapéutica para el cáncer de mama. Por lo tanto, se prefiere un uso en el que en dicho procedimiento de cribado,  
15 compuesto de prueba provoca una disminución de la cantidad de AH y S100P, dicho compuesto de prueba es un candidato para su uso como agente terapéutico contra el cáncer de mama.

La presente invención se describirá a continuación con más detalle en los siguientes ejemplos con referencia a las figuras y secuencias adjuntas, sin embargo, sin limitarse a los mismos. En las figuras y secuencias:

20 Figura 1: (A) Nivel en plasma de ácido hialurónico y S100P en los controles de salud, los pacientes con cáncer de mama primario y los pacientes con cáncer de mama metastásico; (B) Los pacientes con cáncer de mama metastásico se estratificaron aún más por su estado de CTC.

Figura 2: Análisis de ROC de AH/S100P en plasma y subgrupos de los pacientes con cáncer de mama. (A) pacientes con cáncer de mama metastásico CTC+ contra los controles de salud (A) y pacientes con cáncer de mama primario (B); Pacientes con cáncer de mama metastásico contra controles de salud  
25 (C) y pacientes con cáncer de mama primario (D).

Figura 3: (A) Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia sin progresión, estratificado por nivel en plasma de AH/S100P; (B) Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia sin progresión, estratificado por estado de CTC.

30 Figura 4: (A) Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global, estratificado por nivel en plasma de AH/S100P; (B) Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global, estratificado por estado de CTC.

Figura 5: Niveles plasmáticos de AH y S100P antes y después de 1 ciclo completo de quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico.

35 Figura 6: Análisis ROC de los cambios del nivel en plasma de AH y S100P, así como su combinación, en indicar el resultado del tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico. Los cambios de los números de CTC también se representaron para comparar la potencia de discriminación.

Figura 7: Valor pronóstico del nivel en plasma de HA/S100P tras el tratamiento en pacientes con cáncer de mama metastásico. (A) y (B): Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia sin progresión estratificada por el nivel en plasma de AH/S100P y el estado CTC; (C) y (D): Curvas de Kaplan-Meier de la supervivencia global estratificada por el nivel en plasma de AH/S100P y el estado CTC.

40 Figura 8: Nivel en plasma de HA de pacientes de la cohorte de validación y su valor pronóstico para pacientes con CMM. (A) Niveles de HA en plasma en pacientes con CMM y CMP en la cohorte de validación; (B) La potencia de discriminación de los niveles de HA en plasma en la distinción del CMM de pacientes con CMP; (C, D) El valor pronóstico del nivel de HA en plasma para la SSP y la SG de los pacientes con CMM, respectivamente, en la cohorte de validación según lo estimado por las curvas de Kaplan-Meier. AH bajo:  $\leq 250$  ng/ml de AH en plasma; AH alto:  $> 250$  ng/ml de AH en plasma. neg. para CTC:  
45  $< 5$  CTC en 7,5 ml de sangre periférica; pos para CTC:  $\geq 5$  CTC en 7,5 ml de sangre periférica.

## **Ejemplos**

### **Materiales y procedimientos**

50 Se incluyó a 60 controles sanos, 48 pacientes con cáncer de mama primario (CMP) y 212 pacientes con CMM y se recogió el plasma mediante centrifugación a 1.300 g durante 20 min a 10 °C, seguido de una centrifugación adicional del sobrenadante a 15.500 g durante 10 minutos a 10 °C. Las muestras se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C para la medición de AH/S100P. Las CTC se enumeraron en pacientes con CMM mediante el sistema CellSearch® (Veridex, LLC, Raritan NJ), Una prueba de pronóstico aprobada por la FDA. Basado en el

recuento de CTC, se clasificó a los pacientes como positivos para CTC ( $\geq 5$  CTC intactas/7,5 ml de sangre) o negativos para CTC ( $< 5$  CTC intactas/7,5 ml de sangre). En un plazo de 2 horas después de la extracción de sangre, se extrajo el plasma. Se realizó un seguimiento de todos los casos y se registró la progresión de la enfermedad. Se realizó un seguimiento adicional de 66 pacientes con CTC+ durante su tratamiento contra el cáncer.

Después de 1 ciclo completo de quimioterapia, la respuesta al tratamiento se investigó mediante un examen radiológico y de nuevo se tomó la muestra de sangre para el recuento de CTC y se extrajo plasma para la cuantificación de AH/S100P. Los niveles de AH/S100P en plasma se midieron mediante ELISA, que es mucho más fácil que la captura y el recuento de CTC. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS 17.0 (prueba de clasificación de Wilcoxon, regresión logística, regresión de Cox y análisis ROC).

#### 10 **Ejemplo 1: El nivel de AH/S100P en plasma puede diferenciar a los pacientes con CMM de los controles sanos y los pacientes sin CMM**

Para investigar el nivel de AH/S100P en plasma en diferentes fases de la enfermedad, las muestras de plasma fueron analizadas en 60 voluntarios sanos, 48 pacientes con CMP y 212 pacientes con CMM. En comparación con los controles (mediana de HA [IQR]: 176,9 ng/ml [144,1-216,9]; mediana de S100P [IQR]: 4,5 ng/ml [3,4-7,3]), los pacientes con CMP tenían un nivel de AH/S100P en plasma similar (mediana de HA [IQR]: 199,9 ng/ml [138,4-253,1],  $p = 0,73$ ; mediana de S100P [IQR]: 5,9 ng/ml [4,0-7,7],  $p = 0,95$ ), mientras que los pacientes con CMM tenían un nivel de AH/S100P en plasma más de dos veces mayor (mediana de HA [IQR]: 371,9 ng/ml [217,0-616,8],  $p = 9,37 \times 10^{-13}$ ; mediana de S100P [IQR]: 5,9 ng/ml [4,0-7,7],  $p = 5,34 \times 10^{-7}$ , Figura 1A y Tabla 1). Además se estratificaron a los pacientes con CMM en CTC+ y CTC-, según sus números de CTC. Se encontró que los niveles de AH/S100P en plasma eran elevados en los pacientes con CTC+ (mediana de HA [IQR]: 442,7 ng/ml [343,1-596,1]; mediana de S100P [IQR]: 14,1 ng/ml [7,7-29,4]), en comparación con los pacientes con CTC-CMM (mediana de HA [IQR]: 253,5 ng/ml [184,4-629,3],  $p = 3,33 \times 10^{-16}$ ; mediana de S100P [IQR]: 8,1 ng/ml [5,0-13,85],  $p = 1,24 \times 10^{-12}$ , Figura 1B y Tabla 1).

**Tabla 1: Nivel en plasma de AH/S100P en controles sanos, pacientes con CMP y CMM**

Grupo	N	HA (mediana, IQR, ng/ml)	$p$ (AH)	S100P (Mediana, IQR, ng/ml)	$p$ (S100P)
Control	60	176,9 (144,1-216,9)	-	4,5 (3,4-7,3)	-
CMP	48	199,9 (138,4-253,1)	0,73	5,9 (4,0-7,7)	0,95
CMM	212	371,9 (217,0-616,8)	$9,37 \times 10^{-13}$	9,6 (5,7-18,3)	$5,34 \times 10^{-7}$
CTC -	133	253,5 (184,4-629,3)	$1,73 \times 10^{-8}$	8,1 (5,0-13,85)	$1,79 \times 10^{-3}$
CTC+	79	442,7 (343,1-596,1)	$3,33 \times 10^{-16}$	14,1 (7,7-29,4)	$1,24 \times 10^{-12}$

Se realizó un análisis de ROC para estudiar la potencia de discriminación del nivel en plasma de AH/S100P en la detección de subgrupos en pacientes con CM. El nivel de AH/S100P en plasma presentó una AUC de 0,99 (IC del 95 %: 0,96-1,00, Figura 2A) en la detección de casos de CMM CTC+ contra controles de salud, mientras que mostró una AUC de 0,98 (IC del 95 %: 0,96-0,99, Figura 2B) en la detección de pacientes con CTC+ contra pacientes con CMP. El nivel de AH/S100P en plasma también tuvo una potencia de discriminación significativa en la detección de pacientes con CMM contra los controles de salud (AUC: 0,87, IC del 95 %: 0,83-0,91, Figura 2C) y pacientes con cáncer de mama primario (AUC: 0,85, IC del 95 %: 0,80-0,90, Figura 2D). Como se muestra en la Figura 2, este indicador combinado de AH/S100P presentó una potencia de discriminación mejor que el uso de AH o S100P solo, como la AUC del indicador combinado siempre fue mayor que el marcador único.

Por lo tanto, el nivel de AH/S100P en plasma puede distinguir eficientemente a los pacientes con CMM de individuos sin metástasis y es un marcador prometedor para la detección de metástasis y recurrencia de CM.

#### 35 **Ejemplo 2: La combinación del nivel en plasma de S100P y AH como marcador para la supervivencia sin progresión de los pacientes con CMM**

Dado que el nivel de AH/S100P en plasma se correlaciona con el estado de CTC que se conoce como marcador pronóstico de CMM, se investigó el valor pronóstico del nivel de AH/S100P en plasma en pacientes con CMM. La supervivencia sin progresión (SSP) se definió como el tiempo (en meses) desde el reclutamiento hasta la progresión de la enfermedad. Se seleccionó un punto de corte óptimo de una serie de niveles propuestos de AH/S100P en plasma, en el que la mediana del tiempo de SSP de los pacientes "positivos" inicialmente alcanza una meseta. Usando esta estrategia, los pacientes presentaron un nivel de AH en plasma superior a 250 ng/ml y el nivel de S100P superior a 7 ng/ml se definió como nivel "alto" de AH/S100P. Tal como se muestra en la Figura 3A, los pacientes con un nivel de AH/S100P "bajo" presentaron un resultado más favorable (mediana del tiempo de SSA: 7,5 meses, IC del 95 %: 5,2 - 9,8 meses) que aquellos con un nivel "alto" de AH/S100P (mediana del tiempo de SSP: 3,7 meses, IC del 95 %: 3,1 - 4,3 meses, prueba del orden logarítmico  $p = 2,66 \times 10^{-6}$ , Figura 3A y Tabla 2). En cambio, en el presente estudio, solo se observó una diferencia en la línea significativa de SSP entre pacientes con

negatividad y positividad para CTC en el estudio del presente documento (prueba del orden logarítmico  $p = 0,082$ , Figura 3B y Tabla 2). En el modelo multivariado de regresión de Cox, los niveles de AH y S100P en plasma se asociaron de forma independiente con la SSP (Tabla 3).

**Tabla 2:** Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia sin progresión con nivel de AH/S100P en plasma y estado CTC.

Criterios	Grupo	N	Mediana de la SSP (IC del 95 %)	<i>p</i>
AH/S100P	AH/S100P bajo	101	7,5 (5,2 - 9,8)	2,66x10 <sup>-6</sup>
	AH/S100P alto	94	3,7 (3,1 - 4,3)	
Estado de CTC	CTC -	124	5,6 (3,8 - 7,4)	0.082
	CTC+	71	4,3 (3,1 - 5,5)	

5 **Tabla 3: Modelo de regresión de Cox con estado de CTC, nivel de AH en plasma, nivel de S100P y otras covariables asociadas con la supervivencia sin progresión de los pacientes con CMM.**

Factores pronósticos	Regresión univariable de Cox			Regresión multivariable de Cox		
	HR	IC del 95 %	<i>p</i>	HR	IC del 95 %	<i>p</i>
<b>Sitios metastásicos</b>						
Pulmón	1,76	1,28-2,43	5,29 x 10 <sup>-4</sup>	1,96	1,40-2,76	<u>9,74x10<sup>-5</sup></u>
Hígado	1,26	0,92-1,72	0.015	0,99	0,65-1,31	0.648
Hueso	1,07	0,77-1,49	0.702	-	-	-
Piel	1,39	0,92-2,10	0.116	1,46	0,93-2,28	0.099
Pleura	1,01	0,66-1,53	0.975	-	-	-
Número de metástasis	1,48	0,96-2,30	0.078	1,42	0,88-2,30	0.149
Múltiple frente a Único	0,93	0,68-1,27	0.633	-	-	-
Intervalo libre de enfermedad						
> 2 años frente a ≤ 2 años	0,87	0,75-1,01	0.075	0,85	0,73-0,98	<u>0.030</u>
Edad						
Aumento en 10 años	1,33	0,96-1,85	0.084	0,84	0,56-1,25	0.385
Estado de CTC						
Positivo frente a Negativo	2,26	1,57-3,27	1,38x10 <sup>-5</sup>	2,66	1,76-4,03	<u>3,71x10<sup>-6</sup></u>
Nivel de HA						
Nivel de S100P alto frente a bajo	1,44	1,03-2,21	0.035	1,47	1,03-2,11	<u>0.035</u>
Alto frente a Bajo						

10 Dado que el AH presentó un buen valor predictivo para la SSP, también podría ser informativo investigar su asociación con la supervivencia global (SG). La SG se definió como el tiempo (en meses) desde el reclutamiento hasta la muerte. Durante el período de seguimiento, 60 pacientes murieron de metástasis o afecciones relacionadas. El análisis de Kaplan-Meier demostró que los pacientes con niveles más altos de AH/S100P en plasma tenían un tiempo de SG más corto (mediana del tiempo de la SG: 17,5 meses, IC del 95 %: 14,9-20,0 meses), en comparación con aquellos que tenían un nivel de AH en plasma más bajo (mediana del tiempo de la SG: 24,6 meses, IC del 95 %: 22,6 - 26,6 meses, prueba del orden logarítmico  $p = 7,22x10^{-5}$ , Figura 4A y Tabla 4). Mientras tanto, el estado de CTC también presentó una buena correlación con la SG. Los pacientes con estado positivo para CTC tuvieron un tiempo de SG más corto (mediana del tiempo de SG: 17,0 meses, IC del 95 %: 14,1 - 20,0 meses), en comparación con aquellos que tenían un estado de CTC negativo (mediana del tiempo de la SG: 23,6 meses, IC del 95 %: 21,7 - 25,6 meses, prueba del orden logarítmico  $p = 0,001$ , Figura 4B y Tabla 4).

**Tabla 4: Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia global con el nivel de AH/S100P en plasma y el estado de CTC.**

Criterios	Grupo	N	Mediana de la SG (IC 95 %)	p
AH/S100P	AH/S100P bajo	101	24,6 (22,6-26,6)	7,22x10 <sup>-5</sup>
	AH/S100P alto	94	17,5 (14,9-20,0)	
Estado de CTC	CTC -	124	23,6 (21,7-25,6)	0.001
	CTC+	71	17,0 (14,1-20,0)	

El nivel en plasma de AH y S100P también se asoció de forma independiente con la SG, confirmado mediante el modelo de regresión de Cox multivariable (Tabla 5).

5 **Tabla 5: Modelo de regresión de Cox con estado de CTC, nivel de AH en plasma, Nivel de S100P y otras covariables asociadas con la supervivencia global de los pacientes con CMM.**

Factores pronósticos	Regresión univariable de Cox			Regresión multivariable de Cox		
	HR	IC del 95 %	p	HR	IC del 95 %	p
<b>Sitios metastásicos</b>						
Pulmón	2,70	1,61-4,50	1,54 x 10 <sup>-4</sup>	3,67	2,11-6,40	<u>4.27X10<sup>-6</sup></u>
Hígado	1,57	0,94-2,61	0,08	0,93	0.540-1,60	0,78
Hueso	1,49	0,83-2,65	0,18	-	-	-
Piel	1,29	0,67-2,49	0,44	-	-	-
Pleura	0,96	0,49-1,90	0,92	-	-	-
Número de metástasis	3,51	1,27-9,73	0,01	3,31	1,20-9,81	<u>0,03</u>
<i>Múltiple frente a Individual</i>						
Intervalo libre de enfermedad > 2 años frente a ≤ 2 años	0,85	0,51-1,42	0,53	-	-	-
<b>Edad</b>						
Edad	0,89	0,70-1,13	0,33	-	-	-
<i>Aumento en 10 años</i>						
Estado de CTC	2,35	1,41-3,92	1,02X10 <sup>-3</sup>	2,15	1,20-3,84	<u>0,01</u>
<i>Positivo frente a Negativo</i>						
Nivel de HA	4,42	2,00-9,72	2,23x10 <sup>-4</sup>	3,78	1,67-8,60	<u>1,51 x 10<sup>-3</sup></u>
<i>Alto frente a bajo</i>						
Nivel de S100P	1,99	1,10-3,60	0,02	1,96	1,05-3,64	<u>0,03</u>
<i>Alto frente a bajo</i>						

Por lo tanto, el nivel de AH/S100P en plasma tiene una potencia predictiva mejor para determinar la supervivencia sin progresión y el tiempo de supervivencia global que la prueba real basada en CTC aprobada por la FDA.

10 **Ejemplo 3: El valor pronóstico de los cambios en el nivel de AH/S100P en plasma y su asociación con el resultado del tratamiento**

15 Dado que el nivel de AH/S100P en plasma mostró una correlación con la progresión de la enfermedad, puede tener el potencial de evaluar la respuesta al tratamiento antitumoral. Se recogieron muestras de sangre de 66 pacientes con CMM positivo para CTC antes y después del primer ciclo completo de quimioterapia. El progreso de la enfermedad se determinó mediante evaluación radiográfica como remisión completa (reducción del tamaño del tumor), remisión parcial (reducción del tamaño del tumor en al menos el 50 % del examen inicial), enfermedad estable (tamaño del tumor estable) o enfermedad progresiva (aumento del tamaño del tumor o metástasis en otra ubicación). Los pacientes con enfermedad progresiva se consideraron "sin respuesta" al tratamiento, mientras que los otros 3 resultados indicaron que los pacientes "respondían" al tratamiento. El nivel de S100P y AH en plasma

disminuyó significativamente en un 39 % y en un 37 % en los pacientes que mostraron respuesta al tratamiento ( $p = 1,08 \times 10^{-3}$  para S100P, y  $p = 5,22 \times 10^{-5}$  para AH, Figura 5 y Tabla 6), mientras que en los pacientes que no respondieron, las tasas de reducción para S100P y AH fueron solo del 19 % y 17 % respectivamente.

**Tabla 6: Nivel de AH/S100P en plasma en pacientes con CMM antes y después de 1 ciclo completo de quimioterapia.**

Resultado	Indicador	Antes del tratamiento (mediana, IQR)	Después del tratamiento (mediana, IQR)	% Diferencia	<i>p</i>
Sin respuesta	AH	409,9 (319,3-522,2)	313,6 (230,6-402,5)	17 %	0,75
	S100P	11,6 (7,7-18,6)	9,8 (4,7-12,9)	19 %	0,01
Respuesta	AH	438,6 (296,6-596,1)	197,0 (162,6-307,8)	37 %	$5,22 \times 10^{-5}$
	S100P	16,4 (10,3-43,2)	7,9 (4,7-15,8)	39 %	$1,08 \times 10^{-3}$

Se construyó un índice de AH/S100P mediante un modelo de regresión logística y se aplicó para indicar la respuesta radiográfica. El índice de reducción de AH/S100P presentó un área más grande debajo de la curva (AUC = 0,82, IC del 95 %: 0,71-0,93) en comparación con la reducción de CTC (AUC = 0,63; IC del 95 %: 0,48-0,78, la figura 6). Mientras tanto, este índice de AH/S100P tuvo una mejor coincidencia con el resultado radiográfico que los marcadores únicos. El valor pronóstico del nivel de AH/S100P en plasma después del tratamiento se confirmó posteriormente mediante el análisis de Kaplan-Meier. El punto de corte previamente definido, superior a 250 ng/ml de AH y 7 ng/ml de S100P, se usó para estratificar a estos 66 pacientes según su nivel de AH/S100P en plasma después de la quimioterapia. En comparación con los que tenían un nivel de AH/S100P bajo, los pacientes mostraron un nivel de AH/S100P alto, incluso después de que el tratamiento presentaron una SSP más corta (mediana del tiempo de SSP: 3,6 meses frente a 5,9 meses, Prueba del orden logarítmico  $p = 0,02$ , Figura 7A y Tabla 7).

**Tabla 7: Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia sin progresión con nivel de AH/S100P en plasma después del tratamiento y estado de CTC.**

Criterios	Grupo	N	Mediana de la SSP (IC del 95 %)	<i>p</i>
AH/S100P	Post-HA/S100P bajo	37	5,9(2,7-9,1)	0,02
	Post-HA/S100P alto	29	3,6 (2,4-4,8)	
Estado de CTC	Post-CTC -	29	6,3 (3,4-9,2)	0,1
	Post-CTC+	37	4,0 (3,4-4,6)	

De forma similar, estos pacientes también mostraron una SG significativamente más corta (mediana del tiempo de SG: 11,2 meses frente a 20,9 meses, Prueba del orden logarítmico  $p = 2,92 \times 10^{-3}$ , Figura 7C y Tabla 8). Los números de CTC postratamiento mostraron una asociación muy débil con SSP, lo cual no es estadísticamente significativo (prueba del orden logarítmico  $p = 0,1$ , Figura 7B y Tabla 7), pero tiene un mejor valor pronóstico para la supervivencia global (prueba del orden logarítmico  $p = 4,87 \times 10^{-3}$ , Figura 7D y Tabla 8).

**Tabla 8: Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia global con el nivel de AH/S100P en plasma después del tratamiento y el estado de CTC.**

Criterios	Grupo	N	Mediana de la SG (IC 95 %)	<i>p</i>
AH/S100P	Post-HA/S100P bajo	37	20,9 (17,6-24,2)	$2,9 \times 10^{-3}$
	Post-HA/S100P alto	29	11,2 (8,4-14,0)	
Estado de CTC	Post-CTC	29	22,2 (18,8-25,6)	$4,9 \times 10^{-3}$
	Post-CTC+	37	13,8 (10,3-17,5)	

En conclusión, El nivel de AH/S100P en plasma está asociado con el proceso metastásico de CM y puede servir como un marcador potencial para la detección de metástasis. La combinación del nivel en plasma de AH y S100P proporciona un marcador pronóstico para la supervivencia sin progresión de los pacientes con CMM, y sus cambios pueden indicar el resultado del tratamiento anticanceroso.

#### 30 Ejemplo 4: Valor pronóstico de la AH como biomarcador único

Para validar aún más su valor pronóstico, el nivel de AH plasmático se midió en una cohorte independiente basada en la población que consistía en 261 pacientes con CMP y 73 pacientes con CMM. En la cohorte de validación, se

5 observaron niveles más altos de AH en plasma en pacientes con CMM que en pacientes con CMP ( $p = 3,07 \times 10^{-7}$ , Figura 8A). Al igual que en el estudio de descubrimiento, los niveles en plasma de AH en el estudio de validación no mostraron correlación con las características clínico-patológicas del tumor, en pacientes con CMP, mientras que en pacientes con CMM se observaron niveles elevados de AH en plasma en pacientes con estado ganglionar positivo y negativo para el receptor de estrógenos (ER). En la cohorte de validación, el nivel de AH en plasma también mostró la potencia discriminadora para distinguir a los pacientes con CMM de los pacientes con CMP (AUC = 0,70, IC del 95 %: 0,62-0,77, Figura 8B).

10 En la cohorte de validación, se realizó el seguimiento de 73 pacientes con CMM para la posible progresión de la enfermedad o muerte después de su primer diagnóstico, a fin de registrar su SSP y SG. El punto de corte definido previamente de 250 ng/ml se aplicó nuevamente para determinar si un paciente tenía un nivel de AH en plasma "alto" o "bajo" y validar aún más el valor pronóstico del nivel de AH en plasma. Después de una mediana del tiempo de seguimiento de 34,6 meses, los pacientes con niveles de AH en plasma bajos experimentaron una SSP y una SG significativamente más largas que aquellos con niveles de AH en plasma altos (mediana del tiempo de la SSP: 21,1 frente a 5,8 meses, prueba del orden logarítmico  $p = 3,66 \times 10^{-4}$ ; mediana del tiempo de la SG: 42,2 frente a 17,6

15 meses, prueba del orden logarítmico  $p = 1,43 \times 10^{-4}$ , Figura 8C, 8D).

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de diagnóstico, pronóstico, estratificación y/o seguimiento de una terapia, de cáncer de mama en un paciente, que comprende las etapas de
  - a. Proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente,
  - b. Determinar el nivel de ácido hialurónico (AH) y S100P en dicha muestra de sangre y
  - c. Comparar el nivel de AH y S100P determinado en b. con un control,

en el que un aumento en el nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre en comparación con dicho control es indicativo de la presencia de cáncer de mama en dicho paciente.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer de mama es cáncer de mama metastásico o cáncer de mama recurrente o cáncer de mama positivo para células tumorales circulantes (CTC).
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho control corresponde al nivel de AH y S100P en una muestra de control de un individuo sano, o una muestra de control de un paciente con cáncer de mama no metastásico o una muestra de control de un paciente con cáncer de mama negativo para CTC.
4. Un procedimiento para evaluar el éxito del tratamiento de un paciente con cáncer de mama que recibió un tratamiento para el cáncer de mama, que comprende
  - a. proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente de cáncer de mama que recibió un tratamiento para el cáncer de mama,
  - b. determinar el nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre, y
  - c. comparar el nivel de AH y S100P como se determina en b. con una referencia,

en la que una disminución de al menos un 20 %, preferentemente 25 %, más preferentemente el 30 %, lo más preferentemente del 35 % al 45 % del nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre en comparación con dicha referencia es una indicación de la respuesta del paciente a dicho tratamiento.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha referencia corresponde al nivel de AH y S100P en una muestra de sangre proporcionada obtenida de dicho paciente antes de recibir dicho tratamiento.
6. Un procedimiento de pronóstico de un paciente con cáncer de mama, que comprende
  - a. Proporcionar una muestra de sangre de dicho paciente de cáncer de mama,
  - b. Determinar el nivel de AH y S100P en dicha muestra de sangre,

en la que un nivel elevado de AH y S100P en dicha muestra de sangre es una indicación de un tiempo reducido de supervivencia sin progresión (SSP) y/o supervivencia global (SG).
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de plasma o suero.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho paciente es un mamífero, preferentemente un ser humano, más preferentemente un paciente humano diagnosticado con cáncer de mama o un paciente humano diagnosticado con cáncer de mama metastásico.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el nivel de AH y S100P en dicha muestra se determina por medio de un procedimiento de detección seleccionado del grupo que consiste en espectrometría de masas, inmunoensayo de espectrometría de masas (MSIA), chips de proteínas basadas en anticuerpos, electroforesis en gel bidimensional, captura de isótopos estables estándar con anticuerpos anti-péptidos (SISCAPA), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), transferencia Western, matriz de perlas de citometría (CBA), inmunoprecipitación de proteínas, radioinmunoensayo, ensayo de unión al ligando, y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), preferentemente, en el que dicho procedimiento de detección de proteínas es ELISA.
10. Un kit de diagnóstico para realizar un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el kit medios para cuantificar el nivel de AH y S100P.
11. Uso de AH y S100P como biomarcador en un procedimiento de cribado para la terapéutica del cáncer de mama.

Figura 1:

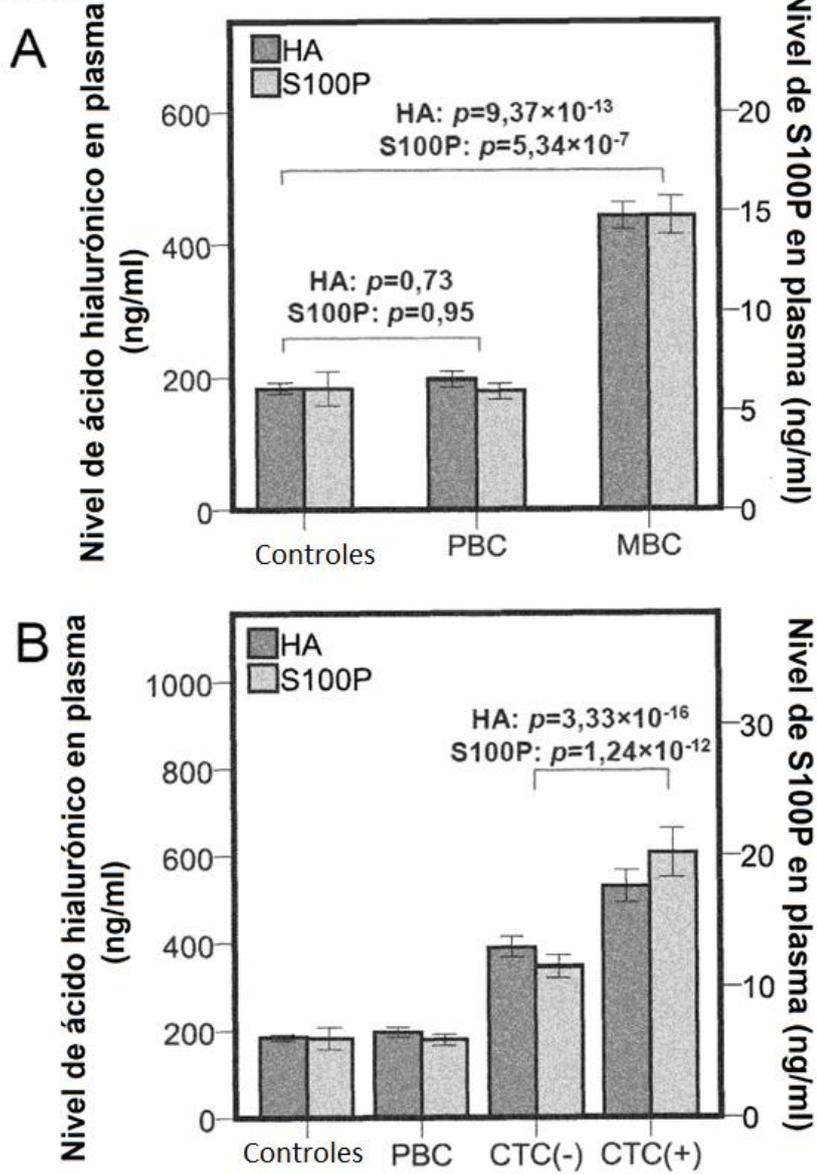


Figura 2:

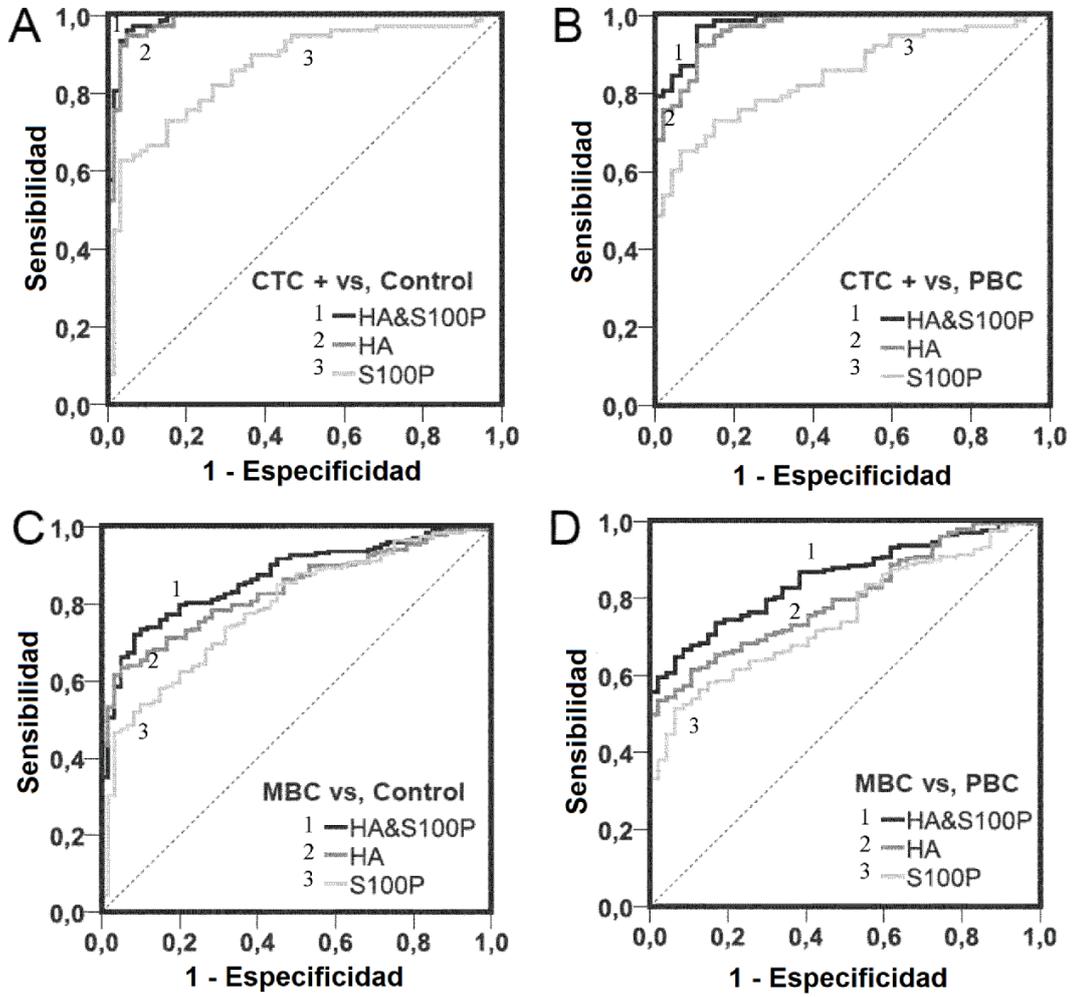


Figura 3:

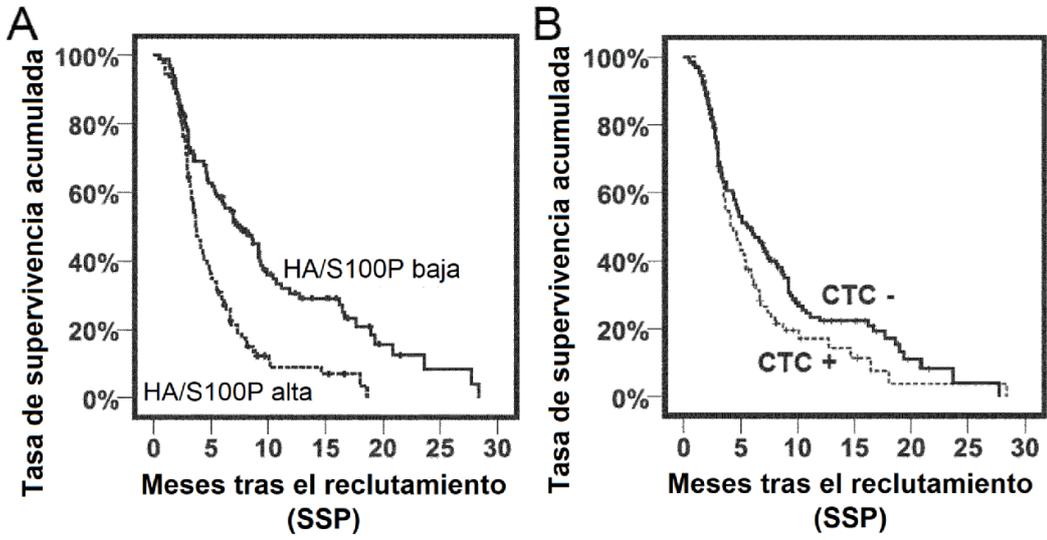


Figura 4:

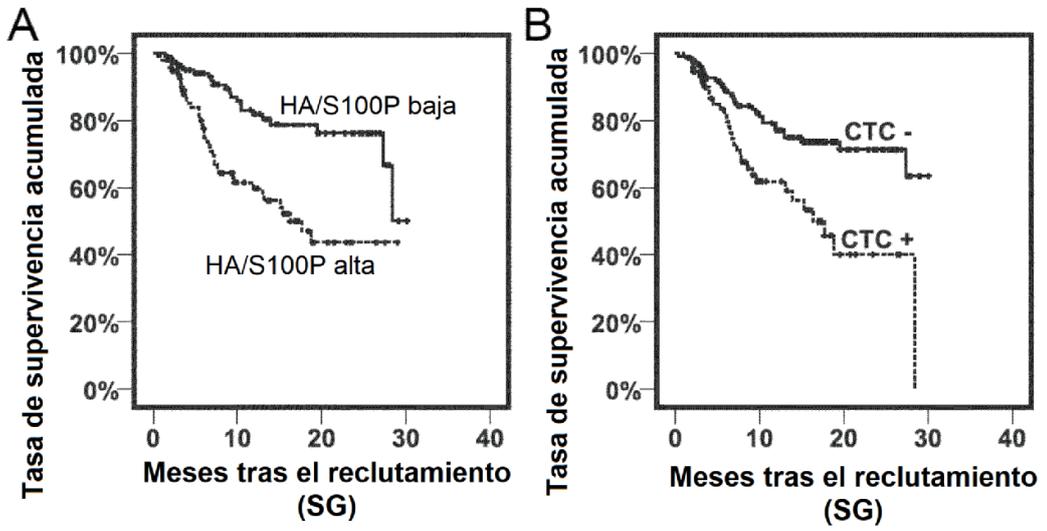


Figura 5:

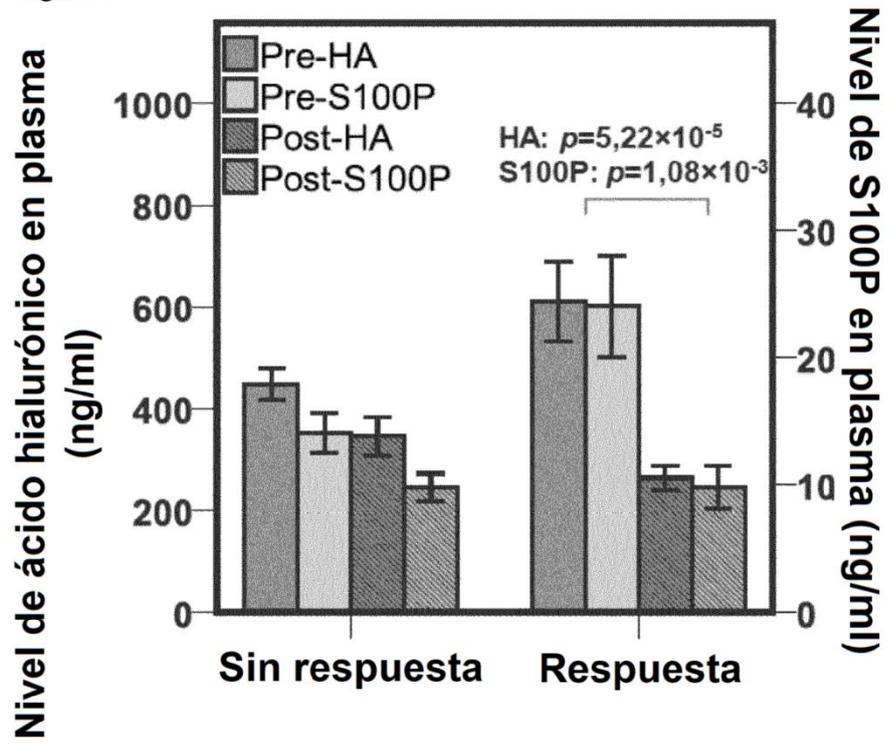


Figura 6:

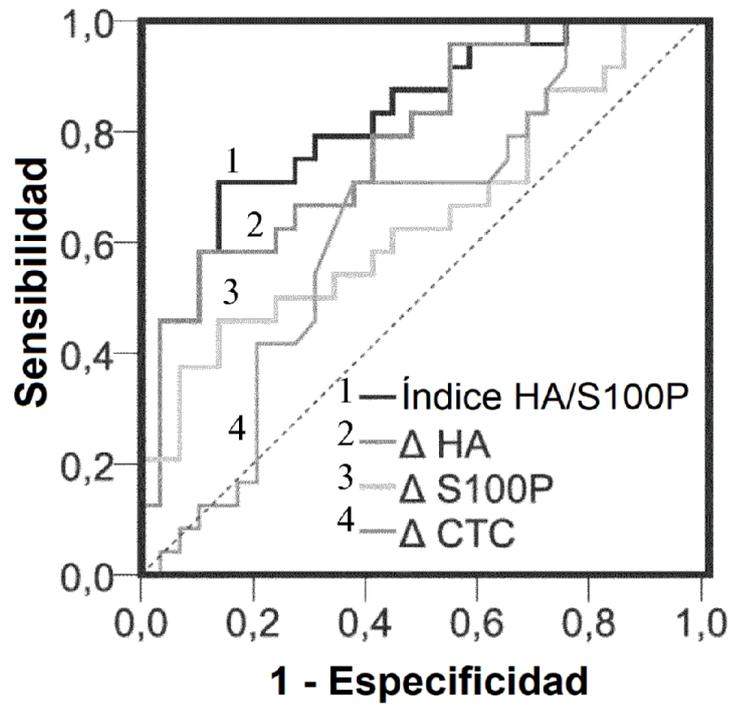


Figura 7:

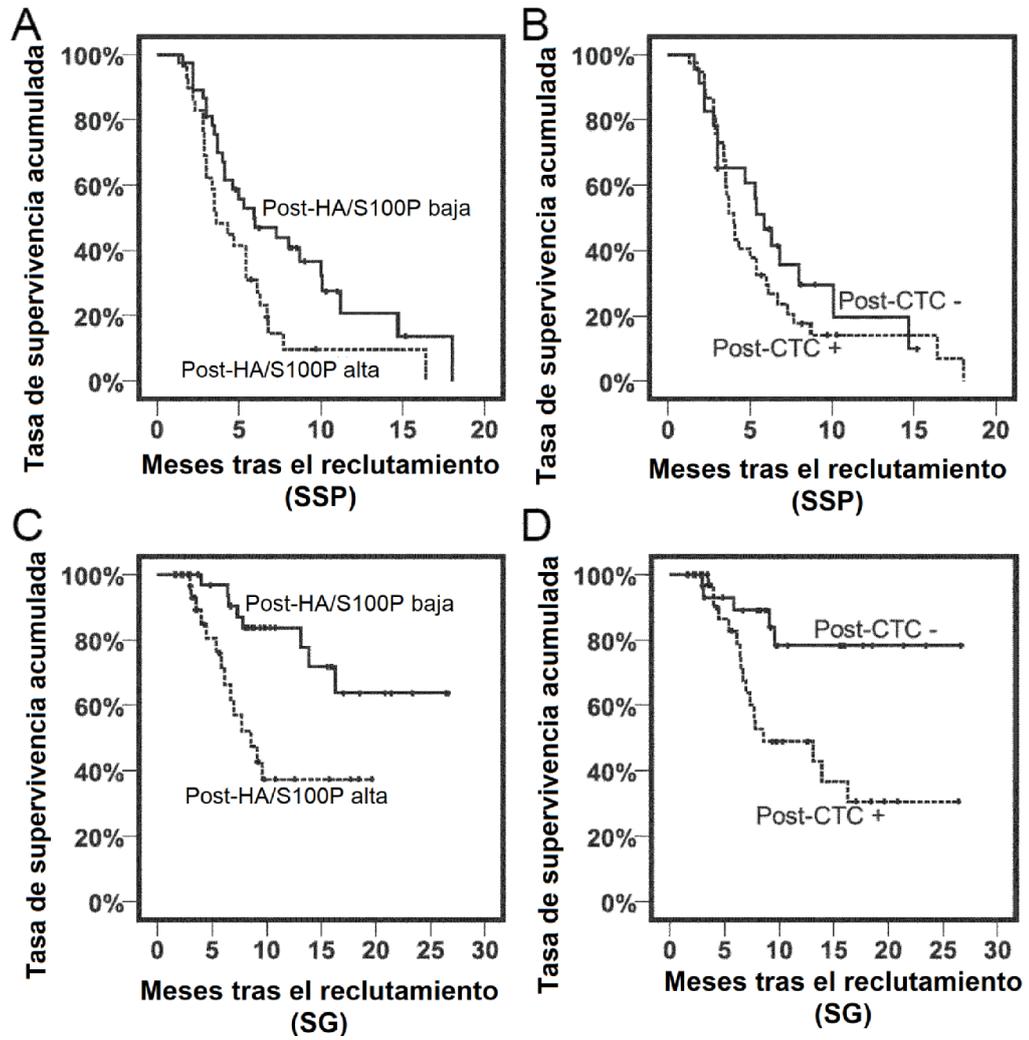


Figura 8:

