

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 280**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)
A61N 5/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G06F 19/20 (2011.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2013** **PCT/CA2013/001008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014** **WO14085909**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013** **E 13860004 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019** **EP 2925892**

54 Título: **Métodos para controlar la respuesta a las radioterapias en cáncer**

30 Prioridad:

03.12.2012 US 201261732697 P
28.03.2013 US 201361806222 P
24.04.2013 WO PCT/CA2013/000408

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.06.2019

73 Titular/es:

RNA DIAGNOSTICS INC. (100.0%)
Banting Institute, 100 College Street
Toronto, CA

72 Inventor/es:

ZHU, MU;
PARISSENTI, AMADEO MARK;
PRITZKER, LAURA;
PRITZKER, KENNETH;
SANTI, STACEY;
GUO, BAOQING;
WANG, XIAOHUI y
NARENDRULA, RASHMI

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 716 280 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

Métodos para controlar la respuesta a las radioterapias en cáncer

5 **Campo**

La divulgación se refiere a métodos y kits para evaluar la respuesta a la radiación en células y tejidos cancerosos, y para controlar la respuesta de sujetos con cáncer y particularmente cáncer de mama y ovario tratados con modalidades que comprenden radioterapia.

10

Introducción

El documento WO2009/030029 titulado "Method of Using Tumour RNA Integrity to Measure Response to Chemotherapy in Cancer Patients" describe un método para controlar la respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado mediante el control de la capacidad de los agentes quimioterapéuticos para inducir la degradación del ARN (pérdida de integridad del ARN), como se muestra a través de una reducción en la métrica conocida de la calidad del ARN, incluido el número de integridad del ARN (RIN)⁵².

En asociación con un ensayo clínico nacional (CAN-NCIC-CTG-MA.22), se demostró que los valores del número de integridad del ARN (RIN) tumoral disminuyeron significativamente con el tratamiento de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado con quimioterapia con epirrubicina/docetaxel y esta respuesta podría estar significativamente correlacionada con el nivel de dosis del régimen ($p = 0,05$)⁵³. La epirrubicina, es un epímero de la doxorubicina, y ambos compuestos (conocidos como antraciclinas) se intercalan entre las hebras de ADN dentro de las células⁵⁴. Los fármacos también inhiben la topoisomerasa II⁵⁵ y la ADN helicasa⁵⁶, bloqueando de este modo la replicación del ADN. Además, los fármacos son citotóxicos a través de la generación de radicales libres, dañando una diversidad de macromoléculas que incluyen ADN y lípidos⁵⁷. Docetaxel, por el contrario, es un análogo de paclitaxel. Ambos fármacos (conocidos como taxanos) se unen a los microtúbulos y evitan su despolimerización⁵⁸. Esto da como resultado la detención de la progresión del ciclo celular en la mitosis y la catástrofe mitótica⁵⁹, y en última instancia, la inducción de la apoptosis⁶⁰. A diferencia de la extensión del tumor (celularidad) a mitad del tratamiento, se observó en el ensayo clínico MA.22 que los valores bajos de RIN tumorales a mitad del tratamiento eran predictivos de una respuesta patológica completa después del tratamiento en estos pacientes ($p = 0,05$)⁵³.

Resumen

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Un aspecto descrito incluye un método para determinar en una muestra de células cancerosas tratadas con radiación, un perfil de ARN que comprende obtener una muestra de células cancerosas que ha recibido una o más dosis de radiación; aislar el ARN de la muestra, comprendiendo el ARN aislado uno o más de ARN degradado inducido por radiación (por ejemplo, ARN alterado) y/o ARN intacto, separar el ARN degradado inducido por radiación del ARN aislado y medir la cantidad de ARN degradado inducido por radiación y/o medir la cantidad de ARN intacto para proporcionar un perfil de ARN de la muestra de células cancerosas tratadas con radiación. En particular, se proporciona un método *in vitro* para determinar la respuesta de un cáncer a la radiación que comprende:

- i. aislar ARN de una biopsia de cáncer obtenida de un paciente tratado con radioterapia; evaluar la integridad del ARN del ARN mediante la medición de un número de integridad del ARN (RIN) utilizando el algoritmo Expert de Agilent,
- ii. comparar el RIN, con respecto a un umbral de respuesta predeterminado; e
- iii. identificar si el paciente tiene una disminución o ausencia de cambio en el RIN en comparación con el umbral de respuesta;

50

en el que una disminución en el RIN en comparación con el umbral de respuesta es predictivo de que el paciente responde a la radioterapia, y en el que una ausencia de cambio en el RIN en comparación con el umbral de respuesta es predictivo de que el paciente no responde a la radioterapia.

En una forma de realización, la medición de la cantidad de ARN degradado inducido por radiación y/o la medición de la cantidad de ARN intacto para proporcionar un perfil de ARN de la muestra de células cancerosas tratadas con radiación comprende obtener un conjunto de datos de electroferograma a partir del cual se determina un perfil de ARN. El perfil puede comprender características del electroferograma. En una forma de realización, el perfil de ARN se usa para determinar un valor de integridad del ARN. El valor de integridad del ARN puede ser un valor compuesto

determinado a partir de diferentes regiones del electroferograma.

Otro aspecto descrito incluye un método para evaluar una muestra de células cancerosas seleccionada opcionalmente de una muestra de células de cáncer de mama y una muestra de células de cáncer de ovario, comprendiendo el método:

- a. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas, opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, que ha sido expuesta a una dosis de radiación para obtener un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, para obtener una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas;
- b. identificar un aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, un aumento o disminución o ausencia de cambio en la concentración de ARN en comparación con un control; y
- c. determinar opcionalmente una puntuación de respuesta a la radiación derivada del aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, el aumento, disminución o ausencia de cambio en la concentración de ARN.

En una forma de realización, el aumento o la disminución en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, el aumento o la disminución o la ausencia de cambio en la concentración de ARN en comparación con el control que se utiliza para calcular una puntuación de respuesta a la radiación, indica si la muestra de células cancerosas está respondiendo a la dosis de radiación.

En una forma de realización, el método comprende la etapa de obtener la muestra de células cancerosas, opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, a partir de una fuente de células cancerosas que ha sido expuesta a una dosis de radiación antes de realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas.

Otro aspecto proporciona un método para evaluar una muestra de células cancerosas seleccionada opcionalmente de una muestra de células de cáncer de mama y una muestra de células de cáncer de ovario, comprendiendo el método:

- a. obtener la muestra de células cancerosas, opcionalmente la muestra de células de cáncer de mama o la muestra de células de cáncer de ovario de la que se ha expuesto a una dosis de radiación;
- b. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, medir una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas;
- c. comparar el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN con un control; y
- d. identificar un aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN en comparación con el control.

En una forma de realización, el método comprende además determinar opcionalmente una puntuación de respuesta a la radiación derivada del aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, el aumento, disminución o ausencia de cambio en la concentración de ARN.

Un aspecto adicional proporciona un método para evaluar una respuesta a la radiación en una muestra de células cancerosas, comprendiendo el método:

- a. obtener una muestra de células cancerosas, opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, que se ha expuesto a una dosis de radiación;
- b. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y opcionalmente una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas;
- c. comparar el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN con un control;
- d. identificar un aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN en comparación con el control; y
- e. determinar una puntuación de respuesta a la radiación derivada del aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN en comparación con el control.

En una forma de realización, el control es uno o más valores de referencia predeterminados, por ejemplo, derivados de una muestra de pretratamiento o una muestra de tratamiento anterior, o derivados de un grupo de pacientes, por ejemplo, en un ensayo clínico. En una forma de realización, el valor de integridad del ARN es proporcional al grado

de degradación del ARN en la muestra de cáncer. En una forma de realización, el valor de integridad del ARN es inversamente proporcional al grado de degradación del ARN en la muestra de cáncer.

La integridad del ARN del ARN en una muestra de células cancerosas se puede medir, por ejemplo, midiendo un valor de integridad del ARN. En una forma de realización, el valor de integridad del ARN es proporcional a la integridad del ARN de la muestra, por ejemplo, en tal caso, un valor de integridad del ARN alto o aumentado corresponde a una integridad del ARN alta o aumentada. En una forma de realización, el método comprende además comparar el valor de integridad del ARN y opcionalmente la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas con un control, tal como uno o más umbrales de respuesta, en el que un valor de integridad del ARN disminuido (por ejemplo, una mayor degradación del ARN) y una concentración de ARN opcionalmente disminuida de la muestra de células cancerosas en comparación con el umbral de respuesta es predictivo/indicativo de que las células cancerosas o el sujeto responden a la radioterapia, y un valor de integridad del ARN comparable o aumentado y, opcionalmente, una mayor concentración de la muestra de células cancerosas en comparación con el umbral de respuesta es predictivo/indicativo de que las células cancerosas no responden al tratamiento con radiación.

En una forma de realización, la comparación comprende comparar con un electroferograma de referencia o un valor de integridad del ARN de referencia derivado del mismo, por ejemplo, derivado de pacientes de referencia/células cancerosas tratadas con un tratamiento con radiación de referencia. Los diferentes electroferogramas de referencia o los valores de integridad del ARN de referencia corresponden a diferentes tratamientos de radiación (por ejemplo, con o sin una terapia citotóxica, tal como quimioterapia, el tipo de terapia citotóxica, diferentes dosis, diferentes programas, etc.).

En formas de realización en las que el valor de integridad del ARN es inversamente proporcional, por ejemplo, medido por RDI, un alto valor de integridad del ARN es indicativo de una integridad del ARN degradada o baja, y un valor de integridad del ARN disminuido en comparación con el control (opcionalmente uno o más umbrales de respuesta) es predictivo/indicativo de que las células cancerosas no responden (o el sujeto no responde) al tratamiento con radiación, y un mayor valor de integridad del ARN en comparación con el control (por ejemplo, uno o más umbrales de respuesta) es predictivo/indicativo de que las células cancerosas responden (o el sujeto responde) al tratamiento con radiación.

En una forma de realización, las células cancerosas han recibido (y/o el paciente ha recibido) 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dosis de radiación.

En otra forma de realización, las células cancerosas se tratan (y/o el paciente se trata) con una dosis de un agente quimioterapéutico antes y/o concurrente con el tratamiento con radiación.

En una forma de realización, el agente quimioterapéutico se selecciona entre productos quimioterapéuticos de taxano, antraciclinas y combinaciones de los mismos.

En una forma de realización adicional, el taxano se selecciona de paclitaxel, docetaxel, larotaxel, Abraxane, paclitaxel ligado a ácido docoxahexaenoico, paclitaxel poliglumex, Ortataxel, Genexol, paclitaxel encapsulado en liposomas, y paclitaxel en una emulsión de vitamina E.

En una forma de realización, la muestra de células cancerosas se obtiene, por ejemplo, después de una primera dosis de radiación o un tratamiento posterior.

En otra forma de realización, al sujeto se le administra un compuesto de radiosensibilización o radioprotección, por ejemplo, antes de obtener la muestra de células cancerosas. Por ejemplo, al sujeto se le puede administrar un compuesto de radiosensibilización tal como un taxano y/o un compuesto de platino, opcionalmente de forma sistémica o remota. Típicamente, la dosis del agente radiosensibilizante, tal como un taxano, se reduce en comparación con la ausencia de radiación.

En una forma de realización, las células cancerosas (por ejemplo, la fuente de cáncer) se ponen en contacto con un compuesto para opcionalmente radiosensibilizar o radioproteger las células o determinar si el compuesto es un radiosensibilizador o un radioprotector.

Por consiguiente, otro aspecto incluye un método para determinar si una célula cancerosa es radiosensible y comprende tratar una célula con una dosis de radiación, opcionalmente en combinación con un agente

radiosensibilizante durante un tiempo suficiente, aislar el ARN, medir un valor de integridad del ARN, y comparar con un control, opcionalmente no tratado o tratado con una dosis de radiación en solitario o un agente radiosensibilizante en solitario; en el que una disminución en la integridad del ARN es indicativa de que la célula cancerosa es radiosensible, y una integridad estable o comparable con la integridad del ARN de control es indicativa de que la célula cancerosa es radiorresistente.

La célula cancerosa puede estar opcionalmente *in vitro* y/o *in vivo*.

En una forma de realización, el radiosensibilizador se selecciona entre agentes de aumento del oxígeno, sensibilizadores de células hipóxicas, pirimidinas halogenadas y/o agentes biorreductores.

Otro aspecto descrito incluye un método para determinar si un agente es un agente radiosensibilizante o un agente radioprotector que comprende:

- 15 a. incubar una fuente de células con un agente de ensayo;
- b. exponer la fuente de células a una dosis de radiación;
- c. realizar un ensayo con una muestra de la fuente de células para obtener un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN de una muestra de la fuente de células incubada con el agente de ensayo;
- 20 d. comparar el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN con una muestra de referencia de control, por ejemplo, correspondiente a una muestra incubada en ausencia del agente de ensayo y expuesta a la dosis de radiación; y
- e. identificar el agente de ensayo como un agente radiosensibilizante si el valor de integridad del ARN indica que la integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN, disminuye en comparación con el valor de la muestra de referencia de control e identificar al agente como un agente radioprotector si el valor de la integridad del ARN indica que la integridad del ARN y opcionalmente, la concentración de ARN, aumenta en comparación con la muestra de referencia de control.

En particular, la invención proporciona un método para determinar si un agente es un agente radiosensibilizante o un agente radioprotector que comprende:

- a. incubar una fuente de células cancerosas con un agente de ensayo;
- b. exponer la fuente de células cancerosas a una dosis de radiación;
- c. medir el RIN utilizando el algoritmo expert de Agilent de una muestra de la fuente de células cancerosas incubada con el agente de ensayo;
- 35 d. comparar el RIN con un control; y
- e. identificar el agente de ensayo como una sensibilidad creciente a la radiación si el RIN indica que la integridad del ARN está disminuida en comparación con el control e identificar el agente que reduce la sensibilidad a la radiación si el RIN indica que la integridad del ARN no ha cambiado en comparación con el control.

En una forma de realización, el método comprende determinar una puntuación de respuesta a la radiación derivada del aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN en comparación con el control. La puntuación de la respuesta a la radiación se puede utilizar, por ejemplo, para clasificar o agrupar la eficacia de radioprotección o radiosensibilización de diversos agentes de ensayo.

En una forma de realización, la fuente de células se incuba con (o se administra un animal no humano) el agente de ensayo durante al menos 24 h, al menos 36 h, al menos 48 h, al menos 60 h o al menos 72 h antes de medir la integridad del ARN y/o la concentración de ARN de la muestra.

El agente de ensayo también puede administrarse en una forma de realización a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un cáncer. Por ejemplo, el agente de ensayo puede ser un agente radiosensibilizante tal como un taxano que se administra al sujeto antes de la radiación para determinar la sensibilidad del tumor a la radiación.

En una forma de realización, la célula utilizada con el agente de ensayo es una célula cancerosa.

En otra forma de realización, las células cancerosas se exponen a la dosis de radiación *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, las células cancerosas expuestas *in vivo* incluyen cuando el sujeto está expuesto a la dosis de radiación y/o

recibe la radiación que comprende el régimen de tratamiento.

En una forma de realización, el control es un umbral de respuesta o uno o más umbrales de respuesta.

- 5 En otra forma de realización, el umbral de respuesta se deriva de una muestra no tratada y/o es un estándar derivado de una pluralidad de muestras no tratadas.

En otra forma de realización más, el umbral de respuesta se deriva de una muestra que no responde y/o una muestra sensible y/o es un estándar derivado de una pluralidad de muestras que no responden y/o muestras sensibles.

Un aspecto adicional incluye un método para evaluar una muestra de células cancerosas derivadas de un paciente, opcionalmente seleccionada de una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, comprendiendo el método:

- 15 a. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas obtenida de un sujeto después de que el sujeto haya sido expuesto a una dosis de radiación con o sin pretratamiento o tratamiento concomitante con un agente de quimioterapia para obtener un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas;
- 20 b. identificar un aumento, disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, un aumento o disminución o ausencia de cambio en la concentración de ARN en comparación con un control; y
- 25 c. determinar opcionalmente una puntuación de respuesta derivada del aumento o disminución o ausencia de cambio en el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, el aumento o disminución en la concentración de ARN.

En una forma de realización, el método para evaluar una muestra de células cancerosas derivadas de un paciente, opcionalmente seleccionada de una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, comprendiendo el método:

- 30 a. obtener una muestra de células cancerosas, opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, de un sujeto después de que el sujeto haya sido expuesto a una dosis de radiación con o sin pretratamiento o tratamiento concomitante con un agente citotóxico, opcionalmente de quimioterapia; y
- 35 b. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y opcionalmente una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas.

En una forma de realización, el método comprende además comparar el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas del paciente con un control tal como un umbral de respuesta en el que una integridad del ARN disminuida indicada por el valor de integridad del ARN y/o una disminución de la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas del paciente en comparación con el umbral de respuesta, es predictiva de que el paciente responde a la radioterapia y una integridad comparable (por ejemplo, ausencia de cambio) o un aumento de la integridad del ARN indicado por el valor de integridad del ARN y/o una mayor concentración de ARN de la muestra de células cancerosas del paciente en comparación con el umbral de respuesta es predictivo/indicativo de que el paciente no responde al tratamiento con radiación.

Otro aspecto incluye un método para identificar pacientes que no responden que comprende:

- 50 a. obtener una muestra de células cancerosas del paciente después de haber estado expuesto a una o más dosis de radiación;
- b. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y/o una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas;
- c. comparar con un umbral de respuesta; y
- 55 d. identificar a los pacientes que tienen una integridad del ARN indicada por un valor de integridad del ARN y/o una concentración de ARN que está por encima del umbral de respuesta.

Otro aspecto adicional incluye un método para predecir un resultado de tratamiento de un paciente que tiene cáncer, opcionalmente cáncer de mama o cáncer de ovario, comprendiendo el método: realizar un ensayo con una muestra de células cancerosas obtenida del sujeto para obtener un valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN,

en el que el sujeto ha sido tratado con una dosis de radiación, en el que una integridad del ARN indicada por el valor de integridad del ARN que está por debajo de un umbral de respuesta predice la respuesta del sujeto/cáncer al tratamiento con radiación y un menor riesgo de progresión; y una integridad del ARN indicada por el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN que es superior al umbral de respuesta predice la resistencia del sujeto/cáncer al tratamiento con radiación y un mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

La obtención de un valor de integridad del ARN y/o una concentración de ARN, o la obtención de un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN significa que se obtiene un valor de integridad del ARN en solitario o en combinación con una concentración de ARN.

En una forma de realización, si se predice que el sujeto/cáncer tendrá un mayor riesgo de progresión, el método comprende además cambiar el tratamiento, y si se predice que el sujeto/cáncer tendrá un menor riesgo de progresión, continuar el tratamiento.

En una forma de realización, la dosis de radiación y/o la quimioterapia se administran antes de una operación.

Un aspecto adicional descrito en el presente documento incluye un método de tratamiento que comprende:

- a) exponer a un paciente con cáncer a una dosis de radiación;
- b) obtener una muestra de células cancerosas del paciente después de la administración de la dosis de radiación;
- c) realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y opcionalmente una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas, y
- d) continuar el tratamiento cuando la integridad del ARN indicada por el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración del ARN se disminuye en comparación con un control, tal como un umbral de respuesta, y cambiar el tratamiento cuando la integridad del ARN está indicada por el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración del ARN es comparable (por ejemplo, ausencia de cambio) o se aumenta en comparación con el control, opcionalmente, el umbral de respuesta.

También se proporciona en otro aspecto descrito el uso de un método descrito en el presente documento para tratar un sujeto con cáncer, comprendiendo el uso a) realizar un ensayo con una muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas, en el que el paciente ha estado expuesto a una dosis de radiación y b) continuar tratando al paciente cuando la integridad del ARN está indicada por el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN disminuye en comparación con un control, tal como un umbral de respuesta, y cambiar del tratamiento cuando la integridad del ARN indicada por el valor de la integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración del ARN es comparable (por ejemplo, ausencia de cambio) o superior en comparación con el control, opcionalmente, el umbral de respuesta.

En una forma de realización, la etapa b comprende asignar al paciente continuar el tratamiento cuando la integridad del ARN indicada por el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración del ARN se disminuye en comparación con un control, tal como un umbral de respuesta, y asignar al paciente cambiar el tratamiento cuando la integridad del ARN está indicada por el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración del ARN es comparable (por ejemplo, ausencia de cambio) o se aumenta en comparación con el control, opcionalmente, el umbral de respuesta.

En una forma de realización, la muestra de células cancerosas es una muestra de células de cáncer de mama obtenida de una paciente con cáncer de mama.

En otra forma de realización, el cáncer de mama es de los subtipos Her2, basal, luminal A, luminal B o "normal".

En otra forma de realización, la paciente con cáncer de mama tiene una enfermedad avanzada, incluyendo cáncer de mama localmente avanzado o inflamatorio (LABC).

En otra forma de realización, la muestra de células cancerosas es una muestra de células de cáncer de ovario obtenida de una paciente con cáncer de ovario.

En otra forma de realización más, el umbral de respuesta se deriva de un cáncer no tratado, opcionalmente una paciente con cáncer de mama o cáncer de ovario o un estándar derivado de una pluralidad de pacientes con cáncer

no tratado, opcionalmente cáncer de mama o cáncer de ovario.

En otra forma de realización, el umbral de respuesta derivado del paciente con cáncer no tratado o el estándar derivado de una pluralidad de pacientes con cáncer no tratados se deriva de una o más muestras de pretratamiento.

5

En una forma de realización, el umbral de respuesta predictivo de capacidad de respuesta es la disminución de la integridad del ARN y/o la concentración en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, o al menos un 90% por debajo de un control no tratado, tal como un valor de pretratamiento.

10

En otra forma de realización más, el umbral de respuesta se deriva de una muestra de células de cáncer de paciente que no responde y/o una muestra de células de cáncer de paciente que responde y/o es un estándar derivado de una pluralidad de muestras de células de cáncer de paciente que no responde y/o una pluralidad de muestras de células cancerosas pacientes que responden.

15

En una forma de realización, el paciente se trata adicionalmente con una dosis de un agente quimioterapéutico.

En una forma de realización adicional, el agente quimioterapéutico se selecciona de productos quimioterapéuticos de taxano, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, larotaxel, Abraxane, paclitaxel ligado a ácido docoxahexaenoico, paclitaxel poliglumex, Ortataxel, Genexol, paclitaxel encapsulado en liposomas, y paclitaxel en una emulsión de vitamina E.

20

En una forma de realización, el taxano es docetaxel o paclitaxel.

25

En otra forma de realización, la muestra de células cancerosas se obtiene después de que el paciente ha recibido 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más dosis de tratamiento con radiación.

En otra forma de realización, se obtienen dos o más muestras de células cancerosas.

30

En otra forma de realización, la integridad del ARN se mide por separación electroforética de ARN, opcionalmente ARN total o ARN ribosómico.

En otra forma de realización más, la medición del valor de la integridad del ARN comprende el cálculo de una relación ribosómica 28S: 18S (ARNr).

35

En una forma de realización, la integridad del ARN se mide calculando un RIN, por ejemplo, el valor de la integridad del ARN es el número de integridad del ARN (RIN) y se ensaya, por ejemplo, utilizando una máquina de bioanalizador Agilent. El RIN se calcula utilizando un algoritmo descrito en Schroeder, A., O. Mueller, et al. 2006; Mueller 2004; Vespucci 2005, por ejemplo, Expert de Agilent, que se usa en el bioanalizador Agilent 2100. El método selecciona automáticamente las características de las mediciones de señal y construye modelos de regresión basados en una técnica de aprendizaje bayesiano. Los espacios de características de diferente dimensionalidad se comparan en el marco bayesiano, que permite seleccionar una combinación de características final correspondiente a los modelos con alta probabilidad posterior. El enfoque se aplicó a una gran colección de mediciones de ARN electroforéticas registradas con un bioanalizador Agilent 2100 para desarrollar un algoritmo que describe la integridad del ARN. El algoritmo resultante es un procedimiento fiable, automatizado e independiente del usuario para la estandarización del control de calidad del ARN que permite el cálculo de un número de integridad del ARN (RIN) en ciertas condiciones y/o para ciertas muestras.

40

45

En otra forma de realización más, la integridad del ARN se mide utilizando un ensayo de alteración del ARN como se describe en el documento WO2013/159200. El valor de integridad del ARN es, en una forma de realización, un valor de índice de alteración del ARN (RDI). En otra forma de realización, en la que la muestra es una muestra de paciente, el valor de integridad del ARN comprende una zona RDA.

50

En una forma de realización adicional, el ARN se aísla de la muestra de células cancerosas y el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN se mide en el ARN aislado.

55

En otra forma de realización, el valor de integridad del ARN se mide separando el ARN mediante electroforesis microcapilar, y detectando la integridad del ARN con colorantes fluorescentes.

En otra forma de realización, se mide la concentración de ARN.

En una forma de realización, se mide el valor de integridad del ARN.

- 5 En otra forma de realización, el valor de integridad del ARN es el número de integridad del ARN (RIN). En otra forma de realización, el valor de integridad del ARN es un valor de ensayo de alteración de ARN, por ejemplo, un RDI o una zona RDA. RDI puede ser más sensible que RIN en la medición de los efectos inducidos por la radiación. RDI captura con mayor precisión la degradación del ARN inducida por productos citotóxicos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia.

10

En otra forma de realización, se miden tanto la concentración de ARN como la integridad del ARN.

En otro aspecto adicional se proporciona un método para interpretar de forma remota la integridad del ARN de una muestra de células cancerosas, comprendiendo el método:

15

- a. obtener una muestra de células cancerosas seleccionada opcionalmente de cáncer de mama y cáncer de ovario de un paciente que ha recibido una dosis de radiación en un sitio remoto;
- b. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener uno o más conjuntos de datos seleccionados de un conjunto de datos de electroferograma, un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, una concentración de ARN en el sitio remoto;
- c. transmitir uno o más conjuntos de datos a un sitio central, por Internet;
- d. generar, en el sitio central, uno o más conjuntos de datos interpretativos a partir de uno o más conjuntos de datos utilizando un ordenador;
- e. i. generar, utilizando un ordenador, uno o más informes de ensayo bajo el control de uno o más revisores expertos; y,
- f. transmitir el uno o más informes de ensayo al sitio remoto u otro sitio por Internet.

20

25

En otro aspecto adicional se describe un método para interpretar de forma remota la integridad del ARN de una muestra de células cancerosas, comprendiendo el método:

30

- a. obtener una muestra de células cancerosas seleccionada opcionalmente de cáncer de mama y cáncer de ovario de un paciente que ha recibido una dosis de radiación en un sitio remoto;
- b. enviar la muestra de células cancerosas al sitio central;
- c. realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas recibida para obtener uno o más conjuntos de datos seleccionados de un conjunto de datos de electroferograma, un valor de integridad del ARN y, opcionalmente, una concentración de ARN en el sitio central;
- d. generar, en el sitio central, uno o más conjuntos de datos interpretativos a partir de uno o más conjuntos de datos utilizando un ordenador;
- e. generar, utilizando un ordenador, uno o más informes de ensayo bajo el control de uno o más revisores expertos; y,
- f. transmitir el uno o más informes de ensayo al sitio remoto u otro sitio por Internet.

35

40

Los uno o más conjuntos de datos que incluyen el conjunto de datos del electroferograma y los uno o más conjuntos de datos interpretativos pueden obtenerse y enviarse, por ejemplo, a través de una red de comunicación de datos o una comunicación inalámbrica.

45

En una forma de realización, la muestra de células cancerosas, por ejemplo, obtenida del sujeto, se coloca en una composición de aislamiento o estabilización de ARN antes del ensayo.

- 50 Un aspecto adicional describe un kit para su uso en un método descrito en el presente documento que comprende una composición de aislamiento de ARN y un recipiente libre de ARNasa para recibir la muestra de células cancerosas y/o muestra de ARN, en el que el recipiente está opcionalmente marcado con un identificador que permite opcionalmente pruebas anónimas.

- 55 Otras características y ventajas de la presente descripción se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos que indican al mismo tiempo las formas de realización preferidas de la descripción, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la descripción serán harán evidentes para los expertos en la técnica de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Se describirá ahora una forma de realización de la presente descripción en relación con los dibujos, en los que:

Figura 1: Esquema del ensayo clínico realizado en el London Regional Health Sciences Centre, donde los pacientes con cáncer de mama localmente avanzado se trataron primero con un régimen de quimioterapia que incluía 5'Fluorouracilo, epirrubicina, y ciclofosfamida (FEC) seguido de docetaxel semanal con radiación diario concurrente seguida de docetaxel semanal.

Figura 2: Efecto del tratamiento con FEC y/o el tratamiento con docetaxel con radiación concurrente para pacientes en el ensayo clínico de Londres representado en la Figura 1. Las concentraciones medias de ARN tumoral $\pm$ error estándar en los distintos tiempos de tratamiento se representan en el panel superior, mientras que el panel inferior representa los valores de concentración de ARN de la biopsia para cada paciente.

Figura 3: Incapacidad de los valores de concentración de ARN tumoral antes, a mitad o después del tratamiento por sí mismos para indicar el grado de respuesta clínica en el ensayo clínico de Londres, que incluyó una respuesta patológica completa post-tratamiento (pCR), una respuesta parcial (PR), o ninguna respuesta (NR), incluida la presencia de enfermedad estable o progresiva (prog).

Figura 4: Gráfico de los valores de RIN frente a la concentración de ARN para los pacientes en el ensayo clínico de Londres que lograron una pCR (respondedores) y pacientes que no lograron una pCR (no respondedores). En la Figura 4A, las muestras de tumores se tomaron a mitad del tratamiento (después de la FEC); una muestra de Responder de cada tres tenía una concentración de ARN baja y un bajo valor de RIN. En la Figura 4B, se tomaron muestras de tumores después de la radiación y docetaxel; ambas muestras de Respondedores tenían bajas concentraciones de ARN y bajos valores de RIN.

Figura 5: Efecto de diversas dosis de radiación sobre el contenido de ARN (concentración) (panel A) o la integridad del ARN (panel B) en células tumorales de ovario A2780. También se representa el efecto del tratamiento con docetaxel 0,1 μ M con radiación concurrente de 10 Gray. El tratamiento con radiación en solitario redujo el contenido de ARN y la integridad de una manera aparentemente dependiente de la dosis, lo que se aumentó en gran medida por el tratamiento concomitante con docetaxel 0,1 μ M.

Figura 6: Efecto de diversas dosis de radiación sobre el contenido de ARN (concentración) (panel A) o la integridad del ARN (panel B) en células tumorales de mama Her2+ SKBR3. También se representa el efecto del tratamiento con docetaxel 0,1 μ M con radiación concurrente de 10 Gray. Diez tratamientos de radiación gris en solitario redujeron ligeramente el contenido de ARN, sin efecto aparente sobre la integridad del ARN. Los efectos de la radiación de 10 Gray sobre el contenido de ARN y la integridad del ARN aumentaron fuertemente con el tratamiento con docetaxel 0,1 μ M concurrente, en particular para la integridad del ARN.

Figura 7: Efecto de diversas dosis de radiación sobre el contenido de ARN (concentración) (panel A) o la integridad del ARN (panel B) en células de tumor de mama MCF-7 [un subtipo de tumor de mama (luminal A)]. También se representa el efecto del tratamiento con docetaxel 0,1 μ M con radiación concurrente de 10 Gray. El tratamiento con radiación en solitario tiene poco efecto sobre el contenido y la integridad del ARN, que se aumentó solo ligeramente con el tratamiento con docetaxel 0,1 μ M concurrente.

Figura 8: Los gráficos de células A2780 que se trataron con dosis crecientes de Epirrubicina con y sin radiación de 10 Gy. A) Valor de RIN frente a dosis de epirrubicina; B) valor de RDI frente a dosis de epirrubicina; C) Concentración de ARN frente a dosis de epirrubicina.

Figura 9: Los gráficos de células MCF-7 que se trataron con dosis crecientes de Epirrubicina con y sin radiación de 10 Gy. A) Valor de RIN frente a epirrubicina; B) valor de RDI frente a epirrubicina; C) Concentración de ARN frente a dosis de epirrubicina.

Figura 10: Gráficos de células A2780 tratadas con docetaxel 5 nM, radiación de 10 Gy y radiación de 10 Gy + docetaxel 5 nM en 72 horas y 96 horas. A) Valor medio de RIN con tratamiento con fármacos y radiación (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar; B) El valor medio de RDI con tratamiento con Docetaxel y radiación (n = 3) sugiere un aumento en el valor de RDI con radiación + Docetaxel en comparación con Docetaxel en solitario a las 96 h. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 11: Gráficos de RDI frente a la concentración de ARN de respondedores pCR y no respondedores pCR para muestras tomadas (A) a mitad de la terapia y (B) después de la terapia.

Figura 12: es un gráfico de un electroferograma de ejemplo en el que se definen el pico 18S, el pico 28S, la región de banda intermedia, la región de banda C baja, la región de banda B baja, la región de banda A baja y la región de marcador.

La Figura 13: es una imagen de un gel de muestras de ARN separadas electroforéticamente y los valores correspondientes de RIN y RDI para cada muestra.

Descripción detallada de la descripción**I. Definiciones**

5 El término "cantidad" como se usa en el presente documento con respecto a la degradación de ARN se refiere a una cantidad (por ejemplo, cantidad relativa o cantidad absoluta) de degradación de ARN que es detectable o medible en ARN aislado de una muestra. Por ejemplo, la cantidad se puede expresar utilizando un valor absoluto (por ejemplo, un valor de RDI o un valor de RIN) o una cantidad relativa tal como 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,2, 2,4,
10 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80 y/o 100 veces una cantidad de control, donde, por ejemplo, la cantidad de control es, por ejemplo, una cantidad de pretratamiento o, por ejemplo, un valor de referencia correspondiente al nivel promedio o medio en muestras no tratadas o de pretratamiento. La cantidad puede compararse con uno o más valores de umbral, por ejemplo, que identifican a los sujetos con una probabilidad de responder al tratamiento.

15 El término "cantidad inicial" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de degradación del ARN (por ejemplo, cuán intacto está el ARN) en una muestra, tal como una muestra de pretratamiento que se puede usar para comparación con una muestra de ensayo (por ejemplo, comparación con una población celular y/o tumor) tomada en un momento posterior, por ejemplo durante o después del tratamiento, por ejemplo durante o después de
20 un régimen de tratamiento que comprende radiación y, opcionalmente, quimioterapia, anticuerpos citotóxicos y/u otro tratamiento. Por ejemplo, en métodos relacionados con el control de la respuesta al tratamiento, "cantidad inicial" puede referirse a un nivel de degradación de ARN en una muestra tomada antes de una muestra posterior, por ejemplo, se toma una muestra inicial antes del tratamiento, cuya comparación proporciona una indicación de la respuesta al tratamiento.

25 El término "realizar un ensayo con una muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN" como se usa en el presente documento significa realizar un ensayo en una muestra de ARN de la muestra de células cancerosas para determinar o medir cuantitativamente o semicuantitativamente el grado de degradación y/o la integridad del ARN o una fracción del mismo, para proporcionar un valor representativo de los resultados del
30 ensayo. Por ejemplo, el valor de la integridad del ARN se puede determinar mediante una serie de métodos que incluyen electroforesis microcapilar, por ejemplo, mediante la determinación de un número de integridad del ARN utilizando, por ejemplo, una máquina de bioanalizador Agilent, un sistema de electroforesis capilar Experion® con su índice de calidad de ARN equivalente (RQI), Nanodrop® (Thermo Scientific, Inc.) u otros sistemas equivalentes, tales como los fabricados por Applied Biosystems, Lumex o Beckman Coulter Corporation, o un sistema similar, y/o
35 por ejemplo, donde el valor de integridad del ARN es una relación de ARNr 28S:18s, determinada utilizando electroforesis en gel de agarosa y/o espectroscopia, por ejemplo, evaluando la absorbancia UV a 280:260. Otros métodos para determinar la integridad del ARN incluyen los métodos descritos en el documento WO2013/159200, que describe ensayos para evaluar la integridad del ARN, que se pueden usar en el presente documento. En formas de realización, se obtiene un conjunto de datos de electroferograma (por ejemplo, cuyas características comprenden
40 el perfil de ARN) y se usa para calcular un valor de integridad del ARN.

El término "realizar un ensayo con una muestra de células cancerosas para obtener una concentración de ARN" como se usa en el presente documento significa realizar un ensayo en una muestra de ARN para determinar o medir cuantitativamente la cantidad de ARN o una fracción del mismo, para proporcionar un valor representativo de los
45 resultados del ensayo. Por ejemplo, la concentración de ARN se puede determinar mediante una serie de métodos que incluyen, por ejemplo, electroforesis microcapilar, por ejemplo, utilizando una máquina de bioanalizador Agilent, un sistema de electroforesis capilar Experion® con su índice de calidad de ARN equivalente (RQI), Nanodrop® (Thermo Scientific, Inc.) u otros sistemas equivalentes, tales como los fabricados por Applied Biosystems, Lumex o Beckman Coulter Corporation o un sistema similar. La concentración de ARN puede basarse en la absorbancia UV,
50 por ejemplo, evaluando la absorbancia UV a 260 nm.

El término "cáncer de mama" como se usa en el presente documento incluye todos los subtipos de cáncer de mama, incluidos los subtipos HER2, basal, luminal A, luminal B y "normal" de cáncer de mama, así como el cáncer de
55 mama localmente avanzado (LABC).

El término "muestra de células cancerosas" como se usa en el presente documento significa, por ejemplo, cualquier muestra que comprende células cancerosas y/o células de lecho canceroso incluyendo, por ejemplo, células obtenidas de una fuente de células cancerosas tales como tejido tumoral o un cultivo celular *in vitro*. Las células cancerosas pueden ser, por ejemplo, células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario, de cáncer de piel no

melanoma, de cáncer de cabeza y cuello, de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del cuello del útero, cáncer anal, cáncer de próstata, células cancerosas de linfoma, células cancerosas de liposarcoma, o cualquier célula cancerosa que se pueda tratar con un régimen que comprenda radiación o que se esté probando su capacidad de tratamiento con un régimen que incluya radiación.

5

El término "células de lecho canceroso", como se usa en el presente documento, significa células de tejido reparador que se han infiltrado en un sitio previamente ocupado por un cáncer (por ejemplo, en el sitio de la lesión tumoral) y pueden incluir tejidos conectivos del estroma que rodean el tumor. Estas pueden obtenerse en un paciente que ha respondido al tratamiento con radiación, opcionalmente después del tratamiento o durante el tratamiento en un paciente que ha respondido rápidamente. Por ejemplo, en el estudio MA22, algunos tumores que presentaron un postratamiento con pCR tuvieron una fuerte degradación del ARN en muestras obtenidas en el sitio de la lesión tumoral, aunque no había células tumorales, y en el estudio MA22 algunas muestras que tuvieron una pCR no tenían celularidad tumoral a la mitad de la terapia, pero tenían un alto valor de RDI (RIN bajo) que indica que las células que proporcionaban el ARN en este punto de tiempo eran probablemente células de tejido reparador. Estas células cancerosas son más activas metabólicamente que las células no tumorales que rodean el sitio.

El término "tratamiento cambiante contra el cáncer", como se usa en el presente documento, incluye, por ejemplo, uno o más cambios en el nivel de dosificación y/o la programación de la radiación o producto quimioterapéutico, la interrupción del tratamiento, la adición de uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más productos biológicos o uno o más agentes radiosensibilizantes para el tratamiento, o el cambio a un tratamiento alternativo contra el cáncer, tal como una terapia farmacológica o una cirugía (por ejemplo, la interrupción del tratamiento con radiación).

El término "comparable con un control" o "comparable con un umbral de referencia" o "ausencia de un cambio" como se usa en el presente documento en el contexto de un valor de integridad del ARN o concentración de ARN significa menos de un 30% de disminución o aumento, opcionalmente, esta disminución podría ser inferior al 25%, inferior al 20% o inferior al 10% de un control tal como un control de pretratamiento, por ejemplo, o el aumento podría ser inferior al 25%, inferior al 20%, o inferior al 10% de un control tal como un control de pretratamiento. En un método *in vitro*, "comparable con un control" "comparable con un umbral de referencia" o "ausencia de un cambio" puede ser una disminución o aumento inferior al 10% o el 5%. En un método *in vivo*, "comparable con el control", "comparable con un umbral de referencia" o "ausencia de un cambio" puede ser un aumento o disminución inferior al 30% o el 25%.

El término "control", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra comparativa tal como ARN intacto y/o ARN obtenido de un sujeto o un grupo de individuos que se sabe que son no respondedores y/o respondedores, y/o una muestra de referencia, tal como una muestra de pretratamiento o una muestra anterior del individuo sometido a ensayo. Por ejemplo, el control puede ser una muestra de un sujeto que comprende ARN de células cancerosas tal como ARN de células de cáncer de mama o de cáncer de ovario, tal como un pretratamiento o una muestra anterior del sujeto. El control también puede ser el valor de integridad del ARN esperado o predeterminado para una muestra no tratada de ARN de tejido canceroso o de células cancerosas (por ejemplo, ARN intacto). Por ejemplo, se puede determinar una muestra de ARN de tejido canceroso no tratado o de células cancerosas no tratadas y se espera que esté "intacta", por ejemplo, que tenga un valor de RIN superior a 7, o superior a 8, o superior a 9 (un RIN de 9 se puede usar particularmente para cultivos *in vitro*). El control se puede usar como un umbral de referencia, por ejemplo, al controlar la respuesta de un paciente o en pruebas basadas en líneas celulares. Los niveles iniciales o de pretratamiento observados en células en cultivos *in vitro* son niveles mucho más bajos de degradación del ARN que *in vivo*, donde los tumores pueden tener niveles iniciales significativamente más altos de degradación del ARN. Los cultivos celulares en el laboratorio se encuentran en condiciones ideales para promover la viabilidad celular, incluidos los factores de crecimiento, nutrientes, tampones, oxigenación apropiada, eliminadores de ROS, vitaminas, etc. En una forma de realización, el control es un control positivo, por ejemplo, células/tumor tratadas con radiación. En otra forma de realización, el control es un control negativo, por ejemplo, célula/tumor que no recibe tratamiento con radiación, opcionalmente que no recibe ningún tratamiento.

El término "tratamiento citotóxico" como se usa en el presente documento significa cualquier agente que pueda usarse con radiación, de forma secuencial y/o concurrente, que pueda inducir la muerte celular que se use en el tratamiento del cáncer, incluyendo, por ejemplo, quimioterapia tradicional y no tradicional (por ejemplo, terapias dirigidas), tratamiento con radiación, tratamiento hormonal (por ejemplo, para cánceres sensibles) y combinaciones de los mismos. Dichos agentes incluyen, pero sin limitación, agentes estabilizadores de microtúbulos, tales como docetaxel y paclitaxel, inhibidores de la síntesis de ADN, tal como epirrubicina, inhibidores del receptor Her2, tal como Trastuzumab, agentes de reticulación del ADN, tal como mafosfamida, carboplatino y cisplatino, inhibidores de

VEGFA, tal como Bevacizumab, los inhibidores del receptor de tirosina cinasa, tal como Sunitinib y Toceranib, los bifosfonatos como el ácido zoledrónico, inhibidores de la timidilato sintetasa, tal como 5-fluorouracilo.

El término "agente quimioterapéutico" como se usa en el presente documento significa cualquier fármaco o combinación de fármacos que se utiliza para el tratamiento del cáncer tal como cáncer de mama o cáncer de ovario, u otros cánceres tratables por radiación que comprenden regímenes tales como, por ejemplo, cáncer de piel no melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello uterino, cáncer de ano, cáncer de próstata, incluyendo, por ejemplo, los fármacos utilizados para la quimioterapia primaria, incluyendo, por ejemplo, un agente platinante (por ejemplo, cisplatino y/o carboplatino) y/o un taxano (por ejemplo, paclitaxel y/o docetaxel), fármacos que se usan típicamente en el tratamiento del cáncer de ovario recurrente (por ejemplo, antraciclinas tales como doxorubicina o epirubicina o sus formas pegiladas), inhibidores de topoisomerasa I y II (por ejemplo, topotecán y etopósido, respectivamente), análogos nucleosídicos tales como gemcitabina y 5-fluorouracilo, agentes de reticulación del ADN, tal como mafosfamida, bloqueador del receptor de estrógenos tamoxifeno y/o el bloqueador de Her-2/Neu bevacizumab. En una forma de realización, el agente quimioterapéutico es sunitinib.

El término "dosis" como se usa en el presente documento en referencia a la radiación, se refiere a una exposición individual a la radiación, ya sea administrada en cada momento dentro de un programa o la cantidad total de exposición a la radiación dentro de un programa. Con respecto a un tratamiento de quimioterapia, una dosis significa una cantidad de un fármaco individual administrado en cada momento dentro de un programa o la cantidad total de cada fármaco administrado dentro de un programa, o la cantidad total de fármaco administrado durante un ciclo de quimioterapia.

El término "integridad del ARN disminuida" como se usa en el presente documento para determinar la respuesta con respecto a muestras de pacientes significa una integridad del ARN que es al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50 %, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% menor que un control o valor correspondiente, por ejemplo, una muestra de pretratamiento o, por ejemplo, un valor máximo (por ejemplo, RIN máximo). Con respecto a una muestra de cultivo celular, una disminución de al menos un 5%, 10%, 15%, 20% o 25% en comparación con el control es indicativa de una integridad del ARN disminuida.

El término "concentración de ARN disminuida" como se usa en el presente documento significa una integridad del ARN que es al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50 %, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% menor que un control o valor de referencia correspondiente, por ejemplo, una muestra de pretratamiento o, por ejemplo, un valor máximo.

El término "resultado de tratamiento positivo" en el contexto de un paciente como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta terapéutica positiva al tratamiento, por ejemplo, alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevenir la propagación de la enfermedad o prevenir la progresión de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, revertir la enfermedad, mejorar o paliar la patología, y remisión (ya sea parcial o total), detectable o no detectable. Un "resultado de tratamiento positivo" también puede significar prolongar la supervivencia general, la supervivencia con enfermedad estable y/o sin enfermedad/progresión en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento, incluida, por ejemplo, una respuesta patológica completa después del tratamiento. El alcance del resultado de tratamiento positivo puede estar relacionado, por ejemplo, con el grado de degradación del ARN y/o la disminución de la concentración de ARN determinada para una muestra de cáncer obtenida durante el tratamiento.

El término "postratamiento" como se usa en el presente documento, significa después de completar un tratamiento que comprende un régimen de radiación, opcionalmente completar todos los grupos de un régimen de tratamiento, por ejemplo, después de la finalización de cualquier quimioterapia u otro tratamiento posterior a la radiación.

El término "resultado de tratamiento negativo" en el contexto de un paciente como se usa en el presente documento significa una falta de respuesta terapéutica al tratamiento, por ejemplo, sin respuesta, recurrencia de la enfermedad o propagación de la enfermedad (progresión de la enfermedad).

El término "respondedores" como se usa en el presente documento significa pacientes que demuestran un resultado de tratamiento positivo o terapéutico, incluyendo, por ejemplo, una respuesta terapéutica medible. Los respondedores incluyen opcionalmente pacientes que demuestran un aumento de la supervivencia sin enfermedad

(DFS) o la supervivencia general (OS) en comparación con el promedio para un grupo de pacientes tratados de manera similar, una respuesta patológica completa (pCR) o una respuesta parcial.

El término "no respondedores" como se usa en este documento significa pacientes (por ejemplo, no respondedores) que no demuestran un resultado de tratamiento positivo incluyendo, por ejemplo, una respuesta terapéutica no medible, por ejemplo, que presentan un resultado terapéutico negativo tal como una disminución de DFS o OS en comparación con el promedio para un grupo de pacientes tratados de manera similar.

El término "muestra de ARN" significa cualquier muestra que comprenda ARN purificado y/o aislado, incluyendo cualquier fracción de ARN purificado y/o aislado, tal como ARN total, ARNr y/o ARNm. En una forma de realización, la muestra de ARN comprende ARNr. Se puede obtener una muestra de ARN, por ejemplo, utilizando, por ejemplo, varios métodos conocidos en la técnica para aislar ARN.

El término "cáncer de ovario", como se usa en el presente documento, significa todos los subtipos de cáncer de ovario, incluidos los subtipos seroso, de células claras, endometrioides y mucinosos [10].

El término "radiación" en relación con un tratamiento significa cualquier energía, fotón o partícula, aplicada a un tumor, incluida, por ejemplo, la radiación ionizante.

El término "radiosensibilizador", como se usa en el presente documento, significa un agente tal como un fármaco de molécula pequeña o un agente biológico que hace que una célula tumoral sea más sensible a la radioterapia. El radiosensibilizador puede ser un agente que aumenta el oxígeno, un sensibilizador de células hipóxicas, una pirimidina halogenada o un agente biorreductor.

El término "agente de aumento del oxígeno" como se usa en el presente documento, significa un agente tal como un fármaco de molécula pequeña o un agente biológico, que aumenta la oxigenación del tumor y/o reduce la hipoxia tumoral, incluyendo, por ejemplo, el oxígeno. El término "sensibilizador de células hipóxicas" como se usa en el presente documento significa un agente, tal como un fármaco de molécula pequeña, que puede imitar el oxígeno (pero no aumenta los niveles de oxígeno) y que típicamente no es metabolizado por las células tumorales, permitiendo que el agente penetre en un tumor. Los ejemplos incluyen nitroimidazoles. Los sensibilizadores de células hipóxicas, tal como 2-nitroimidazol, aumentan la destrucción de las células hipóxicas, que suelen ser radorresistentes.

El término "agente biorreductor" como se usa en el presente documento significa un agente tal como un fármaco de molécula pequeña, que puede reducirse a una especie citotóxica, por ejemplo, en una región hipóxica de un tumor. Los ejemplos incluyen los antibióticos de quinona tales como mitomicina C, niroaromáticos y di-N óxidos.

El término "radioprotector" como se usa en el presente documento, significa que se usa en el presente documento un agente tal como un fármaco de molécula pequeña o un agente biológico que hace que una célula tumoral sea menos sensible a la radioterapia.

El término "degradación de ARN", como se usa en el presente documento, significa una disminución en la integridad del ARN de la célula o tejido canceroso aislado en comparación con el ARN de las células o tejidos cancerosos no tratados, o una integridad del ARN esperada para las células cancerosas. Por ejemplo, el ARN humano (por ejemplo, aislado de células y/o tejidos primarios) se reconoce comúnmente como degradado cuando RIN es <7, y/u opcionalmente <7, menos de 6,8, menos de 6,6, menos de 6,4, menos de 6,2, menos de 6,0, menos de 5,8, menos de 5,6, menos de 5,4, menos de 5,2 o menos de 5,0 y para líneas celulares cuando RIN es por ejemplo = <8, opcionalmente <9. La degradación del ARN puede comprender la degradación del ARN inducida por el tratamiento y la degradación autolítica del ARN.

El término "degradación autolítica del ARN", como se usa en el presente documento, se refiere a la degradación de ARN que tiene lugar durante la destrucción autolítica celular. La autólisis es iniciada, por ejemplo, por los lisosomas de las células que liberan enzimas digestivas en el citoplasma debido al cese de los procesos activos en la célula, y no debido a un proceso fisiológico o fisiopatológico activo. La degradación autolítica del ARN en una muestra puede ser inducida por la eliminación de células del entorno fisiológico durante un periodo prolongado de tiempo (por ejemplo, la incubación en solución salina) y/o el cese no específico de procesos fisiológicos, por ejemplo, tratamiento térmico.

La expresión "degradación de ARN inducida por tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a

ARN degradado y/o fragmentado discretamente que se induce por señal en respuesta a un tratamiento citotóxico tal como tratamiento con radiación, tratamiento con quimioterapia y/o tratamiento con anticuerpos citotóxicos (por ejemplo, Trastuzumab). La degradación del ARN inducida por una señal citotóxica puede incluir la degradación del ARN que tiene algunas características que se asemejan a la degradación autolítica, particularmente, por ejemplo, durante etapas posteriores.

El término "integridad del ARN" como se usa en el presente documento significa el grado de integridad del ARN después de la extracción o el aislamiento de la muestra de tejido o célula, por ejemplo, si el ARN aislado está degradado. A la integridad del ARN se le puede asignar un valor (por ejemplo, un valor de la integridad del ARN) que corresponde al grado de integridad y/o degradación del ARN, por ejemplo, proporcionalmente o inversamente proporcional. Comúnmente, se considera que una alta integridad del ARN significa poca o ninguna degradación, por ejemplo, menos del 30% de disminución, menos del 25% de disminución, menos del 20% de disminución desde el valor máximo de integridad del ARN (por ejemplo, cuando el valor de la integridad del ARN se mide utilizando RIN, por ejemplo, RIN = 10 u otra escala donde el valor de integridad del ARN es proporcional a la integridad del ARN de la muestra), o menos de un aumento del 30%, menos de un aumento del 20%, por ejemplo, desde el valor inicial cuando el valor de integridad del ARN es proporcional inversamente a la integridad del ARN de la muestra, por ejemplo, RDI (por ejemplo, para una muestra *in vivo* y opcionalmente menos del 10% o el 5% de disminución o aumento para una muestra *in vitro*) y/o un valor de integridad del ARN correspondiente a un control, tal como un control de pretratamiento y retención de la capacidad para amplificar ARNm de interés después de la extracción o el aislamiento. Al usar un RDI, una alta integridad del ARN es, por ejemplo, menor de 10 o menos 3, y al usar RIN, una alta integridad del ARN es mayor de 7, mayor de 8 o mayor de 9. Una baja integridad del ARN es, por ejemplo, un ARN que presenta más del 20%, más del 25%, más del 30%, más del 35%, más del 40%, más del 45%, más del 50%, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70%, o más del 75% de disminución desde el máximo, por ejemplo, usando RIN, donde RIN máximo = 10 (u otra escala, donde el valor de integridad del ARN es proporcionar a la integridad del ARN), o presenta más del 20%, más del 25%, más del 30%, más del 35%, más del 40%, más del 45%, más del 50%, más del 55%, más del 60%, más del 65%, más del 70%, o más del 75% de aumento en un valor de integridad del ARN, por ejemplo, desde el valor inicial, por ejemplo, usando RDI (u otra escala donde el valor de integridad de ARN es inversamente proporcional a la integridad del ARN), un control tal como un control de pretratamiento o una capacidad reducida para amplificar ARNm de interés cuando se sabe que están presentes en los controles en ARN después de la extracción o el aislamiento.

El término "valor de integridad del ARN" como se usa en el presente documento es una medida del grado o extensión de integridad o degradación del ARN de una muestra después de la extracción o aislamiento de la muestra de tejido o célula. Por ejemplo, el valor de integridad del ARN puede ser una medición de la intensidad del espectrofotómetro y/o una relación de ARN ribosomal 28S:18S. El valor de integridad del ARN puede ser un número de integridad del ARN (RIN), determinado mediante un bioanalizador Agilent, el resultado del algoritmo RIN, en el que generalmente cuanto más alto sea el valor del RIN, mayor será la integridad del ARN y más bajo será el valor del RIN cuanto mayor sea la degradación del ARN. Por ejemplo, un RIN de 0 representa un ARN completamente hidrolizado y un RIN de 10 representa un ARN no degradado en absoluto. Un experto en la técnica reconocería que la escala también podría invertirse (por ejemplo, dividiendo el valor en 1, por ejemplo, 1/valor de integridad del ARN), de manera que cuanto menor sea el valor de la integridad del ARN, mayor será la integridad del ARN y cuando mayor sea el valor de integridad del ARN, menor es la integridad del ARN. Por ejemplo, el valor de integridad del ARN puede ser el resultado de un cálculo basado en las características del electroferograma como se describe en la Solicitud del Tratado de Cooperación de Patentes N.º PCT/CA2013/000408, ASSAYS, METHODS AND APPARATUS FOR ASSESSING RNA DISRUPTION, presentada el 24 de abril de 2013, por ejemplo, como un índice de alteración del ARN (RDI), o puede ser una escala transformada. Por ejemplo, para muestras de pacientes, la escala se puede definir mediante zonas de ensayo de alteración del ARN (RDA) basadas en cortes o umbrales de respuesta, en los que cada puntuación o zona RDA está asociada con una probabilidad de respuesta, por ejemplo, asociada con una probabilidad de respuesta a un tratamiento, por ejemplo, definido por NPV y/o PPV. En formas de realización en las que se emplean RDI o zonas RDA, un valor de integridad del ARN alto o aumentado (por ejemplo, en comparación con una muestra inicial o de control) es indicativo de una degradación de ARN alta o aumentada. Por ejemplo, en una forma de realización de este tipo, cuanto mayor sea el valor de integridad del ARN, mayor será la degradación del ARN inducida (y disminuirá la integridad del ARN). Se puede emplear cualquier escala, por ejemplo, 3, 10 o 600. Por consiguiente, cuando el valor de integridad del ARN es proporcional a la integridad del ARN de la muestra, un valor de integridad del ARN alto o aumentado corresponde a una integridad del ARN alta o aumentada, y cuando el valor de integridad del ARN es inversamente proporcional a la integridad del ARN de la muestra, un valor de integridad del ARN alto o aumentado corresponde a la integridad del ARN baja o disminuida. El valor de integridad del ARN se puede calcular utilizando una o varias características. También la escala empleada puede ser una escala lineal o una escala logarítmica.

El término "composición de aislamiento o estabilización de ARN", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier composición que inhibe la actividad de la ARNasa y/o estabiliza el ARN evitando la degradación del ARN.

5 El término "integridad del ARN estable" como se usa en el presente documento significa ARN que no se degrada apreciablemente, por ejemplo, en comparación con una muestra comparadora apropiada o la integridad del ARN esperada para el tipo de tejido celular. Típicamente, para los seres humanos, este es un ARN aislado con RIN => 7, y puede ser, por ejemplo, en el contexto del ARN de células tumorales => 6,8, => 6,6, => 6,4, => 6,2, => 6,0, o => 10 5,8 y para líneas celulares, por ejemplo, RIN => 9. También se pueden utilizar otras medidas que incluyen RDI.

Los términos "paciente" y "sujeto" que se usan en el presente documento de manera intercambiable se refieren a cualquier miembro del reino animal, incluidos los mamíferos, por ejemplo, perros, roedores tales como ratas y ratones, preferiblemente un ser humano, incluido por ejemplo un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer, 15 opcionalmente cáncer de mama o cáncer de ovario.

El término "ARN" como se usa en el presente documento incluye cualquier ARN o fracción de ARN, incluyendo, pero sin limitación, ARN total, ARNr y/o ARNm, de un subconjunto de ARN, por ejemplo, el ARN puede incluir el total de tipos y componentes de ARN que pueden estar presente después del aislamiento de ARN, por ejemplo ARN 20 ribosómico (ARNr), ARN mensajeros (ARNm), o fracciones que comprenden, por ejemplo, al menos ARNr. Como ejemplo, puede usarse ARN total con los métodos descritos en el presente documento o también puede usarse una clase o subconjunto de ARN. Por ejemplo, los subconjuntos de ARN que pueden ensayarse con los métodos descritos incluyen, por ejemplo, subconjuntos que comprenden ARNr y/o ARNm.

25 El término "resistente", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula cancerosa o respuesta tumoral a la radiación en solitario o en combinación con un agente o régimen citotóxico, opcionalmente quimioterapéutico, donde las células cancerosas o el subconjunto de células cancerosas dentro de un tumor no muestran o respuesta insuficiente (por ejemplo, determinable en un estudio clínico) al tratamiento en términos de degradación del ARN, que se asocia, por ejemplo, con un resultado de tratamiento negativo.

30 El término "respuesta", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula cancerosa o respuesta tumoral a la radiación en solitario o en combinación con un agente y/o régimen citotóxico, opcionalmente quimioterapéutico, donde las células cancerosas o un subconjunto de células cancerosas dentro de un tumor responden al tratamiento en términos de degradación de ARN, por ejemplo, muestran una degradación significativa 35 y/o suficiente del ARN (por ejemplo, se puede determinar en un estudio clínico), que se asocia, por ejemplo, con un resultado de tratamiento positivo.

El término "bajo riesgo", como se usa en relación con la progresión, se refiere a un riesgo menor que el promedio (por ejemplo, disminución de la probabilidad) calculado para un grupo de pacientes con el mismo cáncer, tratados de 40 manera similar; y un alto riesgo de progresión significa un riesgo mayor que el promedio (por ejemplo, mayor probabilidad) en comparación con el grupo de pacientes.

El término "índice de alteración de ARN" o "RDI" se usa en el presente documento, como se utiliza en el documento WO2013/159200, es un valor generado utilizando el ensayo de alteración de ARN (RDA) y puede ser una relación 45 de características definidas (por ejemplo, las características mostradas en la figura 12), del resultado del análisis discriminante lineal (LDA) o análisis discriminante cuadrático de las características descritas en el presente documento. El RDI es una escala logarítmica y puede calcularse utilizando las características que se muestran, por ejemplo, en la Figura 12, opcionalmente, por ejemplo, en base a $(\text{área intermedia} + \text{Área bajaC})/(\text{Área 28S} + \text{Área 18S})$. La escala RDI refleja la relación absoluta de ARN alterado/ARN normal. Los valores de RDI determinados a 50 partir de un grupo de pacientes con resultados de respuesta conocidos (por ejemplo, que se determina que están asociados con un NPV o PPV en particular) se pueden usar para definir el límite de umbrales para las zonas RDA.

El término "zonas RDA", como se usa en el presente documento, se refiere a las zonas clínicas asociadas con el resultado de la respuesta al tratamiento que comprende un rango de valores de RDI. Cada zona RDA está definida 55 por uno o dos límites, cada límite correspondiente a un umbral seleccionado (por ejemplo, correspondiente a un NPV o PPV deseado). Los valores de RDI de los sujetos que se encuentran dentro de las zonas clínicas que están asociados o son predictivos de la respuesta al tratamiento, por ejemplo, pCR y/o aumento de DFS. En una forma de realización, se pueden usar 3 zonas de ensayo de alteración de ARN, zona RDA 1, zona RDA 2 y zona RDA 3, definidas por el NPV y/o los PPV seleccionados. Un experto en la técnica se daría cuenta fácilmente de que puede

usarse cualquier número de zonas, cada una con diferentes umbrales seleccionados.

El término "zona RDA 1", como se usa en el presente documento, se refiere a un rango de puntuaciones RDA (por ejemplo, valores RDI) que tienen un valor predictivo negativo (NPV) de al menos 0,8, al menos 0,85, al menos 0,9, al menos 0,95, al menos 0,96, al menos 0,97, al menos 0,98 o mayor. Estos números y los umbrales asociados, por ejemplo, se basan en los resultados de ensayos clínicos de DFS y/o pCR para un tratamiento específico, por ejemplo, tal como un ensayo clínico tal como un ensayo clínico descrito en el Ejemplo 1 con un mayor número de pacientes. En una forma de realización de ejemplo, la Zona RDA 1 es igual a un RDI igual o menor de 10 que se calcula utilizando la función Área intermedia/(Áreas 28S + 18S). En otras formas de realización, se pueden usar otras características o una combinación de características. La "zona RDA 1" se puede definir para incluir cualquier conjunto de puntuaciones seleccionando el NPV deseado.

El término "zona RDA 2", como se usa en el presente documento, se refiere a un rango de puntuaciones RDA (por ejemplo, valores RDI) que se encuentran entre las zonas RDA 1 y 3, y se puede considerar una zona intermedia o indeterminada.

El término "zona RDA 3", como se usa en el presente documento, se refiere a un rango de puntuaciones RDA (por ejemplo, valores RDI) que tienen un valor predictivo positivo (PPV) de al menos 0,15, al menos 0,16, al menos 0,17, al menos 0,18, al menos 0,19, al menos 0,2, o mayor. Estos números y los umbrales asociados se basan, por ejemplo, en los resultados de ensayos clínicos de pCR y/o DFS para un tratamiento dado, por ejemplo, un ensayo clínico como se describe en el Ejemplo 1 con pacientes adicionales. La "zona RDA 3" se puede definir para incluir cualquier conjunto de puntuaciones seleccionando el PPV deseado.

En una forma de realización, la puntuación de respuesta a la radiación es una zona RDA 1, 2 o 3. La puntuación de respuesta de radiación también puede ser resistente, de respuesta e indeterminada.

La expresión "umbral de respuesta" o "umbral de referencia", como se usa en el presente documento, puede ser una expresión o valor de corte de la integridad del ARN y/o la concentración de ARN en una muestra predeterminada o grupo de muestras, por encima y/o por debajo de los cuales un tipo de célula cancerosa o tumor se identifica como más probablemente resistente o más probable con respuesta al tratamiento y, por ejemplo, es indicativo del resultado del paciente. Por ejemplo, que un paciente que tenga un valor de integridad del ARN indicativo de integridad del ARN y/o concentración de ARN por debajo de un umbral de corte o respuesta se indica que es más probable que responda al tratamiento con radiación y/o al régimen y/o predice un resultado de tratamiento positivo. El umbral de respuesta se puede derivar, por ejemplo, de un control, tal como un pretratamiento o una muestra no tratada, o un valor derivado de una población de sujetos que son respondedores conocidos y/o no respondedores que, para un grado preseleccionado de especificidad y sensibilidad, clasifica a los pacientes como respondedores de pacientes que probablemente sean no respondedores. En el caso de un control tal como un control de pretratamiento o un control no tratado, el umbral de respuesta puede ser la integridad del ARN esperada para (por ejemplo, cuando un valor de RIN, opcionalmente 7, 8, 9 o 10) basado, por ejemplo, en la población celular, el tratamiento, etc. Un experto en la técnica reconocerá que la dirección del cambio indicativo de un resultado peor o mejor dependerá de la escala utilizada.

El término "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a 1) cualquier fluido biológico, muestra de células o tejido de un sujeto (por ejemplo, sujeto de ensayo) o línea celular que comprende ARN celular, opcionalmente tejido/células tumorales y/o células de lecho canceroso y/o 2) ARN derivado de tal muestra. Por ejemplo, la muestra puede ser una biopsia, incluye un aspirado con aguja, tal como un aspirado con aguja fina, una biopsia de aguja gruesa, una biopsia con cepillo y/o una biopsia laparoscópica. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de "postratamiento" en la que la muestra se obtiene después de una o más dosis de radiación o tratamientos del cáncer citotóxicos, o una "muestra inicial" que opcionalmente es previa al tratamiento o se toma en una un punto de tiempo más temprano que la muestra posterior al tratamiento y, por ejemplo, se utiliza como un valor inicial para evaluar o controlar la respuesta a una radiación, opcionalmente en combinación con un tratamiento citotóxico.

Como se usa en el presente documento, y como se entiende bien en la técnica, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero sin limitación, el alivio o la mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, reversión de la enfermedad, mejoría o paliación de la patología, y remisión (ya sea parcial o total), detectable o no detectable.

"Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Al entender el alcance de la presente descripción, el término "que comprende" y sus derivados, como se usan en el presente documento, pretenden ser términos abiertos que especifican la presencia de las características, elementos, componentes, grupos, enteros y/o etapas que se indican, pero no excluyen la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, enteros y/o etapas no indicadas. Lo anterior también se aplica a palabras que tienen significados similares, tales como los términos "incluyendo", "que tienen" y sus derivados. Finalmente, los términos de grado tales como "sustancialmente", "aproximadamente" como se usan en el presente documento, significan una cantidad razonable de desviación del término modificado, de modo que el resultado final no se modifica significativamente. Estos términos de grado deben interpretarse como incluyendo una desviación de al menos $\pm 5\%$ del término modificado si esta desviación no niega el significado de la palabra que modifica.

La mención de rangos numéricos por criterios de valoración en el presente documento incluye todos los números y fracciones que se incluyen dentro de ese rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,90, 4 y 5). También debe entenderse que se supone que todos los números y fracciones de los mismos están modificados por el término "aproximadamente". Además, debe entenderse que "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Además, las definiciones y formas de realización descritas en secciones particulares pretenden ser aplicables a otras formas de realización descritas en el presente documento para las cuales son adecuadas como entendería un experto en la técnica. Por ejemplo, en los siguientes pases, diferentes aspectos de la invención se definen con más detalle. Cada aspecto así definido puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

II. Métodos

En el presente documento se describen métodos para evaluar células cancerosas que incluyen, por ejemplo, células de cáncer de mama y células de cáncer de ovario para determinar su respuesta al tratamiento con radiación.

Se describió un estudio clínico en el documento WO2009/030029, que demostró que las células de cáncer de mama demuestran una integridad del ARN reducida cuando se tratan con un agente quimioterapéutico. Los inventores también han demostrado que las líneas celulares de cáncer de ovario muestran pérdida de contenido de ARN (por ejemplo, concentración) y/o integridad en respuesta al tratamiento quimioterapéutico.

La solicitud de patente WO2013/159200 describe ensayos para evaluar la integridad del ARN, que pueden usarse en el presente documento.

Por consiguiente, un aspecto incluye un método para evaluar una muestra de células cancerosas seleccionada opcionalmente de una muestra de células de cáncer de mama y una muestra de células de cáncer de ovario, comprendiendo el método:

- a) obtener una muestra de células cancerosas, opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario, después haber expuesto las células cancerosas a una dosis de radiación;
- b) realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y/o una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas.

Un valor de integridad del ARN reducido refleja la degradación del ARN y la capacidad de respuesta al tratamiento.

En una forma de realización, el método comprende además comparar el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas con un umbral de respuesta en el que un valor de integridad del ARN disminuido y/o la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas en comparación con el umbral de respuesta es predictivo de que las células cancerosas responden a la radioterapia y una comparación o aumento del valor de integridad del ARN (es decir, indicativo de integridad del ARN comparable o aumentado) y/o la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas en comparación con el umbral de respuesta es predictivo de que las células cancerosas no responden al tratamiento con radiación.

En el presente documento se demuestra que la degradación del ARN puede detectarse en células de cáncer de mama y células de cáncer de ovario en respuesta a la exposición a la radiación. En una forma de realización, la muestra de células cancerosas es una muestra de células de cáncer de mama. En otra forma de realización, la muestra de células cancerosas es una muestra de células de cáncer de ovario.

5

La degradación del ARN se detectó, por ejemplo, después de una dosis en la línea celular de cáncer de ovario. En una forma de realización, las células cancerosas han recibido 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más dosis de tratamiento con radiación.

- 10 La degradación del ARN se detecta en células cancerosas tales como células cancerosas de cáncer de mama y cáncer de ovario tratadas con radiación y un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico. En una forma de realización, las células se tratan adicionalmente con una dosis de un agente citotóxico del cáncer, opcionalmente un agente quimioterapéutico. En una forma de realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de antraciclinas, taxanos y combinaciones de los mismos, preferiblemente en el que el agente quimioterapéutico
- 15 comprende epirrubicina, docetaxel o combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el taxano es paclitaxel, docetaxel, larotaxel, Abraxane, paclitaxel ligado a ácido docoxahexaenoico, paclitaxel poliglumex, Ortataxel, Genexol, paclitaxel encapsulado en liposomas, y paclitaxel en una emulsión de vitamina E. En una forma de realización adicional, el taxano es docetaxel o paclitaxel.

- 20 En una forma de realización, al paciente se administra un agente radiosensibilizante. En una forma de realización, el agente radiosensibilizante se selecciona de una diversidad de clases de compuestos, incluyendo oxígeno, sensibilizadores de células hipóxicas, pirimidinas halogenadas y agentes biorreductores.

Un valor de integridad del ARN disminuido refleja la degradación del ARN, principalmente la degradación de los

- 25 ARNr altamente abundantes. En una forma de realización, la muestra de ARN es ARN total. En otra forma de realización, la muestra de ARN es y/o comprende ARNr. En otra forma de realización, la muestra de ARN es y/o comprende ARNm.

- El método puede usarse, por ejemplo, para probar la sensibilidad de un tumor a un agente sensibilizador de la radiación y/o cribar compuestos que radiosensibilicen las células cancerosas o mejoren de otro modo la respuesta al
- 30 tratamiento con radiación. Por ejemplo, las células pueden pretratarse *in vitro* con un compuesto y posteriormente exponerse a radiación. El grado de los cambios de integridad y concentración del ARN se puede usar para cribar compuestos. Por consiguiente, en otra forma de realización, las células se ponen en contacto con un compuesto para determinar si el compuesto es un sensibilizador de radio y/o un radioprotector. Como se demuestra en los
- 35 ejemplos, las combinaciones de quimioterapia y radiación pueden dar como resultado aumentos prominentes en la degradación del ARN en comparación con el tratamiento de quimioterapia o el tratamiento con radiación en solitario. Por consiguiente, en una forma de realización, el método es para identificar combinaciones sinérgicas de un agente de ensayo y la radiación.

- 40 En una forma de realización, el método comprende: i) exponer las células a una dosis fija o radiación y una dosis creciente del agente de ensayo y ii) evaluar la integridad del ARN de las células, en el que un compuesto de ensayo que reduce la integridad del ARN en comparación con un control es un sensibilizador de radiación y la integridad del ARN es un radioprotector contra la radiación.

- 45 Un ejemplo de una criba sería realizar el ensayo de integridad del ARN con dosis fijas de radiación y evaluar la capacidad del radioprotector o del radiosensibilizador para reducir o aumentar el grado de degradación del ARN, respectivamente. El grado de degradación del ARN en las diversas dosis de radiación en ausencia o presencia del radiosensibilizador o radioprotector se puede usar para determinar las LD50 en ausencia o presencia del agente, para cuantificar el grado de protección/sensibilización.

50

La extensión de la respuesta se puede evaluar, por ejemplo, comparando con un umbral de respuesta. Por ejemplo, el umbral de respuesta para formas de realización *in vitro* puede comprender un control no tratado o un valor que corresponde a un control *in vitro*. Por ejemplo, las líneas celulares generalmente tienen poca o ninguna degradación de ARN si se manejan de manera apropiada utilizando métodos que se conocen en la técnica. Por lo tanto, el umbral

55 de respuesta puede ser un valor seleccionado, por ejemplo, 9, 8 o 7. En una forma de realización, el umbral de respuesta se deriva de una muestra no tratada y/o es un estándar derivado de una pluralidad de muestras no tratadas.

El umbral de respuesta también puede ser un umbral preseleccionado derivado, por ejemplo, de muestras tratadas o

no tratadas, tal como una mediana o un promedio. En otra forma de realización más, el umbral de respuesta se deriva de una muestra que no responde y/o una muestra sensible y/o es un estándar derivado de una pluralidad de muestras que no responden y/o muestras sensibles.

5 Como se menciona anteriormente, las células cancerosas, tales como células de cáncer de mama y de cáncer de ovario, pueden cribarse *in vitro*. Las pruebas también se pueden realizar *in vivo* utilizando, por ejemplo, un modelo animal donde se implantan células cancerosas, al animal se le administra radiación en solitario o en combinación con un agente de ensayo y la respuesta se controla. Por consiguiente, en otra forma de realización, las células cancerosas se exponen a radiación *in vitro* o *in vivo*.

10 La célula cancerosa está en una forma de realización *in vivo* en un paciente.

En una forma de realización, el paciente se trata con radiación y/o quimioterapia antes de la cirugía. Cuando se administran después de la cirugía, los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para controlar la
15 respuesta a la quimioterapia/radioterapia, por ejemplo, en cualquier tumor recurrente.

Las células *in vivo* pueden experimentar una mayor degradación del ARN inducida por la señal. Las células en cultivo, por ejemplo, no están sometidas a los efectos antivascuales de la radiación (Fenton et al., 2001; El Kaffas et al., 2013), lo que podría esperarse que redujera la integridad del ARN.

20 Como se demuestra, por ejemplo, en la Figura 4b, los pacientes que mostraron una respuesta patológica completa (pCR) tenían una integridad del ARN disminuida y una concentración de ARN disminuida después del tratamiento cuando se trataron con FEC-D y radiación.

25 Un aspecto adicional incluye un método para evaluar una muestra de células de cáncer derivadas de pacientes, comprendiendo el método:

- a) obtener una muestra de células cancerosas de un sujeto después de que el sujeto haya estado expuesto a una dosis de radiación;
- 30 b) realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y opcionalmente una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas.

En una forma de realización, el método comprende además comparar el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas del paciente con un umbral de
35 respuesta en el que una disminución de la integridad del ARN disminuida y/o la concentración de ARN de la muestra de células cancerosas del paciente en comparación con el umbral de respuesta es predictiva de que el paciente responde a la radioterapia y una integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN comparable o mayor de la muestra de células cancerosas del paciente en comparación con el umbral de respuesta es predictiva de que el paciente no responde al tratamiento con radiación.

40 En una forma de realización, la muestra de células cancerosas se selecciona de una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario.

En una forma de realización, la muestra de células cancerosas se selecciona de una muestra de células de cáncer
45 de mama o una muestra de células de cáncer de ovario. Por ejemplo, la muestra de células cancerosas se puede obtener en una biopsia citológica o histológica. La biopsia puede ser, por ejemplo, una biopsia con aguja gruesa o aspirado con aguja fina o una biopsia o resección obtenida durante la cirugía.

Por ejemplo, para el cáncer de ovario, la muestra de células puede comprender líquido peritoneal y/o ser un raspado
50 celular, un aspirado con aguja fina de tumor (FNA) y/o una biopsia con aguja gruesa.

En una forma de realización, la respuesta es una respuesta terapéutica, por ejemplo, la respuesta celular del cáncer de mama o del cáncer de ovario al tratamiento y/o al régimen con radiación es suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico al sujeto. La respuesta terapéutica es, por ejemplo, predictiva del resultado clínico posterior al
55 tratamiento.

En una forma de realización, el resultado clínico es un resultado de tratamiento positivo. En otra forma de realización, el resultado del tratamiento es un resultado de tratamiento negativo.

La extensión o grado de degradación del ARN puede asociarse con la respuesta al tratamiento. La degradación extensa, por ejemplo, puede asociarse con una respuesta patológica completa. Un menor grado de degradación puede asociarse con una respuesta completa menor que la patológica. Por ejemplo, un sujeto puede no lograr una patología completa, pero puede presentar cierta degradación del ARN durante y/o después del tratamiento. Tal sujeto puede ser tratado, por ejemplo, en un régimen de tratamiento posterior de manera menos agresiva que un sujeto sin respuesta.

En una forma de realización, el resultado de tratamiento positivo predicho es una respuesta patológica completa después del tratamiento. En una forma de realización, el resultado positivo del tratamiento predicho es un riesgo reducido de progresión de la enfermedad, mayor probabilidad de supervivencia sin enfermedad y/o mayor supervivencia global. En una forma de realización, el resultado de tratamiento negativo predicho es un mayor riesgo de progresión de la enfermedad, disminución de la supervivencia y/o de recidiva. El riesgo de progresión de la enfermedad, la duración de la supervivencia sin enfermedad y/u otros resultados son, por ejemplo, relativos al riesgo promedio o medio de progresión de los respondedores y/o no respondedores de pacientes con la misma enfermedad y/o tratamiento.

Como se demuestra, por ejemplo, en la Figura 4b, los respondedores no PCR podrían segregarse de los respondedores patológicos completos en términos de integridad del ARN en solitario o en combinación con la concentración de ARN.

Otro aspecto incluye un método para identificar pacientes que no responden que comprende:

- a) obtener una muestra de células cancerosas del paciente después de que el paciente haya estado expuesto a una dosis de radiación;
- b) realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y/o una concentración de ARN;
- c) comparar con un umbral de respuesta; y
- c) identificar a los pacientes que tienen un valor de integridad del ARN indicativo de la integridad del ARN y/o la concentración de ARN que está por encima del umbral de respuesta.

En una forma de realización, el cáncer se selecciona de una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario.

Otro aspecto adicional incluye un método para predecir un resultado de tratamiento de un paciente que tiene cáncer, tal como cáncer de mama o cáncer de ovario, comprendiendo el método: realizar un ensayo con una muestra de células cancerosas obtenida del sujeto para obtener un valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN para la muestra de células cancerosas, en el que el sujeto ha sido tratado con una dosis de radiación, en el que una integridad del ARN indicada por el valor de integridad del ARN que está por debajo de un umbral de respuesta predice la respuesta del sujeto/cáncer al tratamiento con radiación y un menor riesgo de progresión; y una integridad del ARN indicada por el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN que es superior al umbral de respuesta predice la resistencia del sujeto/cáncer al tratamiento con radiación y un mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

En una forma de realización, un valor RDI de 3 o menos indica una falta de respuesta a la radiación, por ejemplo, en el que RDI se calcula basándose en $(\text{Área Intermedia} + \text{Área BajaC})/(\text{Área 28S} + \text{Área 18S})$.

Los métodos pueden emplearse, por ejemplo, en un método de tratamiento.

Por consiguiente, un aspecto adicional incluye un método de tratamiento que comprende:

- a) exponer a un paciente con cáncer, opcionalmente cáncer de mama o cáncer de ovario, a una dosis de radiación;
- b) obtener una muestra de células cancerosas después de la administración de la dosis de radiación,
- c) realizar un ensayo con la muestra de células cancerosas para obtener un valor de integridad del ARN y/o una concentración de ARN de la muestra de células cancerosas; y
- d) continuar el tratamiento cuando la integridad del ARN (por ejemplo, como se indica por el valor de la integridad del ARN) y/o la concentración del ARN se disminuye en comparación con un umbral de respuesta y cambiar el tratamiento cuando el valor de integridad del ARN y/o la concentración del ARN sea comparable o se aumentó en comparación con el umbral de respuesta.

El tratamiento se puede cambiar, por ejemplo, empleando agentes radiosensibilizantes durante la radioterapia, modificando la dosis y/o el horario de la radiación y/o la quimioterapia y/o añadiendo o cambiando la quimioterapia.

5 En una forma de realización, la muestra de células cancerosas es una muestra de células de cáncer de mama obtenida de una paciente con cáncer de mama. En otra forma de realización, el cáncer de mama es Her2+, subtipo basal o subtipo luminal B. En otra forma de realización, el paciente con cáncer de mama tiene cáncer de mama localmente avanzado (LABC).

10 En otra forma de realización, la muestra de células cancerosas es una muestra de células de cáncer de ovario obtenida de una paciente con cáncer de ovario.

En otra forma de realización, las células cancerosas se seleccionan de cáncer endometrial, cáncer de piel no melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cuello del útero, cáncer anal o cáncer de próstata. La sensibilidad a la radiación puede variar, dependiendo del subtipo de tumor, por ejemplo, como en el cáncer de pulmón (Johung et al. 2013 Clin Cancer Res. 19(22)) y cánceres endometriales (Ruyck et al. Int. J. Radiation Oncol.Biol Phys. 65: 1240), así como cáncer de mama (Djuzenova et al, Radiation Oncology 8:98).

20 Puede usarse radiación para tumores sensibles a la radiación incluyendo, por ejemplo, linfoma, liposarcoma, a menudo en combinación con quimioterapia. La radiación se usa a menudo para cánceres localizados no accesibles a la cirugía y para la paliación local de los cánceres menos sensibles a la radiación que se han diseminado y son resistentes a la quimioterapia. Por consiguiente, en una forma de realización, las células cancerosas son de cáncer seleccionado de linfoma y liposarcoma.

25 La integridad del ARN puede usarse para predecir la respuesta en pacientes. El cáncer de mama y las células de cáncer de ovario han aumentado la degradación del ARN incluso en ausencia de fármaco; como se ve, por ejemplo, en células MCF-7 y A2780 descritas en los Ejemplos.

30 Las células MCF-7 y SkBr3 muestran ambos efectos de la degradación de ARN inducida por señal que se detectan por RDI. Las células MCF-7 también tienen efectos de degradación de ARN comparables causados por la epirubicina y/o el docetaxel.

Los tumores de cáncer de mama tienen respuestas variables a la radioterapia⁶³. Las firmas moleculares/expresión de proteínas de choque térmico están actualmente bajo investigación como indicadores de la respuesta a la radiación. Los marcadores que pueden identificar qué tumores están respondiendo serán útiles.

La radiación puede causar daño en el ADN y daño en el ARN^{64,65}.

40 El daño al ARN inducido por radiación se ha identificado en linfocitos⁶⁵, células MCF-7⁶⁶ y células HeLa⁶⁷.

En una forma de realización, el umbral de respuesta comprende un valor de integridad del ARN. En una forma de realización adicional, el umbral de respuesta comprende tanto un valor de integridad del ARN como un valor de concentración.

45 El umbral de respuesta puede derivarse de un paciente con cáncer no tratado, tal como un paciente con cáncer de mama o cáncer de ovario, o puede ser un estándar derivado de una pluralidad de pacientes con cáncer no tratados (por ejemplo, células derivadas de pacientes con cáncer de mama o cáncer de ovario no tratados u obtenidas antes del tratamiento, por ejemplo, de una o más muestras de pretratamiento, por ejemplo, controles).

50 Por ejemplo, el umbral de respuesta corresponde a un valor de integridad del ARN de pretratamiento y, opcionalmente, a la concentración de ARN. Por ejemplo, el umbral de respuesta puede corresponder al valor de integridad del ARN de una muestra de ARN de biopsia tomada del sujeto o de dos o más sujetos antes de iniciar la terapia o valores de referencia de tumores de pacientes similares antes de la terapia. Una disminución en la integridad del ARN en comparación con el valor de integridad del ARN de pretratamiento indicará, por ejemplo, una respuesta al tratamiento y/o un resultado de tratamiento positivo y, por ejemplo, un valor de integridad del ARN comparable del ARN de las células cancerosas con el valor de la integridad del ARN de pretratamiento, indicará un resultado de tratamiento negativo.

El umbral de respuesta también puede derivarse de un paciente cuya respuesta es conocida (por ejemplo, respondedor o no respondedor) o ser un estándar derivado de una pluralidad de pacientes cuya respuesta es conocida.

- 5 En una forma de realización, el umbral de respuesta se deriva de una muestra de células de cáncer de paciente que no responde y/o una muestra de células de cáncer de paciente que responde y/o es un estándar derivado de una pluralidad de muestras de células de cáncer de paciente que no responde y/o una pluralidad de muestras de células cancerosas pacientes que responden.
- 10 En formas de realización, un valor de integridad del ARN del paciente indicativo de la integridad del ARN y/o una concentración de ARN que está por debajo de un umbral de respuesta es indicativo de que el cáncer está respondiendo al tratamiento con radiación (y/o radiación más agente y/o régimen quimioterapéutico) y/o predice un resultado de tratamiento positivo; y/o un valor de integridad del ARN del paciente o la integridad del ARN y/o una concentración de ARN que es mayor que un umbral de respuesta es indicativo de que el cáncer es resistente al
- 15 tratamiento con radiación (y/o radiación más agente y/o régimen quimioterapéutico) y/o predice un resultado de tratamiento negativo.

En una forma de realización, el umbral de respuesta es un valor de integridad del ARN de referencia o de corte de sujetos con el mismo tipo de tumor o similar y/o radiación que comprende un régimen de tratamiento - sujetos con un

- 20 valor de integridad del ARN indicativo de una integridad del ARN y/o una concentración de ARN que está por debajo o es inferior al umbral de respuesta se predice (por ejemplo, tienen una mayor probabilidad) que tienen una respuesta de tratamiento positiva, y/o sujetos con un valor de integridad del ARN indicativo de una integridad del ARN y/o una concentración de ARN que está por encima o es superior al umbral de respuesta, se predice que tienen una respuesta de tratamiento negativa.
- 25 En otra forma de realización, el umbral de respuesta corresponde al valor de integridad del ARN medio (por ejemplo, promedio) y/o la concentración de ARN media para respondedores y/o no respondedores, por ejemplo. En una forma de realización, el valor medio de la integridad del ARN es un promedio de la integridad media del ARN en muestras de células cancerosas o muestras de células de cáncer de ovario de sujetos con cáncer, respectivamente,
- 30 que responden a un tratamiento con radiación (en solitario o en combinación con un agente quimioterapéutico) y/o el valor medio de integridad del ARN es un promedio de la integridad media del ARN en muestras de células cancerosas de sujetos con cáncer que no responden al tratamiento. En otra forma de realización, el umbral de respuesta corresponde a un umbral de alto valor predictivo negativo o positivo o elevada área bajo la curva por el análisis de la curva del operador del receptor u otros métodos de análisis de probabilidad.

- 35 En una forma de realización, se puede usar más de un umbral de respuesta. Por ejemplo, los valores de integridad del ARN medidos utilizando RDA junto con o separados de la concentración de ARN se pueden estratificar en múltiples zonas, tales como tres zonas, por ejemplo, Zona 1: no respondedores, alto valor predictivo negativo, Zona 2: intermedio para incluir respondedores parciales (algún efecto farmacológico pero insuficiente para lograr la
- 40 respuesta; esta zona puede incluir, por ejemplo, hasta el 15% de los respondedores), y Zona 3: que se selecciona para incluir, por ejemplo, el 85% de los respondedores, tal como los respondedores patológicos completos y los sujetos con mayor supervivencia sin enfermedad (DFS), alto valor predictivo positivo. Se ha encontrado, por ejemplo, que los pacientes tratados con quimioterapia y que demuestran una degradación del ARN inducida por señal que está dentro de la zona 3 han aumentado la DFS incluso si no presentan pCR. El aumento de la DFS es similar a la
- 45 población pCR. Se espera que la radiación que comprende regímenes en los que el valor de integridad del ARN identifique de manera similar a los pacientes que se encuentran en la zona 3, tenga un beneficio de DFS similar. Se podrían usar otras escalas y/o formatos para la evaluación de riesgos basados en datos de integridad del ARN, como se entenderá por un experto en la técnica.

- 50 La RDA que se puede usar para evaluar los cambios de integridad del ARN inducidos por la radiación, en al menos una forma de realización, comprende obtener al menos un conjunto de datos de electroferograma correspondiente a una muestra de células cancerosas que comprende el ARN celular opcionalmente en un punto dado antes, durante o después del tratamiento; determinar los valores para las características de al menos un conjunto de datos de electroferograma utilizando dos rangos de identificación para acomodar los posibles desplazamientos de los picos
- 55 18S y 28S, detectar los picos 18S y 28S, y calcular las características derivadas, al menos en parte, basándose en los picos 18S y 28S localizados; y, opcionalmente, determinar una puntuación RDA basada en una combinación de los valores de las características.

En una forma de realización, el método comprende obtener al menos un conjunto de datos de electroferograma

correspondiente a una muestra de células cancerosas que comprende ARN celular en un punto de tiempo antes, durante o después del tratamiento; determinar valores para características de al menos dos regiones desplazadas de al menos un conjunto de datos de electroferograma, debiéndose el cambio al tratamiento; y, opcionalmente, determinar una puntuación RDA basada en una combinación de los valores de las características.

5

En una forma de realización, la RDA, comprende acceder al menos a un conjunto de datos de electroferograma correspondiente a una muestra biológica única que comprende ARN celular en un punto de tiempo antes, durante o después del tratamiento; determinar los valores para las características de al menos un conjunto de datos de electroferograma utilizando dos regiones de identificación para acomodar los posibles desplazamientos de los picos

10

18S y 28S, detectar los picos 18S y 28S, y calcular las características derivadas en parte con base a los picos 18S y 28S localizados; y, opcionalmente, determinar una puntuación RDA basada en una combinación de los valores de las características.

En otra forma de realización, el método RDA comprende obtener al menos un conjunto de datos de electroferograma correspondiente a una muestra de células cancerosas que comprende el ARN celular en un punto de tiempo; definir un pico 18S y un pico 28S de al menos un conjunto de datos de electroferograma; determinar al menos un valor de parámetro para el pico 18S y el pico 28S; redefinir al menos uno de los picos 18S y 28S cuando sea necesario de acuerdo con una o más reglas aplicadas al menos a un valor de parámetro; determinar un área de pico 18S y un área de pico 28S; y determinar una puntuación RDA basada en al menos una del área de pico 18S y el área de pico

20

La Figura 12 muestra diferentes características del electroferograma que pueden usarse para calcular los valores RDI.

25

Por ejemplo, las características pueden incluir una o más del área de un pico 18S, el área de un pico 28S, el área de una región de banda intermedia, el área de una región de banda baja, el área de una o más subregiones de banda, y el área total. El área total es la suma del área del pico 18S, el pico 28S, la región de banda intermedia y la región de banda baja. Otras características pueden incluir uno o más del ancho del pico 18S y el ancho del pico 28S. El área de estos picos y regiones se puede calcular en general utilizando técnicas matemáticas bien conocidas, tal como la

30

regla trapezoidal para la integración numérica (Atkinson, 1989).

La región de banda baja también se puede dividir en las sub-regiones o regiones de banda "baja C", "baja B" y "baja A" como se muestra en la Figura 12 para su uso en algunos métodos de RDA. Se ha encontrado que la región de banda baja A puede contener ARN debido a la degradación autolítica, así como también debido a otros efectos y

35

que la región de banda baja C es una región importante para evaluar el efecto sobre el ARN debido a diversos estímulos externos, tal como los tratamientos citotóxicos, por ejemplo. También se ha encontrado que, en respuesta a ciertos fármacos, el ARN comienza a extenderse a la región de banda baja C, luego a la región de banda baja B y después a la región de banda baja A.

40

En una forma de realización, la combinación de características comprende una relación del área del pico 28S con respecto al área del pico 18S, que se puede representar mediante las expresiones "área 28S/área 18S" o "28S:18S".

En una forma de realización, la combinación de características para RDA comprende una relación del área de la región de banda intermedia con respecto a la adición del área del pico 18S en la región 18S desplazada y el área del

45

pico 28S en la región 28S desplazada, que se puede representar por la expresión "área intermedia/(área 18S + área 28S)". En una forma de realización, la combinación de características es $(\text{Área intermedia} + \text{Área baja C})/(\text{Área 28S} + \text{Área 18S})$.

En otra forma de realización, la combinación de características para RDA comprende una relación del área de la región de banda intermedia con respecto a la adición del área del pico 18S en la región 18S desplazada y el área del

50

pico 28S en la región 28S desplazada, que se puede representar por la expresión "área de banda baja/(18S+28S)".

En una forma de realización, los RDI se estratifican en 3 zonas.

55

La concentración de ARN cuando se representa frente a los valores de integridad del ARN, tal como los valores de RDI, puede proporcionar información adicional. Por ejemplo, cuanto menor sea la concentración de ARN en la muestra, para un RDI dado, menor será la cantidad absoluta de ARN normal residual presente.

En otra forma de realización, el umbral de respuesta se selecciona entre una integridad media máxima del ARN, la

integridad mediana máxima del ARN, la integridad media del ARN, la integridad mediana del ARN, la integridad media mínima del ARN y la integridad mediana mínima del ARN de los respondedores y/o no respondedores.

En otra forma de realización, el umbral de respuesta se selecciona entre una concentración media máxima del ARN, la concentración mediana máxima del ARN, la integridad media del ARN, la concentración mediana del ARN, la concentración media mínima del ARN y la concentración mediana mínima del ARN de los respondedores y/o no respondedores.

En una forma de realización, el valor de integridad del ARN se compara con un umbral de respuesta cuando, por ejemplo, el umbral de respuesta se deriva de un control tal como un control de pretratamiento o un control no tratado, por ejemplo, mediante uno o más métodos de análisis de probabilidad. Por ejemplo, el control puede ser un control de sujeto, tal como una muestra de pretratamiento del sujeto. En una forma de realización, cuando el control es un control de sujeto de pretratamiento, una disminución en el valor de la integridad del ARN y/o una concentración de ARN en comparación con el control de sujeto de pretratamiento es indicativa de la respuesta al cáncer y/o un resultado de tratamiento positivo. En otra forma de realización, cuando el control es un control de sujeto de pretratamiento, un valor de integridad del ARN comparable y/o una concentración de ARN - y/o un valor de integridad del ARN estable y/o concentración de ARN - en comparación con el control de sujeto de pretratamiento es indicativo de la resistencia del cáncer al tratamiento con radiación y/o un resultado de tratamiento negativo después del tratamiento. El control puede ser un control de pretratamiento de la población, por ejemplo, un valor de integridad del ARN promedio, mínimo o máximo o la concentración de ARN o rango de referencia para dos o más sujetos con cáncer, opcionalmente cáncer de mama u ovario, antes del tratamiento.

En una forma de realización, el umbral de respuesta predictivo de capacidad de respuesta comprende la disminución de la integridad del ARN y/o la concentración en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, o al menos un 90% por debajo de un control no tratado, tal como un valor de pretratamiento.

En una forma de realización, el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN indicativo de la capacidad de respuesta y/o un resultado de tratamiento positivo disminuye al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% por debajo de un control, tal como una muestra de pretratamiento.

En una forma de realización, el valor de integridad del ARN y/ la concentración de ARN indicativos de resistencia (por ejemplo, o no respondedores) y/o un resultado de tratamiento negativo disminuye menos del 40%, menos del 35%, menos del 30%, menos del 25%, menos del 20%, o menos del 10% o se aumentó o es comparable con respecto a un control.

En otra forma de realización, la muestra de células cancerosas se obtiene después de que el paciente ha recibido 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más dosis de tratamiento con radiación. En una forma de realización, la muestra de células cancerosas se obtiene después de que el paciente haya completado el tratamiento con radiación y, opcionalmente, cualquier tratamiento complementario.

En una forma de realización, el tratamiento del paciente comprende una dosis de un agente quimioterapéutico.

En la práctica clínica, la radiación puede seguir a la quimioterapia. Es probable que la combinación, ya sea secuencial o concurrente, dé como resultado una mayor degradación del ARN inducida por señal.

En una forma de realización adicional, el agente quimioterapéutico se selecciona de antraciclinas, taxanos y combinaciones de los mismos, preferiblemente, en el que preferiblemente el agente quimioterapéutico comprende epirubicina, docetaxel sunitinib o combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el taxano es paclitaxel, docetaxel, larotaxel, Abraxane, paclitaxel ligado a ácido docoxahexaenoico, paclitaxel poliglumex, Ortataxel, Genexol, paclitaxel encapsulado en liposomas, y paclitaxel en una emulsión de vitamina E.

En una forma de realización, el taxano es docetaxel o paclitaxel.

En una forma de realización, el agente quimioterapéutico se administra en un régimen de quimioterapia, por ejemplo, posterior a una o más dosis de radiación. En otra forma de realización, una o más muestras de células cancerosas que comprenden ARN de células cancerosas, se obtienen una o más veces durante la quimioterapia (después de 1, 2, 3 o 4 ciclos, y/o cualquier número de ciclos o dosis) y/o después de la finalización del régimen de quimioterapia.

En otra forma de realización, una o más muestras de ARN corresponden a muestras de células de cáncer de mama o de ovario obtenidas en una o más veces durante la quimioterapia (después de 1, 2, 3 o 4 ciclos, y/o cualquier número de ciclos o dosis) y/o después de la finalización del régimen de quimioterapia.

5 Las muestras de células cancerosas se tratan de una manera para minimizar la actividad de la ARNasa, por ejemplo, las muestras de células cancerosas se ponen inmediatamente en un conservante de ARN como RNAlater (Qiagen) u otro reactivo de estabilización de ARN o el conservante de ARN con inhibidor de ARNasa o se ultracongelan, por ejemplo, a -80°C, por ejemplo, utilizando nitrógeno líquido. Un experto en la técnica estará familiarizado con las etapas tomadas para obtener y almacenar muestras de células cancerosas y ARN.

10 En una forma de realización, el ARN se aísla de la muestra de células cancerosas y el valor de integridad del ARN y/o la concentración de ARN se mide en el ARN aislado.

En una forma de realización, el ARN se aísla/purifica de la muestra de células cancerosas, opcionalmente la muestra de células de cáncer de mama o la muestra de células de cáncer de ovario que se obtiene del paciente. Por ejemplo, el ARN puede aislarse utilizando métodos y kits conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aislamientos basados en Trizol, kits basados en columnas, tales como columnas de extracción de ARN total y kits. Un ejemplo de un método de aislamiento de ARN se proporciona en el Ejemplo 1. En otra forma de realización, el método se realiza en ARN preaislado/purificado.

20 En una forma de realización, el método comprende obtener una muestra de células cancerosas, opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario después de que el paciente (o las células) hayan recibido una dosis de radiación, aislamiento y/o purificación de ARN de la muestra de células cancerosas para proporcionar una muestra de ARN aislada/purificada que comprende ARN de células cancerosas.

25 La muestra de ARN se analiza para determinar la integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN.

El valor de integridad del ARN puede determinarse, por ejemplo, mediante cualquier método que evalúe el estado de la degradación del ARN en el ARN de las células cancerosas.

30 En una forma de realización, el ARN evaluado está desnaturalizado. En una forma de realización, el ARN evaluado no está desnaturalizado.

En una forma de realización, el valor de la integridad del ARN se determina calculando un número de integridad del ARN (RIN), por ejemplo, usando un método que implica el uso de microfluidos, electroforesis microcapilar y tintes fluorescentes, por ejemplo, utilizando una máquina de bioanalizador Agilent, un sistema de electroforesis capilar Experion® con su índice de calidad de ARN equivalente (RQI), Nanodrop® (Thermo Scientific, Inc.) u otros sistemas equivalentes, tales como los fabricados por Applied Biosystems, Lumex o Beckman Coulter Corporation o un sistema similar. En una forma de realización, el método comprende separar el ARN mediante electroforesis microcapilar, detectar ARN, por ejemplo, con un colorante fluorescente y cuantificar la integridad del ARN.

40 Recientemente, la electroforesis microcapilar se ha usado cada vez más para evaluar la integridad del ARN, particularmente porque solo se requieren cantidades en nanogramos de ARN. Una de estas plataformas, el bioanalizador Agilent® 2100 (Agilent Technologies, Inc., EE. UU.) utiliza la tecnología de microfluidos para realizar separaciones electroforéticas de ARN de forma automatizada y reproducible (Mueller, O. et al., Electrophoresis 21 (2000) 128-134). El bioanalizador Agilent® 2100 ahora se usa en muchos laboratorios para evaluar la integridad del ARN. El desarrollo del software para el bioanalizador Agilent® permite el cálculo de un número de integridad del ARN (RIN) para cada muestra después de la electroforesis capilar. (Schroeder, A. et al., BMC. Mol. Biol. 7 (2006) 3; Imbeaud, S. et al. Nucl. Acids Res. (2005), 33, 6, e56, 1-12). Este software incorpora un algoritmo que cuantifica las cantidades de múltiples ARN en el electroferograma de una muestra de ARN dada y asigna un valor de RIN basado en esta evaluación.

55 Por ejemplo, el bioanalizador Agilent usa colorantes fluorescentes que se unen al ácido nucleico para evaluar la concentración e integridad del ARN. El ARN se mueve a través de un canal de separación de un chip de ARN, y el colorante intercalante se une al ARN. La fluorescencia de estas moléculas se mide a medida que pasan por un detector.

En una forma de realización, se evalúan entre 20-250 ng de ARN o cualquier número intermedio. En otra forma de realización, se evalúan aproximadamente 0,5 ng aproximadamente 1 ng, aproximadamente 5 ng, aproximadamente 10 ng, aproximadamente 20 ng, aproximadamente 30 ng, aproximadamente 40 ng, aproximadamente 50 ng. En otra

forma de realización, la concentración de la muestra de ARN es opcionalmente al menos 5 ng/μl, al menos 6 ng/μl, al menos 7 ng/μl o al menos 8 ng/μl.

En una forma de realización, el valor de integridad del ARN se expresa como un número de integridad del ARN (RIN), en el que el RIN comprende un cálculo de la integridad del ARN de múltiples ARN, preferiblemente en el que el RIN se calcula utilizando uno o más de un algoritmo de RIN, un sistema de electroforesis analítica, o un chip de ARN.

En una forma de realización, un RIN indicativo de la capacidad de respuesta al cáncer y/o resultado de tratamiento positivo es menor de 4,5, menor de 3,5, menor de 3, menor de 2,5, menor de 2, menor de 1,5 y/o menor de 1. Por consiguiente, en una forma de realización, el umbral de respuesta es aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 3,9, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2, aproximadamente 1,5 o aproximadamente 1 y un RIN de células cancerosas por debajo del umbral de respuesta es indicativo de una respuesta y/o resultado de tratamiento positivo.

En una forma de realización, un RIN indicativo de resistencia al cáncer y/o resultado de tratamiento negativo es mayor de 5, mayor de 5,5, mayor de 6, mayor de 6,1, mayor de 6,2, mayor de 6,3, mayor de 6,4, mayor de 6,5, mayor de 7, mayor de 7,5 o mayor de 8 y un RIN de células cancerosas mayor que un umbral de respuesta de aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8 es indicativo de resistencia y/o resultado de tratamiento negativo.

En una forma de realización, la integridad del ARN se mide calculando una relación ribosómica (ARNr) 28S:18S (por ejemplo, una relación de ARNr 28S/18S).

Se puede determinar una relación de ARNr 28S:ARNr 18S, por ejemplo, utilizando, por ejemplo, sistemas de gel de agarosa desnaturizantes que pueden incluir, por ejemplo, formaldehído y tampón MOPs, o gloxal en el tampón de carga, para desnaturizar el ARN permitiendo que las moléculas se ejecuten por tamaño. Las bandas de ARNr 28S y 18S se pueden visualizar, por ejemplo, mediante tinción con bromuro de etidio u otros colorantes más sensibles, tal como RiboGreen®.

Por ejemplo, la integridad del ARN puede evaluarse mediante la visualización de bandas de ARN bajo luz ultravioleta después de la electroforesis en gel y la tinción del gel con bromuro de etidio. Típicamente, los valores de intensidad para las bandas de ARNr 28S y 18S se determinan mediante densitometría de película y se calcula una relación de ARNr 28S/18S. El ARN se considera de alta calidad si la proporción de ARNr 28S/18S es aproximadamente 2,0 o superior.

En una forma de realización, el valor de integridad del ARN y/o la relación de ARNr 28S:18S se determina utilizando espectroscopia, por ejemplo, evaluando la absorbancia de UV a 280:260. En una forma de realización, el valor de integridad del ARN es una relación de ARNr 28S y ARNr 18S.

En una forma de realización adicional, el valor de integridad del ARN se determina evaluando la integridad del ARN de un subconjunto de ARN o fracción de ARN total. En una forma de realización, el ARN es ARN total, ARN ribosómico o ARNm.

La concentración de ARN se puede determinar mediante una serie de métodos que incluyen, por ejemplo, electroforesis microcapilar, por ejemplo, utilizando una máquina de bioanalizador Agilent, un sistema de electroforesis capilar Experion® con su índice de calidad de ARN equivalente (RQI), Nanodrop® (Thermo Scientific, Inc.) u otros sistemas equivalentes, tales como los fabricados por Applied Biosystems, Lumex o Beckman Coulter Corporation o un sistema similar. La concentración de ARN puede basarse en la absorbancia UV, por ejemplo, evaluando la absorbancia UV a 280:260. Cualquiera y/o ambas concentraciones de ARN pueden ser evaluadas.

En una forma de realización, se mide el valor de integridad del ARN. En otra forma de realización, se miden tanto la concentración de ARN como la integridad del ARN.

Además, se pueden evaluar una o más muestras de cáncer. Por ejemplo, se pueden obtener muestras antes de comenzar el tratamiento con radiación, después de una o más dosis y/o al finalizar.

En otra forma de realización, se obtienen dos o más muestras de células cancerosas. Por ejemplo, las muestras pueden tomarse en diferentes puntos de tiempo, por ejemplo, después de 1 dosis, después de 3 dosis de radiación y/o en combinación con un tratamiento citotóxico, opcionalmente de quimioterapia.

- 5 En una forma de realización, la biopsia se divide en dos o más muestras de células cancerosas y se aíslan/purifican dos o más muestras de ARN a partir de las muestras de cáncer y el valor de integridad del ARN y, opcionalmente, la concentración de ARN, se obtiene para cada una. En una forma de realización, se usa un valor de integridad del ARN promedio o concentración de ARN de dos o más muestras de ARN. En otra forma de realización, se usa el valor de integridad del ARN más alto o máximo de las dos o más muestras de ARN.

10

Se espera que este enfoque controle la respuesta al tratamiento, por ejemplo, para permitir que los pacientes no respondedores (por ejemplo, identificados con una integridad del ARN moderada a alta después del inicio del tratamiento) se cambien a otros tratamientos (cirugía, otras dosis de radiación, adición o cambio a otros medicamentos) sin completar los ciclos restantes del régimen ineficaz. Esto puede ahorrar a los pacientes los

15

efectos secundarios tóxicos de los regímenes a los que sus cánceres no responden.

Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para evaluar y/o estratificar sujetos en un ensayo clínico.

- 20 Un aspecto adicional descrito comprende un método que comprende enviar una muestra de células cancerosas opcionalmente una muestra de células de cáncer de mama o de cáncer de ovario, o una muestra de ARN derivada de la misma, a un sitio de prueba, en el que la muestra se empaqueta, por ejemplo, en un recipiente libre de ARNasa y opcionalmente resuspendido en un tampón de lisis, aislamiento de ARN y/o composición de estabilización que comprende opcionalmente inhibidores de ARNasa, permitiendo el recipiente marcado con un identificador, por
- 25 ejemplo, pruebas anónimas; y recibir del sitio de prueba una evaluación de la integridad del ARN de la muestra, incluida una puntuación (por ejemplo, zona 1, zona 2 o zona 3) u otro indicador que indique el riesgo de fracaso del tratamiento. La evaluación de riesgos se puede proporcionar, por ejemplo, a un médico, quien usará la evaluación de riesgos basada en los datos de calidad del ARN (además de otros datos) para decidir cuál es la mejor opción de tratamiento a recomendar a su paciente.

30

III. Kits

Un aspecto adicional descrito en el presente documento incluye un kit para su uso en un método descrito en el presente documento que comprende una composición de aislamiento de ARN y un recipiente libre de ARNasa para

35 recibir la muestra de tumor y/o ARN, en el que el recipiente está opcionalmente marcado con un identificador que permite opcionalmente pruebas anónimas.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente descripción:

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Incidencia, mortalidad y tratamiento del cáncer de mama

45

El cáncer de mama es el diagnóstico de cáncer más común en las mujeres, con 22.300 y 5.300 mujeres canadienses diagnosticadas y que murieron por la enfermedad en 2007, respectivamente¹. Aunque los tratamientos han mejorado tanto la supervivencia como la supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer de mama precoz y metastásico, aquellas personas con cáncer de mama localmente avanzado (LABC) tienen un resultado de

50 tratamiento significativamente peor. LABC se define tradicionalmente como el estadio IIB (T3N0) y el estadio IIIA/B de la clasificación TMN. Clínicamente, estos tumores miden más de 5 cm y/o se extienden más allá del tejido mamario hasta la piel o el músculo circundante, con/sin ganglios linfáticos axilares enmarañados (N2), ganglios mamaros internos (N3) o compromiso ganglionar supraclavicular ipsilateral. LABC representa aproximadamente el 10-15% de todos los casos de cáncer de mama, y la supervivencia se estima en el 30-42% a los 5 años¹, una parte

55 significativa de las cuales vivirán con enfermedad metastásica. Sin embargo, un pequeño subgrupo de mujeres que reciben quimioterapia neoadyuvante y logran una respuesta patológica completa (pCR), (definida como un cáncer de mama invasivo residual no microscópico después del tratamiento neoadyuvante) tienen una tasa de supervivencia sin enfermedad a 5 años muy mejorada del 87%² y tasas de supervivencia general a 5 años del 89%² y el 90%³. Como tales, las tasas de pCR se han convertido en una medida sustituta para los resultados favorables a largo plazo

en los ensayos con tratamiento neoadyuvante, particularmente porque este es el único subgrupo para el cual se puede medir este valor. La correlación entre la supervivencia mejorada del cáncer de mama localmente avanzado y la pCR se ha identificado en otros estudios, principalmente utilizando antraciclinas⁶⁻⁸.

5 Mejora la supervivencia del cáncer de mama con el uso de taxanos

Con el fin de mejorar la supervivencia del cáncer de mama, se han sometido a ensayo nuevos agentes citotóxicos después o al mismo tiempo con la quimioterapia con antraciclinas, en particular los taxanos. El docetaxel es un agente estabilizador de microtúbulos que induce la detención del ciclo celular en la mitosis y la apoptosis^{9,10}. Ha demostrado tasas de respuesta de hasta el 50% en el cáncer de mama metastásico resistente a antraciclinas¹¹⁻¹³, y una supervivencia superior cuando se utiliza en primera línea en estudios al azar en el contexto metastásico^{14,15}. El docetaxel suele administrarse por vía intravenosa cada 3 semanas. Sin embargo, un estudio al azar de fase III en el contexto metastásico comparó docetaxel 100 mg/m² cada 3 semanas, con 35 mg/m² semanalmente para 3 de cada 4 semanas¹⁶. Aunque las tasas de respuesta fueron más bajas en el grupo semanal, no hubo diferencias en la supervivencia libre de progresión (5,7 meses frente a 5,5 meses; $p = 0,46$) o en la supervivencia general (OS) (18,3 meses versus 18,6 meses; $p = 0,34$). Hubo mayor toxicidad grave general en el grupo Q de 3 semanas, (88,1% frente al 55,9%; $p = 0,0001$).

Uso de taxanos en el entorno neoadyuvante

Basándose en su actividad en el entorno metastásico, docetaxel se ha sometido a ensayo en ensayos aleatorios en cáncer de mama en fase temprana, y demostró una supervivencia superior cuando se añadió a regímenes basados en antraciclinas en comparación con estos regímenes en solitario¹⁷⁻¹⁸. FEC-D, (fluorouracilo 500 mg/m² IV, epirrubicina 100 mg/m², ciclofosfamida 500 mg/m² IV cada 3 semanas x 3 ciclos, seguido de docetaxel 100 mg/m² IV cada 3 semanas x 3) es actualmente uno de los más regímenes comúnmente empleados en el entorno postoperatorio adyuvante.

Varios estudios no asignados al azar de docetaxel también han mostrado actividad en la configuración localmente avanzada, ya sea como agente único, concurrente o secuencialmente con otros agentes¹⁹⁻²³. Para determinar si la adición de docetaxel mejora los resultados en el entorno preoperatorio, se han realizado varios estudios asignados al azar. El más grande, el NSABP-27, asignó al azar a 2411 mujeres con enfermedad T1c - T3 N0-N1 para recibir 4 ciclos de AC antes de la operación, en comparación con 4 ciclos de AC seguidos de 4 ciclos de docetaxel antes de la operación, o 4 ciclos de AC antes de la operación seguidos de cirugía y 4 ciclos de docetaxel postoperatorio. En comparación con AC preoperatoria en solitario, la adición de docetaxel mejoró significativamente la respuesta clínica completa (cCR) (40,1% frente al 63,6%; $p < 0,001$), pCR (13,7% frente al 26,1%; $p < 0,001$) y proporción de pacientes con nodos negativos (50,8% frente al 58,2%; $p < 0,001$)²⁴. Con 8,5 años de seguimiento, en los 3 grupos, no hubo diferencias en la supervivencia sin enfermedad (DFS) o en la supervivencia general (OS) (2). Sin embargo, en los pacientes que lograron una pCR, hubo una mejora significativa en la DFS (HR = 0,49, $p < 0,0001$) y OS (HR = 0,36, $p < 0,0001$).

El Aberdeen Breast Group también probó la eficacia de la adición de docetaxel a un régimen basado en antraciclinas en el entorno preoperatorio²⁵. Ciento cuarenta y cinco mujeres con enfermedad T3, T4 o TxN2 recién diagnosticada recibieron 4 ciclos de CVAP (ciclofosfamida 1.000 mg/m², doxorrubicina 50 mg/m², vincristina 1,5 mg/m² y prednisona 40 mg). Aquellas que lograron una respuesta clínica parcial o completa se asignaron al azar a 4 ciclos más de CVAP o 4 ciclos de docetaxel (100 mg/m²). Aquellas que no respondieron a los 4 ciclos iniciales de quimioterapia fueron tratadas con docetaxel de manera no aleatoria. El análisis de intención de tratamiento demostró una mayor cCR (94% frente al 66%, $p = 0,03$) y pCR (31% frente al 16% $p = 0,04$) con la adición de docetaxel en comparación con 4 ciclos más de CVAP. A los 38 meses, la mediana de seguimiento con docetaxel mejoró significativamente la DFS (90% frente al 77%; $p = 0,03$) y la OS (97% frente al 84%; $p = 0,05$)²⁶. Un tercer estudio, el estudio GEPARUO comparó AC (doxorrubicina y ciclofosfamida) durante 4 ciclos, seguido de docetaxel durante 4 ciclos (AC-DOC) con dosis de doxorrubicina densa 50 mg/m² más docetaxel 75 mg/m² cada 14 días durante 4 ciclos con soporte de filgastrim (ADOC) de forma preoperatoria en 913 mujeres con cáncer de mama T1-3 N0-2²⁷. Todos los criterios de valoración, incluida la respuesta clínica, la pCR y las tasas de cirugía de conservación mamaria mejoraron significativamente con la AC - T (doxorrubicina y ciclofosfamida seguida de un taxano) secuencial sobre el grupo de dosis densa. Los criterios de valoración de supervivencia aún no han sido notificados.

¿Uso de la radiación para mejorar adicionalmente la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado?

A pesar de los resultados mejorados asociados con la adición de taxanos a los regímenes de quimioterapia neoadyuvante, estas ganancias han sido modestas. Las tasas de pCR para los regímenes no basados en trastuzumb que emplean tanto antraciclinas como taxanos son todavía bastante bajas (15-30%). Dado que el logro de una pCR en pacientes se asocia con una supervivencia muy mejorada, los esfuerzos deben dirigirse a mejorar las tasas de pCR en pacientes con cáncer de mama, en particular aquellas con enfermedad localmente avanzada. Una posibilidad para mejorar las tasas de pCR en pacientes con cáncer de mama es combinar la quimioterapia con la radioterapia en el entorno neoadyuvante. En otros sitios de tumor, se ha empleado un enfoque de modalidad combinada de radiación local administrada simultáneamente con quimioterapia de radiosensibilización u otro agente para mejorar los resultados. Estos incluyen agentes tales como fluoropirimidinas, platino y más recientemente, taxanos. La quimiorradiación concurrente postoperatoria ha sido durante mucho tiempo el tratamiento estándar en el cáncer rectal localmente avanzado. Ensayos recientes que compararon la quimiorradiación preoperatoria con la postoperatoria han demostrado un mejor control local con el enfoque preoperatorio^{28,29}. Además, se ha informado de una mejora significativa en la pCR y la DFS con quimioterapia/radioterapia preoperatoria³⁰. La quimioterapia/radioterapia también es el estándar de atención para pacientes con cáncer de cabeza y cuello no resecable. El enfoque concurrente ha demostrado mejoras en la conservación de órganos y la supervivencia sobre la radiación en solitario en múltiples ensayos asignados al azar³¹⁻³⁴. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas localmente avanzado, varios ensayos asignados al azar han demostrado un mejor control local y supervivencia con el uso de quimiorradiación concurrente frente a secuencial, más comúnmente con quimioterapia basada en platino³⁵⁻³⁸. Además, se han realizado múltiples estudios pequeños en esta población de pacientes, añadiendo docetaxel como un radiosensibilizador³⁹⁻⁴⁴.

Existen datos limitados publicados para el uso de quimioterapia/radioterapia neoadyuvante en el cáncer de mama localmente avanzado. Se ha informado una revisión retrospectiva de 44 pacientes que recibieron quimiorradiación concurrente con taxanos para cáncer de mama en estadios I-IV⁴⁵. Si bien este estudio demostró la seguridad y la viabilidad o la quimiorradiación concurrente con taxanos en el cáncer de mama localmente avanzado, no se informaron las tasas de respuesta y los resultados de supervivencia.

Se ha informado un segundo estudio de 44 mujeres con cáncer de mama localmente avanzado en estadio IIB a III, donde las pacientes recibieron 30 mg/m² de paclitaxel intravenoso dos veces por semana durante 8 - 10 semanas concurrente con radiación a una dosis total de 45 Gy, seguido de cirugía⁴⁶. No se observaron toxicidades de grado 4 en la fase de quimiorradiación preoperatoria. En la fase postoperatoria, la única toxicidad de grado 4 fue la leucopenia (10%). El dieciséis por ciento de las pacientes lograron una pCR, con un 18% de pPR. No hubo asociación entre la dosis total de quimioterapia preoperatoria y la pCR. Un segundo estudio (solo en forma de resumen) informó sobre 23 pacientes que recibieron 50,4 Gy durante 6 semanas, con paclitaxel 175 mg/m² día 1, y 5FU 1000 mg/m²/día en infusión continua del día 1-3 durante 3 ciclos cada 3 semanas⁴⁸. Esto fue seguido de 3 ciclos de FEC cada 3 semanas, luego cirugía. Las toxicidades de grado 3 incluyeron dermatitis por radiación, esofagitis, vómitos, mucositis y neutropenia. La CR clínica fue del 82,6% y la pCR del 52,2%. La supervivencia global a 2 años es del 80,7%.

Dados los hallazgos prometedores anteriores, recientemente se realizó un ensayo de fase II que evalúa el régimen de FEC-D⁴⁹ para pacientes con cáncer de mama no inflamatorio localmente avanzado con administración en un entorno neoadyuvante, mientras se añade radiación concurrente a las primeras 6 de las 9 semanas de Docetaxel, seguido, 5 semanas más tarde, de una mastectomía radical modificada (que sigue siendo el estándar quirúrgico de atención para pacientes con LABC). Para minimizar los efectos secundarios de esta quimioterapia y optimizar su tolerabilidad con radiación^{50,51}, se administró docetaxel semanalmente x 9 semanas (dosis ajustada a 35 mg/m²) en lugar de q3 semanal x 3 ciclos. Para las pacientes cuyos tumores fueron positivos a la amplificación del gen Her2-neu, se les administró IV Herceptina q3 semanalmente durante un año. Después se evaluaron las toxicidades y las tasas de respuesta para este régimen de tratamiento.

Además, en un ensayo clínico reciente para pacientes con cáncer de mama localmente avanzado (NCIC-CTG-MA.22), se evaluó la relación entre la calidad del ARN del tumor y la respuesta a la quimioterapia con epirrubicina/docetaxel. Se obtuvieron tres biopsias de aguja gruesa guiadas por imagen de las pacientes antes, durante e inmediatamente después de la administración de la quimioterapia e inmediatamente se ultracongelaron en hielo seco para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido. El ARN se aisló de las biopsias y la cantidad y calidad del ARN se evaluó utilizando un bioanalizador Agilent 2100. La calidad del ARN se cuantificó por el bioanalizador en términos de un número de integridad del ARN (RIN), donde un RIN de 0 representa un ARN completamente hidrolizado y un RIN de 10 representa un ARN no degradado en absoluto. Este estudio, demostró que el tratamiento con quimioterapia dio como resultado una reducción dependiente de la dosis en los valores de RIN de tumor durante el tratamiento y después del tratamiento. Además, a diferencia de la extensión/celularidad del

tumor, se encontró que los valores bajos de RIN del tumor a mitad del tratamiento se correlacionaban con el logro de una pCR en pacientes después del tratamiento. Todos los pacientes que tuvieron una pCR después de la quimioterapia mostraron una reducción en el RIN del tumor máximo a la mitad del tratamiento (la mitad del tratamiento en el caso anterior, fue después de 3 o 4 ciclos de quimioterapia). En el estudio actual de quimioterapia con FEC-D con radiación concurrente, también se evaluó si los cambios en la cantidad y la calidad del ARN del tumor tuvieron lugar en respuesta al régimen.

Métodos

10 Administración del régimen de FEC-D con radiación concurrente

En la Figura 1 se describe un esquema para el estudio descrito anteriormente. Treinta y dos pacientes con cáncer de mama localmente avanzado no inflamatorio, no metastásico de estadio III se trataron con 5-fluoro-uracilo neoadyuvante, epirrubicina y ciclofosfamida (FEC también denominado CEF) q3 semanalmente durante 4 ciclos seguidos de Docetaxel semanal (35 mg/m²) simultáneamente con radiación regional (45 Gy con aumento de 16 Gy en 25 y 5 fracciones) durante 6 semanas seguidas de 3 semanas adicionales de quimioterapia con docetaxel sin radiación. Esto fue seguido por una mastectomía radical modificada. Las características de la paciente y del tumor se registraron al inicio y después del tratamiento, y se observaron la respuesta clínica y las toxicidades relacionadas con el tratamiento (Tabla 1). Se tomaron inmediatamente biopsias con aguja gruesa de tumor de calibre 14 seriadas guiadas por imagen de las pacientes antes, a mitad y después del tratamiento, y se tomaron secciones de 1 mm³ de las biopsias, se sumergieron en RNAlater™ y se almacenaron congeladas. En este ensayo, "pre" es antes de cualquier FEC, mid es después de FEC, el tratamiento MID es después de FEC, pero antes de docetaxel con radioterapia concurrente, y post es después de la radiación/docetaxel.

25 Aislamiento de ARN de biopsias de aguja gruesa de tumor

El ARN se aisló de biopsias de aguja gruesa de tumor guiadas por imágenes de pacientes antes, a la mitad y después del tratamiento utilizando los mini kits Qiagen miRNeasy®, tras una modificación el protocolo publicado en la página web del fabricante, <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000291>. Las biopsias se cortaron en varias secciones para diversos ensayos, con la sección utilizada para el análisis de integridad del ARN colocado en RNAlater. Las biopsias en RNAlater se añadieron por goteo inmediatamente en 0,5 ml de tampón RLT que contenía β -ME (10 μ l en 1 ml) en un tubo de 1,5 ml. Las biopsias en tampón RLT se homogeneizaron con un homogeneizador a motor sin núcleo durante 5 minutos (de Kontes Glass Company). Luego se pasó el lisado al menos 5 veces a través de una aguja de calibre 20 (0,9 mm de diámetro) equipada con una jeringa sin ARNasa. La muestra se centrifugó entonces a alta velocidad en una microcentrífuga refrigerada a 4°C durante 3 minutos, con la transferencia del sobrenadante a un nuevo tubo. Después se añadió un volumen (500 μ l) de etanol al 70% al sobrenadante y la muestra se mezcló bien mediante pipeteo repetido. Si se perdió algo de lisado durante la homogeneización, entonces el volumen de etanol se ajustó en consecuencia. Los precipitados visibles formados después de la adición de etanol en algunas muestras no afectaron al procedimiento de aislamiento de ARN. Se agregó un máximo de 700 μ l de la muestra, incluido cualquier precipitado, a una mini columna Qiagen® y se puso en un tubo de recolección de 2 ml. La columna se centrifugó durante 15 s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10.000 rpm) y se desechó el flujo continuo. El resto de la muestra se añadió entonces a la columna y la columna se centrifugó de nuevo. Desde este punto en adelante, la columna se lavó dos veces en tampón RPE y se secó por centrifugación de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después, el ARN se eluyó de la columna en 30 μ l de agua libre de ARNasa y el eluato se volvió a aplicar y se eluyó de la columna para aumentar el rendimiento y la concentración del ARN obtenido.

Evaluación de la calidad del ARN utilizando un bioanalizador Agilent 2100

Las muestras de ARN anteriores se aplicaron a RNA 6000 Nano Lapchips™ (adquirido en Agilent Biotechnologies, Inc.) y se sometieron a electroforesis capilar utilizando un bioanalizador Agilent® 2100. El protocolo que se siguió fue idéntico al descrito en el folleto técnico de la empresa para el bioanalizador Agilent® 2100, disponible en: <http://www.chem.agilent.com/scripts/LiteraturePDF.asp?IWHID=36225>. La cantidad y la calidad (valor RIN) del ARN de cada biopsia de aguja gruesa se determinaron entonces mediante el Bioanalizador.

55 Resultados

Respuestas clínicas y toxicidades para la quimioterapia FEC-D con radiación concurrente Mientras que 30 de las 32 pacientes (94%) completaron el protocolo de tratamiento descrito anteriormente, las pacientes experimentaron toxicidades significativas. Veintisiete pacientes (84%) tuvieron toxicidad de grado 3 o superior, incluida neumonitis

resolutiva de grado 3 (6 pacientes), dermatitis de grado 3 (6 pacientes) y una muerte relacionada con el tratamiento. Como se muestra en la Tabla 1, ocho de estas pacientes (25%) mostraron una respuesta patológica completa (pCR) al tratamiento, que es aproximadamente el doble de la tasa de pCR de Ontario para el cáncer de mama localmente avanzado. Además, en un promedio de 21 meses de seguimiento, la tasa de supervivencia sin recaída fue del 100% en la cohorte de pCR y del 65% entre los respondedores parciales (PR). Esto sugiere que el régimen, si bien muestra una fuerte toxicidad, parece mejorar la pCR y la tasa de supervivencia para el cáncer de mama localmente avanzado. Los tumores que presentaban pCR se distribuyeron casi por igual entre los subtipos basal (2 de 5 tumores = 40%), Her2 (3 de 3 tumores = 100%) y luminal B (3 de 6 tumores = 50%). No se encontraron pCR entre las 11 pacientes con tumores luminales A (0%). Si bien los números son pequeños, los datos sugieren que el régimen de FEC-D con radiación concurrente parecía capaz de inducir pCR a través de una diversidad de subtipos de cáncer de mama.

ID	EDAD	Estadio base	Trayectoria de respuesta	Trayectoria de estadio	ER	PR	Her2	Subtipo	Media a 2,5 A F/U
1	62	Estadio IIIA	PR	Fase 1	Negativo	Negativo	Positivo	Her2	Murió
2	38	Estadio IIB	CR	Fase 0	Negativo	Negativo	Positivo	Her2	Viva sin enfermedad
3	26	Estadio IIIA	CR	Fase 0	Negativo	Negativo	Negativo	Basal	Viva sin enfermedad
4	58	Estadio IIIA	CR	Fase 0	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
5	43	Estadio IIIA	Estable	Estadio IIIA	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
6	52	Estadio IIIA	Estable	Estadio IIB	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
7	49	Estadio IIIA	CR	Fase 0	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
8	63	Estadio IIIA	Prog	Estadio IV	Negativo	Negativo	Negativo	Basal	Murió
9	48	Estadio IIIA	PR	Estadio IIB	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
10	61	Estadio IIIA	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Murió
11	39	Estadio IIB	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Murió
12	47	Estadio IIB	PR	Estadio I	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
13	43	Estadio IIB	CR	Fase 0	Negativo	Negativo	Positivo	Her2	Viva sin enfermedad
14	49	Estadio IIIA	PR	Estadio IIA	Negativo	Negativo	Negativo	Basal	Murió
15	64	Estadio IIIA	PR	Estadio IIIA	Positivo	Negativo	Negativo	Luminal A	Murió
16	34	Estadio IIIC	PR	Estadio I	Negativo	Negativo	Negativo	Basal	Viva sin enfermedad
17	40	Estadio IIB	PR	Estadio I	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
18	58	Estadio IIIC	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
19	42	Estadio IIIA	Estable	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
20	53	Estadio IIB	CR	Fase 0	Negativo	Negativo	Negativo	Basal	Viva sin enfermedad
21	44	Estadio IIB	PR	Fase 1	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad

22	45	Estadio IIB	PR	Estadio IIA	Positivo	Negativo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
23	57	Estadio IIIA	CR	Estadio O	Positivo	Negativo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
24	60	Estadio IIB	PR	Estadio IIB	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva CON enfermedad
25	50	Estadio IIIA	PR	Estadio IIB	Negativo	Negativo	Negativo	Basal	Viva CON enfermedad
26	44	Estadio IIIB	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
27	45	Estadio IIIA	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad
28	62	Estadio IIIA	PR	Estadio IIIA	Positivo	Negativo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
29	51	Estadio IIIB	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
30	58	Estadio IIIA	NA	Murió en Tx	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Murió
31	31	Estadio IIIC	PR	Estadio IIA	Positivo	Positivo	Positivo	Luminal B	Viva sin enfermedad
32	62	Estadio IIIA	PR	Estadio IIIA	Positivo	Positivo	Negativo	Luminal A	Viva sin enfermedad

Tabla 1 Datos sobre las características de las pacientes antes y después del tratamiento en el Estudio Clínico de Londres, incluida la edad, el estado nodal inicial y el estadio, finalización del tratamiento, nivel de respuesta patológica, estado nodal posterior al tratamiento y estadio, estado de la expresión del receptor de pretratamiento, 5 subtipo de tumor predicho y grado de experiencia de toxicidad de los pacientes. Y = sí, N = no, PR = respuesta parcial, CR = respuesta completa, Estable = enfermedad estable, Prog = enfermedad progresiva.

TOXICIDAD	
<u>Categoría</u>	<u>Cantidad</u>
Neumonitis por radiación	25%
Dermatitis por radiación	25%
Muerte por ARDS	N=1
SUPERVIVENCIA A 2,5 AÑOS	
Pacientes con pCR	N=7, 100%
Pacientes sin pCR	N=24, 62%
pCR POR SUBTIPO DE TUMOR	
ER+/PR+o -/Her2- (Luminal A)	N = 0/12 = 0%
ER-/PR+o -/Her2+ (Luminal B)	N = 3/10 = 30%
ER-/PR-/Her2+ (Her2)	N = 2/3 = 66%
ER-/PR-/Her2- (Basal)	N = 2/6 = 33%

Tabla 2: Efectos de la quimioterapia con FEC seguida de tratamiento con docetaxel con radioterapia concurrente en pacientes de LABC. Las toxicidades incluían neumonitis y dermatitis por radiación y una muerte durante el tratamiento por síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS). La supervivencia a dos años después del tratamiento fue superior para pacientes que lograron una pCR. Las pCR tuvieron lugar en pacientes con tumores de los subtipos Her2, luminal B, y basal, pero estaban ausentes en tumores luminales A.

Cambios en el contenido de ARN tumoral en respuesta a la quimioterapia con FEC seguida de quimioterapia con docetaxel con tratamiento de radioterapia concurrente

- 5 Después se evaluó si, de manera similar al ensayo clínico NCIC-CTG-MA.22, se podían observar cambios en la calidad o cantidad de ARN del tumor durante o en respuesta al tratamiento y si la baja calidad del ARN estaba asociada con una respuesta clínica fuerte tras finalizar el tratamiento (pCR). La Figura 2 ilustra los valores de concentración de ARN para todas las biopsias de pacientes aisladas antes del tratamiento, en medio del tratamiento y después del tratamiento. Este gráfico revela que hubo cierta variabilidad significativa en la cantidad de ARN aislado de las biopsias durante todo el tratamiento, incluidas las biopsias de pretratamiento. Esto sugiere posibles variaciones en la conservación del ARN en las biopsias extraídas. Además, los datos sugieren poca diferencia en la concentración de ARN entre las biopsias de pretratamiento y las biopsias extraídas después de la quimioterapia con FEC (concentración media de ARN tumoral de $50,0 \pm 15,1$ y $50,0 \pm 11,9$ ng/ μ l, respectivamente). Por el contrario, la concentración media de ARN tumoral disminuyó significativamente después de la finalización del régimen de FEC-D con radiación concurrente y fue de $10,6 \pm 2,1$ nanogramos/microlitro. Estos hallazgos sugieren que la quimioterapia con FEC por sí sola no es suficiente para inducir reducciones en la concentración de ARN tumoral, pero tras el tratamiento con radioterapia concurrente y docetaxel, el contenido de ARN tumoral disminuye drásticamente. A pesar de este efecto del tratamiento, no se observaron diferencias significativas en la concentración de ARN tumoral entre los pacientes que mostraron una respuesta patológica completa después del tratamiento (pCR), los pacientes que mostraron una respuesta parcial al tratamiento (PR) y los pacientes con enfermedad estable o progresiva (SD o PD) después del tratamiento (Figura 3). Cambios en los valores de RIN tumoral en respuesta a la quimioterapia con FEC seguida de quimioterapia con docetaxel con tratamiento de radioterapia concurrente.
- 10
- 15
- 20
- 25 Para evaluar los cambios en el contenido de ARN tumoral durante la quimioterapia con FEC-D con tratamiento de radiación concurrente, se omitieron todas las muestras que se indicaron como "señal insuficiente" para el análisis matemático. Una señal insuficiente es una sin picos detectables sobre el fondo. Como se muestra en la Figura 4A, en las tres muestras después de la quimioterapia con FEC, pero antes del tratamiento con docetaxel/radiación que logró un pCR al final del tratamiento, 2 de 3 muestras demostraron valores de RIN indicativos de una alta integridad

del ARN o una mínima degradación del ARN (por ejemplo, RIN > 7 que es comparable con los niveles iniciales). Una muestra de paciente tenía un valor de RIN muy bajo, lo que sugiere una pérdida significativa de la integridad del ARN (valor de RIN = n/a o 0). En las muestras de pacientes que no respondieron (pacientes que no lograron una pCR después del tratamiento), se pudo observar un pequeño efecto del tratamiento con FEC sobre la cantidad o la integridad del ARN tumoral en comparación con las muestras de pretratamiento.

Cuando se evaluó la integridad del ARN tumoral después de la quimioterapia con FEC y el tratamiento con docetaxel/radiación, solo dos muestras de pacientes que lograron una pCR después del tratamiento tenían suficiente ARN para el análisis matemático (Figura 4B). Para estas dos muestras, ambas tenían valores de RIN de n/a o cero, lo que indica una pérdida muy fuerte de la integridad del ARN. Estos dos pacientes que respondieron al tratamiento fueron muy distintos de los que no respondieron de acuerdo con la concentración de ARN y los valores de RIN. Los valores bajos de RIN son indicativos de la pérdida de ARN normal (por ejemplo, no fragmentado). En los no respondedores, se observa una amplia gama de valores de RIN que es indicativa de un espectro de cambio en el ARN tumoral desde muy fragmentado hasta muy intacto. Estos resultados sugieren que la pérdida de integridad del ARN tuvo lugar con la radiación y el docetaxel, lo que resultó en una disminución de los valores de RIN y una pérdida en la concentración de ARN. Esta pérdida de integridad del ARN se correlacionó con una fuerte respuesta al tratamiento (pCR). La alta concentración de ARN y el alto RIN sugieren una falta de respuesta de acuerdo con los datos clínicos.

20 **Ejemplo 2**

Cambios en la integridad del ARN de células tumorales *in vitro* en respuesta a la radiación con o sin tratamiento con docetaxel

Existen similitudes genómicas entre los cánceres de ovario y de mama (Nature 490: 67-70, 4 de octubre de 2012) y pueden mostrar respuestas similares. Con este fin, se observa una línea de cáncer de ovario por su respuesta de ARN a la radioterapia.

Se realizaron experimentos para evaluar si la radiación con o sin tratamiento con docetaxel podría inducir cambios en la concentración de ARN celular y/o valores de RIN en células tumorales de ovario A2780. Como se muestra en la Figura 5A, el tratamiento con radiación indujo un cambio dependiente de la dosis en el contenido de ARN de las células A2780, con 10 Gray de radiación que indujeron una reducción de casi 5 veces en los niveles de concentración de ARN. De forma interesante, la preincubación de las células con docetaxel 0,1 μ M redujo aún más la concentración de ARN celular en 6,5 veces más, eliminando casi todo el ARN de las células. Por el contrario, en las condiciones sometidas a ensayo, las dosis de radiación de hasta 5 Gray no tuvieron efecto en la integridad del ARN celular, ya que no se observaron cambios en los valores de RIN en comparación con las muestras antes del tratamiento con radiación (Figura 5B). Si las células se preincubaron durante 24 horas con docetaxel 0,1 μ M antes del tratamiento con radiación de 10 Gray, el valor de RIN celular disminuyó al 75% de los valores de pretratamiento. Hubo disminuciones adicionales en RIN cuando la radiación y la quimioterapia se usaron juntas al mismo tiempo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la radiación puede inducir reducciones en el contenido de ARN celular y reducciones en la integridad del ARN. Además, la combinación tanto del tratamiento con radiación como docetaxel induce reducciones aún mayores tanto en el contenido de ARN celular como en la integridad del ARN. Estas observaciones son consistentes con las descritas anteriormente para los tumores de pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, en particular para la terapia combinada posterior al tratamiento, donde la concentración de ARN disminuyó drásticamente en respuesta a la quimioterapia con FEC-D con radioterapia concurrente y donde las diferencias entre las pacientes con respuesta (pCR) y las pacientes sin respuesta (no pCR) parecen observarse después del tratamiento.

Luego se examinó si se podían observar observaciones similares *in vitro* para líneas celulares de tumores de mama específicos. Como se muestra en la Figura 6A, se observó un cambio en la concentración de ARN de aproximadamente el 7% para las células tumorales de mama SKBR3 en cultivo cuando se trataron con hasta 10 grises de radiación. Si las células se trataron previamente con docetaxel 0,1 μ M antes de la radiación de 10 Gray, se observó una reducción de 5 veces en la concentración de ARN celular (19% de las células no tratadas). La concentración de ARN disminuye 2 veces (o más) en las células BT-20, A2780 y MB-468 con radiación en solitario. Estos hallazgos sugieren que en las células tumorales de mama *in vitro* (y posiblemente en los tumores de pacientes con cáncer de mama), algunos cambios en la concentración de ARN celular pueden observarse con el tratamiento con radiación en solitario. El tratamiento con docetaxel concurrente con radioterapia reduce drásticamente el contenido de ARN celular, de manera consistente con los hallazgos observados en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado tratadas con quimioterapia con FEC-D seguida de radioterapia. Se observaron hallazgos

similares cuando se examinaron los efectos de los tratamientos anteriores en los valores de RIN en células SKBR3 (HER2 +, ER-) (Figura 6B). Se observaron reducciones medibles (9%) en los valores de RIN celulares en respuesta a la radiación si las células se trataron previamente con docetaxel.

- 5 Se examinaron los efectos de los tratamientos anteriores en células MCF-7 (ER +, HER2 -) (Figuras 7A y 7B), los hallazgos fueron similares a los de las células SKBR3, con reducciones del 4% y el 73% en los niveles de ARN observados para los tratamientos con 10 Gray y 10 Gray/docetaxel 0,1 μ M, respectivamente. De manera similar, no se observó una reducción significativa en los valores de RIN celular para las células MCF-7, incluso a la dosis de radiación más alta (10 Gray). Además, solo se observó una reducción del 4% en los valores de RIN celular cuando
- 10 las células se trataron previamente con docetaxel 0,1 μ M antes de la radiación de 10 Gray.

Ejemplo 3

- Las células A2780 se trataron con dosis crecientes de Epirrubicina con y sin radiación de 10 Gy. Las células A2780
- 15 se pusieron en placas de 6 cm en 4 ml de medio de cultivo RPMI. Las placas se colocaron en la incubadora y las células se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se retiró el medio de todas las placas y se añadió a las placas un medio nuevo que contenía la concentración de epirrubicina apropiada (1 pM, 5 pM, 20 nM, 50 nM y 100 nM). Las células se trataron previamente durante 24 h con epirrubicina antes de recibir el tratamiento con radiación. Al día siguiente (24 h después del tratamiento farmacológico con epirrubicina), se administró a las células 10 Gy de
- 20 radioterapia (300 kV, 9 mA) en aproximadamente 4,3 min de exposición a rayos X utilizando un sistema de irradiación RS320 (Gulmay Medical). Las células se devolvieron a la incubadora de cultivo celular y el ARN se extrajo de las células 96 h después del tratamiento con radiación (que corresponde a 120 h del tratamiento posterior a la epirrubicina).

- 25 La Figura 8A muestra los valores de RIN frente a la dosis de epirrubicina. Se observa una pérdida en el valor de RIN con radiación en dosis bajas de epirrubicina.

La Figura 8B muestra los valores de RDI frente a la dosis de epirrubicina. Los valores de RDI aumentan con la radiación a dosis bajas de fármaco.

- 30 La Figura 8C muestra la concentración de ARN frente a la dosis de epirrubicina y demuestra una pérdida aumentada en la concentración de ARN con radiación a dosis bajas de fármaco.

- Se llevaron a cabo experimentos similares con células de cáncer de mama MCF-7. Las células MCF-7 se trataron
- 35 con dosis crecientes de Epirrubicina con y sin radiación de 10 Gy. Las células MCF-7 se colocaron en placas de 6 cm en 4 ml de medio de cultivo DMEM. Las placas se colocaron en la incubadora y las células se dejaron adherir durante la noche. Al día siguiente, se retiró el medio de todas las placas y se añadió a las placas un medio nuevo que contenía la concentración de epirrubicina apropiada (1 pM, 5 pM, 20 nM, 50 nM y 100 nM). Las células se trataron previamente durante 24 h con epirrubicina antes de recibir el tratamiento con radiación. Al día siguiente (24
- 40 h después del tratamiento farmacológico con epirrubicina), se administró a las células 10 Gy de radioterapia (300 kV, 9 mA) en aproximadamente 4,3 min de exposición a rayos X utilizando un sistema de irradiación RS320 (Gulmay Medical). Las células se devolvieron a la incubadora de cultivo celular y el ARN se extrajo de las células 96 h después del tratamiento con radiación (que corresponde a 120 h del tratamiento posterior a la epirrubicina).

- 45 La Figura 9A muestra el valor de RIN frente a la dosis de epirrubicina y demuestra una pérdida en el valor de RIN cuando se combina con radiación.

Tanto las células MCF-7 como las células SkBr3 tuvieron un aumento del 45% en el RDI con solo 2 Gy de radiación. El RDI es más sensible y el efecto de la degradación del ARN es menos evidente como un cambio en el valor de

50 RIN.

- La Figura 9B muestra el valor de RDI frente a la dosis de epirrubicina y demuestra un aumento en el valor de RDI con radiación hasta epirrubicina 100 μ M. La Figura 9C muestra la concentración de ARN frente a la dosis de epirrubicina y demuestra una pérdida en la concentración de ARN con dosis crecientes de epirrubicina. El RDI es
- 55 más sensible que RIN en la medición de los efectos inducidos por la radiación.

En otro experimento, las células A2780 se trataron con docetaxel 5 nM, radiación de 10 Gy y radiación de 10 Gy + docetaxel 5 nM durante 72 horas o 96 horas. Los resultados demuestran que la degradación del ARN inducida por señal es dependiente del tiempo.

La Figura 10A proporciona el valor de RIN medio frente al tratamiento con fármaco y radiación (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar. La Figura 10A muestra una mayor pérdida en el valor de RIN con radiación + docetaxel a las 72 h.

5

La Figura 10B proporciona el valor medio de RDI frente al tratamiento con docetaxel y radiación (n = 3). Los resultados sugieren un aumento en el valor de RDI con radiación + docetaxel en comparación con docetaxel en solitario en 96 h. Las barras de error representan la desviación estándar.

10 **Ejemplo 4**

Los datos del electroferograma obtenidos de pacientes en el Ejemplo 1 se volvieron a analizar calculando los valores de RDI. Los valores de RDI se calcularon utilizando las características (Área Intermedia + Área BajaC)/(Área 28S + Área 18S).

15

La Figura 11 representa gráficamente la concentración de ARN frente a los valores de RDI para muestras A) a la mitad del tratamiento (antes de la radiación) y B) posteriores al tratamiento (después de la radiación).

En base a lo anterior, un valor de RDI de 3 o menos puede indicar una falta de respuesta a la radiación. Por ejemplo, la Figura 11b muestra que las muestras posteriores al tratamiento que tenían un valor de RDI de 3 o menos no responden a la combinación de radiación/docetaxel. La alta concentración de ARN y el bajo RDI sugieren una falta de respuesta después del tratamiento.

25 **Ejemplo 5**

25

Las células de cáncer de ovario A2780 se trataron con radiación de 2 a 10 Gray utilizando un sistema de irradiación Gulmay RS320 y posteriormente se recogieron después de 24, 48 y 72 h. El ARN se aisló y se procesó en un bioanalizador Agilent. El análisis del electroferograma demostró que un aumento en la relación Área Intermedia/(Áreas 28S+18S) a las 72 horas es detectable en las células tratadas con radiación. Por ejemplo, las células tratadas a 10 Gray durante 72 horas muestran una degradación del ARN inducida por la radiación en la región intermedia y la región de banda baja, pero no hay mucha diferencia en el área del electroferograma donde reside el pico de autólisis. La degradación del ARN inducida por la radiación es evidente a las 72 horas en ambos niveles de dosis.

30

Si bien la presente solicitud se ha descrito con referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la solicitud no se limita a los ejemplos descritos. Por el contrario, la aplicación está destinada a cubrir diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Las secuencias asociadas con cada número de acceso proporcionado en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, números de acceso y/o secuencias de biomarcadores (por ejemplo, proteína y/o ácido nucleico) que se proporcionan en las Tablas o en cualquier otro lugar, se incorporan por referencia en su totalidad.

CITAS PARA BIBLIOGRAFÍA A LA QUE SE HACE REFERENCIA EN LA MEMORIA DESCRIPTIVA

45

1. Canadian Cancer Society. Canadian Cancer Statistics. http://www.cancer.ca/vgn/images/portal/cit_86751114/10/34/614137951cw_library_WYNTK_Bladder_Punjabi2005.pdf [2008 Available from: URLwww.cancer.ca

50

2. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, Ames FC, Hunt KK, Dhingra K et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol 1999; 17(2):460-469.

3. Formenti SC, Dunnington G, Uzieli B, Lenz H, Keren-Rosenberg S, Silberman H et al. Original p53 status predicts for pathological response in locally advanced breast cancer patients treated preoperatively with continuous infusion 5-fluorouracil and radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 39(5):1059-1068.

55

6. Scholl SM et al. Breast tumours response to primary chemotherapy predicts local and distant control as well as survival. Eur J Ca 1995; 31A: 1969-1995.

7. Chollet P et al. Clinical and pathological response to primary chemotherapy in operable breast cancer. Eur J Ca 1997; 33: 862-866.

8. Gazet JC et al. Assessment of the effect of pretreatment with neoadjuvant therapy on primary breast

cancer. *Br J Ca* 1996; 73: 758-762.

9. Bissery MC et al. Experimental antitumor activity of Taxotere (RP 56976, NCS 628503) a Taxol analogue. *Ca Res* 1991; 51: 4845-4852.

10. Ganansia-Leymarie V et al. Signal transduction pathways of taxane-induced apoptosis. *Curr Med Chem Antica Ag* 2003; 3: 291-306.

11. Valero V et al. Phase II trial of docetaxel: a new highly effective antineoplastic agent in the management of patients with anthracycline-resistant metastatic breast cancer. *JCO* 1995; 13: 2886-2894.

12. Ravdin PM et al. Phase II trial of docetaxel in advanced anthracycline-resistant or anthracenedione-resistant breast cancer. *JCO* 1995; 13: 2879-2885.

13. Chan S et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. The 303 Study Group. *JCO* 1999; 17: 2341-2354.

14. Nabholz JM et al. Docetaxel and doxorubicin compared with docetaxel and cyclophosphamide as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer: results of a randomized, multicenter phase III trial. *JCO* 2003; 21: 968-975.

15. O'Shaughnessy J et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer; phase III trial results. *JCO* 2002; 20: 2812-2823.

16. Rivera E et al. Phase 3 study comparing the use docetaxel on an every-3-week versus weekly schedule in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer* 2008; 112: 1455-1461.

17. Roche H et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients; the FNCLCC PACS 01 trial. *JCO* 2006; 24: 5664-5671.

18. Martin M et al. Adjuvant docetaxel for node-positive breast cancer. *NEJM* 2005; 352: 2302-2313.

19. Amat S et al. Induction chemotherapy in operable breast cancer: high pathological response rate induced by docetaxel. *Proc Am Soc Clin Onc* 1999; 18: 79a, abstract 297.

20. Tubiana-Hulin M et al. Phase II trial combining docetaxel (D) doxorubicin (DOX) as neoadjuvant treatment in patients (Pts) with operable breast carcinoma (BC). *Proc Am Soc Clin Onc* 2000; 19: 127a, abstract 492.

21. Limentani SA et al. Phase II study of doxorubicin and docetaxel as neoadjuvant therapy for women with stage IIB or III breast cancer. *Proc Am Soc Clin Onc* 2000; 19: 131a, abstract 511.

22. Teston L et al. Dose-dense chemotherapy with sequential doxorubicin (D) and docetaxel (Dt) for initial treatment of operable and inoperable stage II-IIIb breast cancer. *Proc Am Soc Clin Onc* 2000; 19: 134a, abstract 524.

23. Wynendale W et al. Neoadjuvant chemotherapy with sequential doxorubicin (DOX) and docetaxel (DOC) in locally advanced breast cancer (LABC): a pilot study. *Proc Am Soc Clin Onc* 1999; 18: 106a, abstract 389.

24. Bear HD et al. the effect on tumor response of adding sequential preoperative docetaxel to preoperative doxorubicin and cyclophosphamide: preliminary results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-27. *JCO* 2003; 21: 4165-4174.

25. Smith IC et al. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer significantly enhanced response with docetaxel. *JCO* 2002; 20: 1456-1466.

26. Hutchon AW et al. Improvements in survival in patients receiving primary chemotherapy with docetaxel for breast cancer: a randomized controlled trial. *Br Ca Res Tr* 2001; 69: 298.

27. Von Minckwitz G et al. Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group. *JCO* 2005; 23: 2676-2685.

28. Sauer R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *NEJM* 2004; 351: 1731-1740.

29. Bosset JF et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *NEJM* 2006; 355: 1114-1123.

30. Rodel C et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *JCO* 2005; 23: 8688-8696.

31. Adelstein DJ et al. An Intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *JCO* 2003; 21: 92-98.

32. Denis F et al. Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *JCO* 2004; 22: 69-76.

33. Forastiere AA et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *NEJM* 2003; 349: 2091-2098.

34. Posner MR et al. Cisplatin and Fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *NEJM*

2007; 357: 1705-1715.

35. Furuse K et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine and cisplatin in unresectable stage III non-small cell lung cancer. *JCO* 1999; 17: 2692-2699.

36. Curran Wet al. Phase III comparison of sequential versus concurrent chemo-radiation for patients with unresected stage III non-small cell lung cancer (NSCLC): report of Radiation Oncology Group (RTOG) 9410. *Lung Ca* 2003; 29 (suppl 1): 93, abstract 303.

37. Pierre F et al. a randomized phase III trial of sequential chemo-radiotherapy versus concurrent chemo-radiotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) (GLOT-GFPC NPC 95-01 study). *Proc Am Soc Clin Onc* 2001; 20: 312a, abstract 1246.

38. Zatloukal PV et al. Concurrent versus sequential radiochemotherapy with vinorelbine plus cisplatin (V-P) in locally advanced non-small cell lung cancer. A randomized phase II study. *Proc Am Soc Clin Onc* 2002; 21: 290a, abstract 1159.

39. Mauer AM et al. Phase I study of docetaxel with concomitant thoracic radiation therapy. *JCO* 1998; 16: 159-164.

40. Mudad R et al. Concomitant docetaxel, cisplatin and radiation (XRT) in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase I study. *Proc Am Soc Clin Onc* 2000; 19: 544a.

41. Koukourakis MI et al. Weekly docetaxel and concomitant boost radiotherapy for non-small cell lung cancer. A phase I/II dose escalation trial. *Eur J Ca* 1998; 34: 838-844.

42. Ramlan R et al. Randomized phase II study evaluating the feasibility of thoracic radiotherapy with or without weekly docetaxel (Taxotere®) following induction chemotherapy with cisplatin and docetaxel in unresectable stage III A-B non-small cell lung cancer. *ESMO Congress* 2002; Poster 491.

43. Wu HG et al. Phase I study of weekly docetaxel and cisplatin concurrent with thoracic radiotherapy in stage III non-small cell lung cancer. *Int J Rad Onc Bio Phys* 2002; 52: 75-80.

44. Onishi H et al. Concurrent two-dimensional radiotherapy and weekly docetaxel in the treatment of stage III non-small cell lung cancer: a good local response but no good survival due to radiation pneumonitis. *Lung Ca* 2003; 40: 79-84.

45. Bellon JR et al. Concurrent radiation therapy and paclitaxel or docetaxel chemotherapy in high-risk breast cancer. *Int J Rad Onc Bio Phys* 2000; 48: 393-397.

46. Formenti SC et al. Preoperative twice-weekly paclitaxel with concurrent radiation therapy followed by surgery and postoperative doxorubicin-based chemotherapy in locally advanced breast cancer: a phase I/II trial. *JCO* 2003; 21: 864-870.

48. Brewer-Goubely YP et al. Neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy (CT-RT) with paclitaxel (TAXOL) and 5-fluorouracil (5-FU) followed by epirubicin-cyclophosphamide (FEC) and surgery in patients (Pts) with locally advanced breast cancer (LABC). *Proc Am Soc Clin Onc* 2001; 20, abstract 1815.

49. Roche H, Fumoleau P, Spielmann M, Canon JL, Delozier T, Serin D et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol* 2006; 24(36):5664-5671.

50. Tabernero J, Climent MA, Lluch A, Albanell J, Vermorken JB, Barnadas A et al. A multicentre, randomised phase II study of weekly or 3-weekly docetaxel in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15(9):1358-1365.

51. Rivera E, Mejia JA, Arun BK, Adinin RB, Walters RS, Brewster A et al. Phase 3 study comparing the use of docetaxel on an every-3-week versus weekly schedule in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer* 2008; 112(7):1455-1461.

52. A.Schroeder, O.Mueller, S.Stocker, R.Salowsky, M.Leiber, M.Gassmann, S.Lightfoot, W.Menzel, M.Granzow, and T.Ragg, The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BMC.Mol.Biol.* 7 (2006) 3.

53. A.M.Parissenti, J.A.Chapman, H.J.Kahn, B.Guo, L.Han, P.O'Brien, M.P.Clemons, R.Jong, R.Dent, B.Fitzgerald, K.I.Pritchard, L.E.Shepherd, and M.E.Trudeau, Association of low tumor RNA integrity with response to chemotherapy in breast cancer patients, *Breast Cancer Res.Treat.* 119 (2010) 347-356.

54. C.Cera, G.Palu, S.M.Magno, and M.Palumbo, Interaction between second generation anthracyclines and DNA in the nucleosomal structure, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 2309-2314.

55. S.Spadari, G.Pedrali-Noy, F.Focher, A.Montecucco, T.Bordoni, C.Geroni, F.C.Giuliani, G.Ventrella, F.Arcamone, and G.Ciarrocchi, DNA polymerases and DNA topoisomerases as targets for the development of anticancer drugs, *Anticancer Res.* 6 (1986) 935-940.

56. N.R.Bachur, F.Yu, R.Johnson, R.Hickey, Y.Wu, and L.Malkas, Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents, *Mol.Pharmacol.* 41 (1992) 993-998.

57. R.Olinski, P.Jaruga, M.Foksinski, K.Bialkowski, and J.Tujakowski, Epirubicin-induced oxidative DNA damage and evidence for its repair in lymphocytes of cancer patients who are undergoing chemotherapy,

Mol.Pharmacol. 52 (1997) 882-885.

58. U.Vaishampayan, R.E.Parchment, B.R.Jasti, and M.Hussain, Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics, Urology 54 (1999) 22-29.

59. D.L.Morse, H.Gray, C.M.Payne, and R.J.Gillies, Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells, Mol.Cancer Ther. 4 (2005) 1495-1504.

60. T.Wieder, F.Essmann, A.Prokop, K.Schmelz, K.Schulze-Osthoff, R.Beyaert, B.Dorken, and P.T.Daniel, Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3, Blood 97 (2001) 1378-1387.

61. Mueller, O. L., S.;Schroeder, A (2004) RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control.

62. Agilent 2100 Bioanalyzer,Agilent Technologies, Inc.2100 Expert User's Guide. Agilent Technologies Hewlett-Packard Str. 876337 Waldbronn Germany, Agilent Technologies, Inc.. Agilent2100 G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_(NoSecPack)[2].

63. F Xia and SN Powell, 2002. "The molecular basis of radiosensitivity and chemosensitivity in the treatment of breast cancer". Semin Radiat Oncol (2002), 12(4) 296-304.

64. Hu, Z-P et al., 2012. "Metabolomic response of human skin tissue to low dose ionizing radiation". Mol BioSyst 8; 1979-1986.

65. Delic, J. et al., 1993. "Gamma-ray induced transcription and apoptosis-associated loss of 28S rRNA in interphase human lymphocytes". Int J Radiat Biol 64; 39-46.

66. Al-Mayah, A.H.J. et al., 2012. "Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation". Radiat Research 177; 539-545.

67 Krolak, J.M. et al., 1989. "18S Ribosomal RNA is Degraded during Ribosome Maturation in Irradiated HeLa cells". Radiat Research 118; 330-340.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar la respuesta de un cáncer a la radiación que comprende:
 - 5 i. aislar ARN de una biopsia de cáncer obtenida de un paciente tratado con radioterapia; evaluar la integridad del ARN mediante la medición de un número de integridad del ARN (RIN) utilizando el algoritmo Expert de Agilent,
 - ii. comparar el RIN, con respecto a un umbral de respuesta predeterminado; e
 - 10 iii. identificar si el paciente tiene una disminución o ausencia de cambio en el RIN en comparación con el umbral de respuesta;

en el que una disminución en el RIN en comparación con el umbral de respuesta es predictivo de que el paciente responde a la radioterapia, y en el que una ausencia de cambio en el RIN en comparación con el umbral de respuesta es predictivo de que el paciente no responde a la radioterapia.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además medir la concentración de ARN, en el que una disminución en la concentración de ARN en comparación con un umbral de respuesta predeterminado es predictivo de que el paciente responde a la radioterapia, y una ausencia de cambio en la concentración de ARN en comparación con un umbral de respuesta es predictivo de que el paciente no responde a la
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la biopsia es de un paciente después de que el paciente haya estado expuesto a una dosis de radiación de la radioterapia sin pretratamiento o tratamiento concomitante con un agente de quimioterapia.
- 25 4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el paciente se trata con una dosis de un agente quimioterapéutico, antes, simultáneamente o después del tratamiento con radiación o con un compuesto radiosensibilizante.
- 30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el umbral de respuesta es un estándar derivado de una pluralidad de muestras que no responden y muestras que responden.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la biopsia es una biopsia de
- 35 7. El método de la reivindicación 6, en el que el cáncer de mama es Her2 +, subtipo basal o subtipo luminal B y/o en el que el paciente con cáncer de mama tiene cáncer de mama localmente avanzado (LABC).
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la disminución en RIN y/o la
- 40 concentración de ARN predictiva de capacidad de respuesta disminuye en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, o al menos un 90%.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 8, en el que el paciente se trató con un
- 45 agente quimioterapéutico antes de obtener la biopsia.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona de productos quimioterapéuticos de taxano, antraciclinas y combinaciones de los mismos.
- 50 11. El método de la reivindicación 10, en el que el taxano se selecciona de paclitaxel, docetaxel, larotaxel, Abraxane, paclitaxel ligado a ácido docosaheptaenoico, paclitaxel poliglumex, Ortataxel, Genexol, paclitaxel encapsulado en liposomas, y paclitaxel en una emulsión de vitamina E, más preferiblemente en el que el agente quimioterapéutico comprende epirrubicina, docetaxel o combinaciones de los mismos.
- 55 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la biopsia se obtiene después de que el paciente haya recibido 2, 3, 4, 5, 6 o más dosis de radiación.
13. Un método para determinar si un agente es un agente radiosensibilizador o un agente radioprotector que comprende:

- 5 a. incubar una fuente de células cancerosas con un agente de ensayo;
b. exponer la fuente de células cancerosas a una dosis de radiación;
c. medir el RIN utilizando el algoritmo expert de Agilent de una muestra de la fuente de células cancerosas incubada con el agente de ensayo;
d. comparar el RIN con un control; y
e. identificar el agente de ensayo como una sensibilidad creciente a la radiación si el RIN indica que la integridad del ARN está disminuida en comparación con el control e identificar el agente que reduce la sensibilidad a la radiación si el RIN indica que la integridad del ARN no ha cambiado en comparación con el control.
- 10
14. El método de la reivindicación 13, en el que el método comprende además medir la concentración de ARN de la muestra después de que la fuente de células se exponga a una dosis de radiación y compararla con un control, en el que el agente de ensayo se identifica como sensibilidad creciente a la radiación si la concentración de
- 15 ARN disminuye en comparación con el control y como sensibilidad decreciente a la radiación si la concentración de ARN no se modifica en comparación con el control.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que la fuente de células es una muestra de células de cáncer de mama o una muestra de células de cáncer de ovario.
- 20

Fig. 1

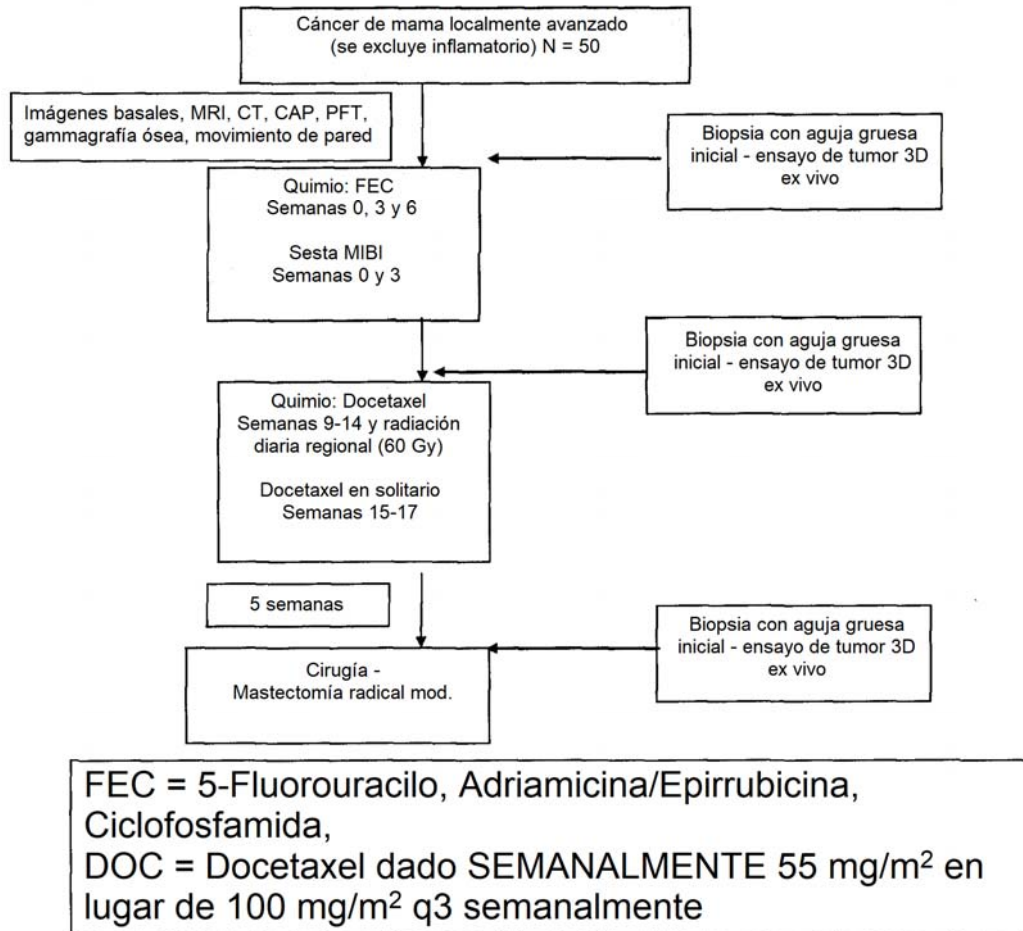


Fig. 2

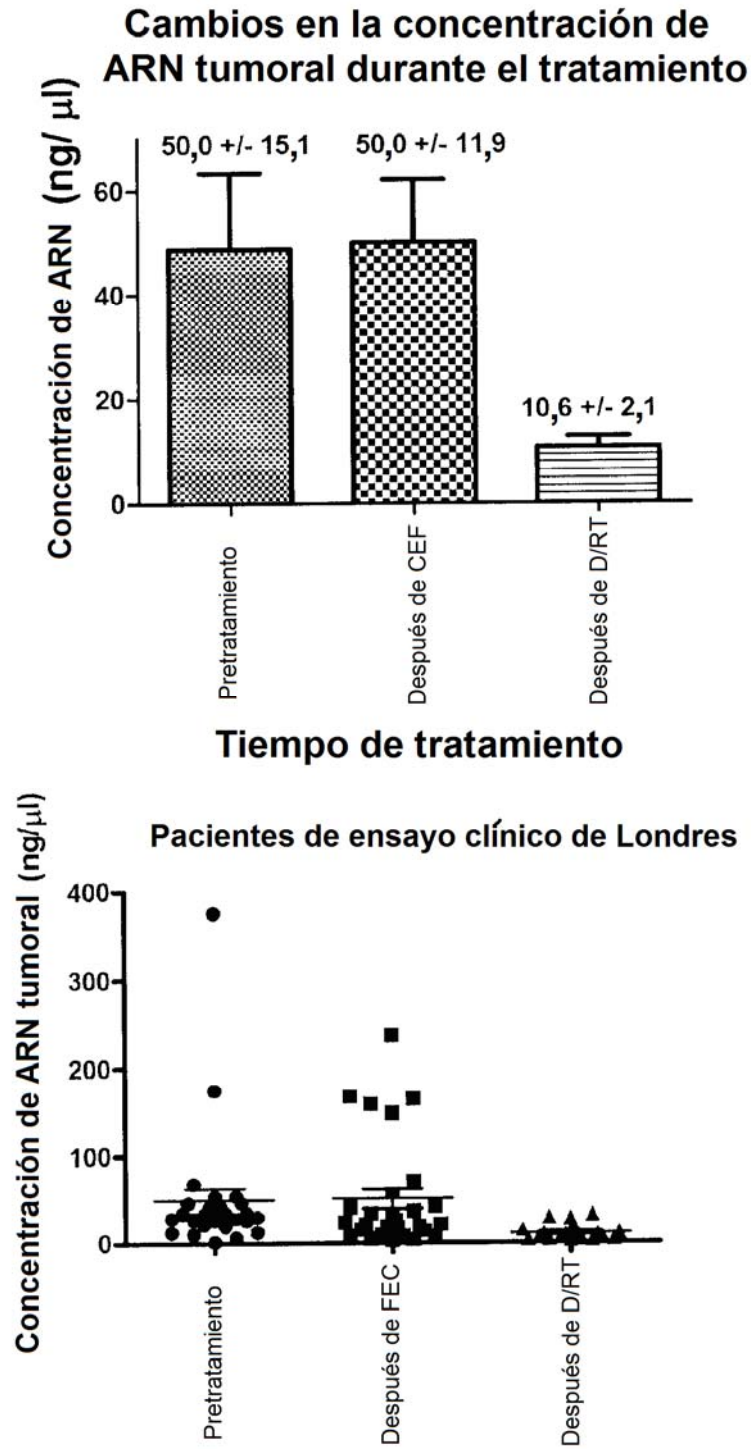


Fig. 3

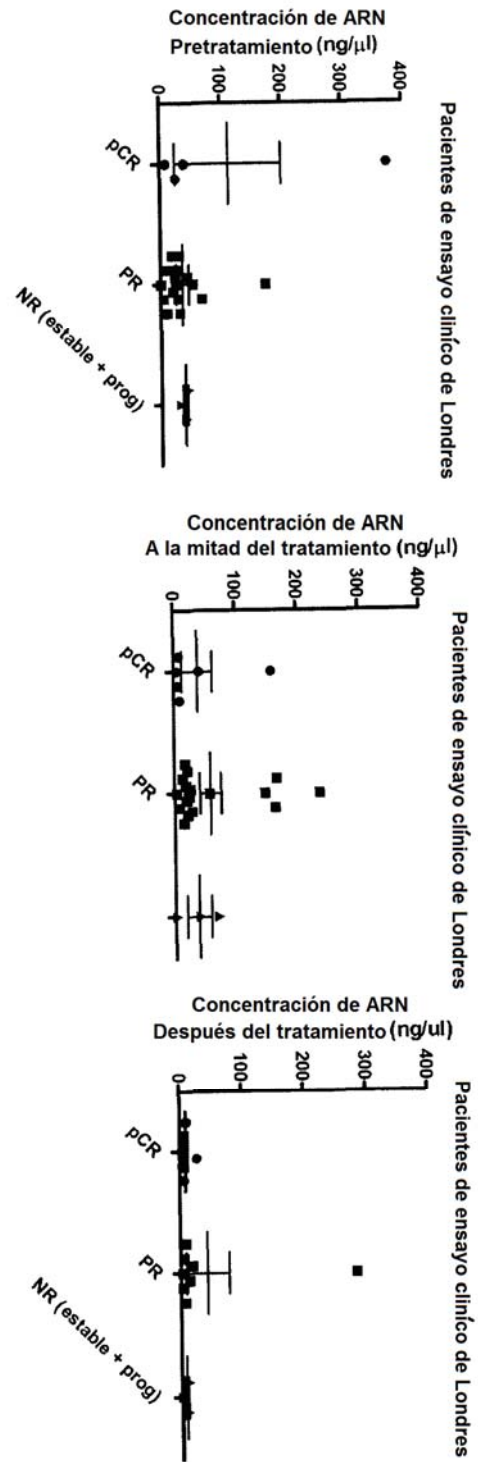


Fig. 4A

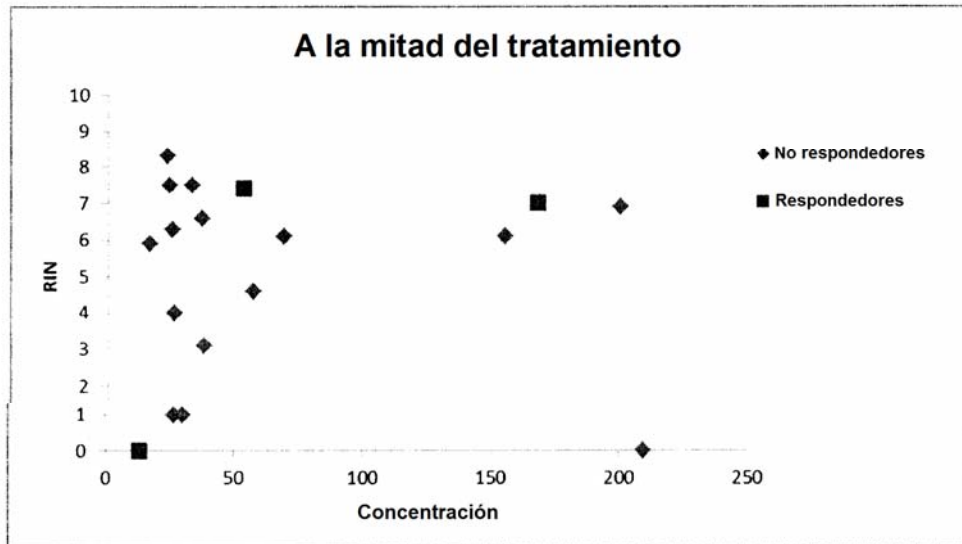


Fig. 4B

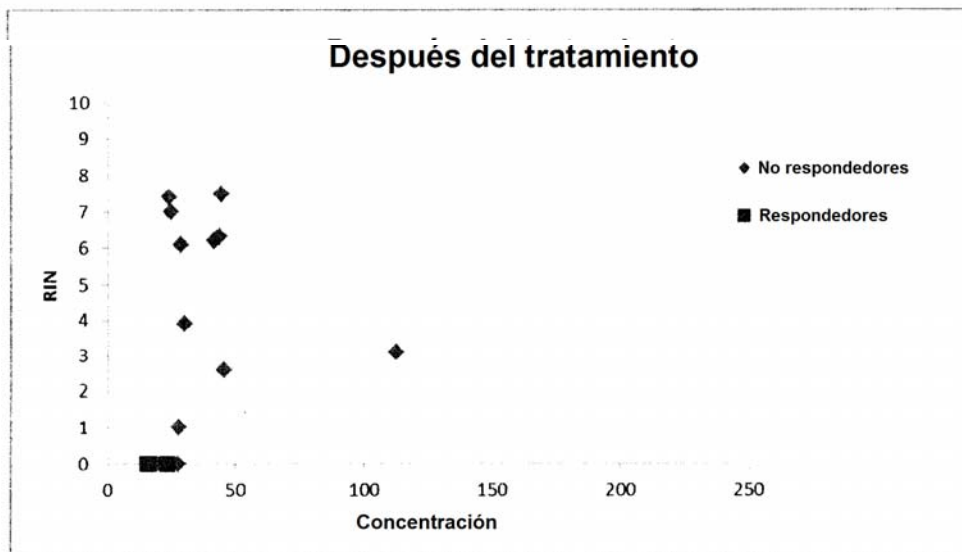


Fig. 5A

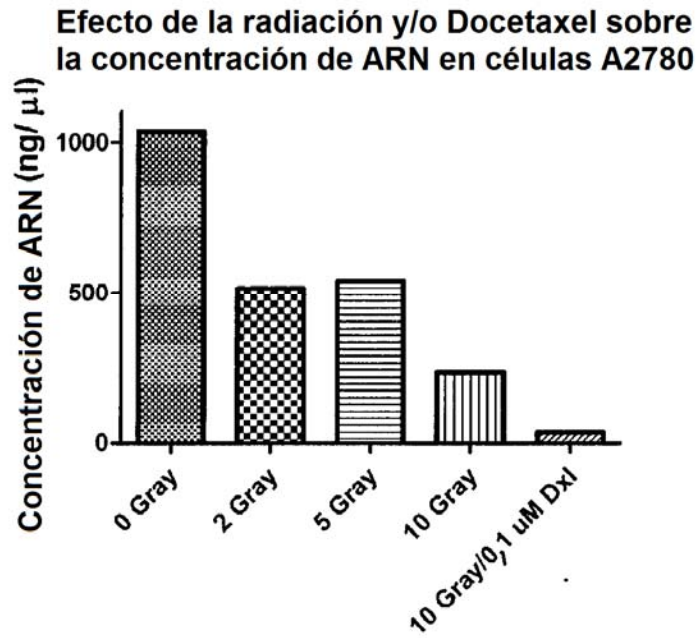


Fig. 5B

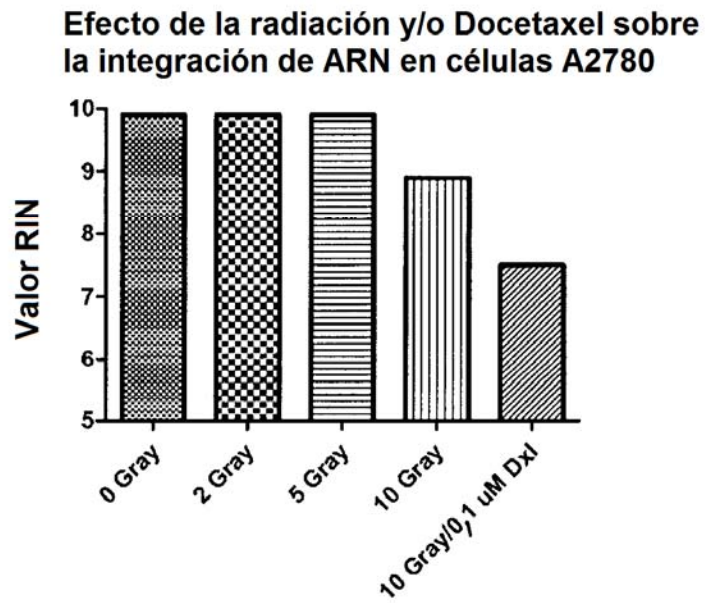


Fig. 6A

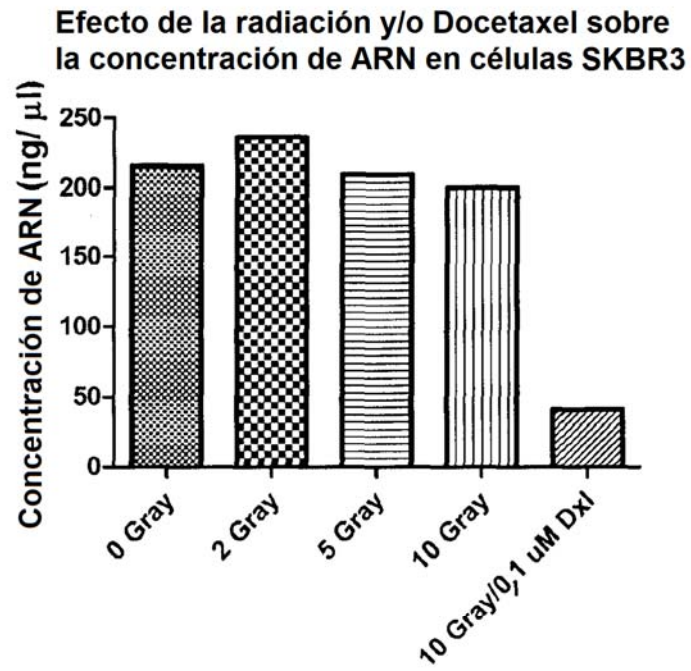


Fig. 6B

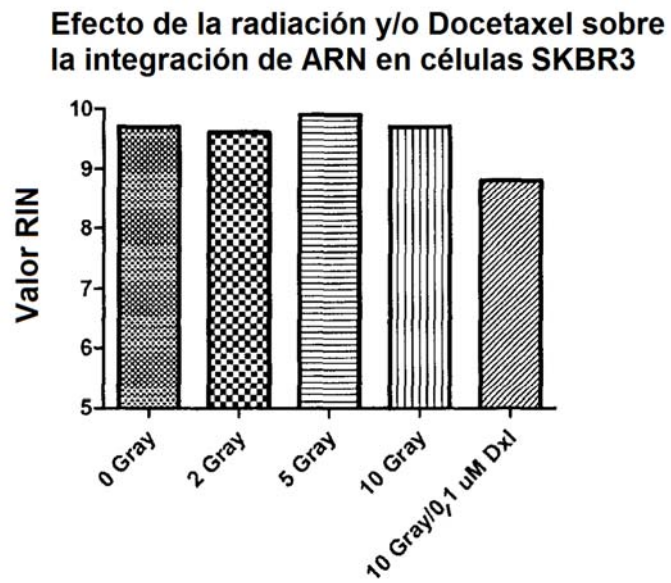


Fig. 7A

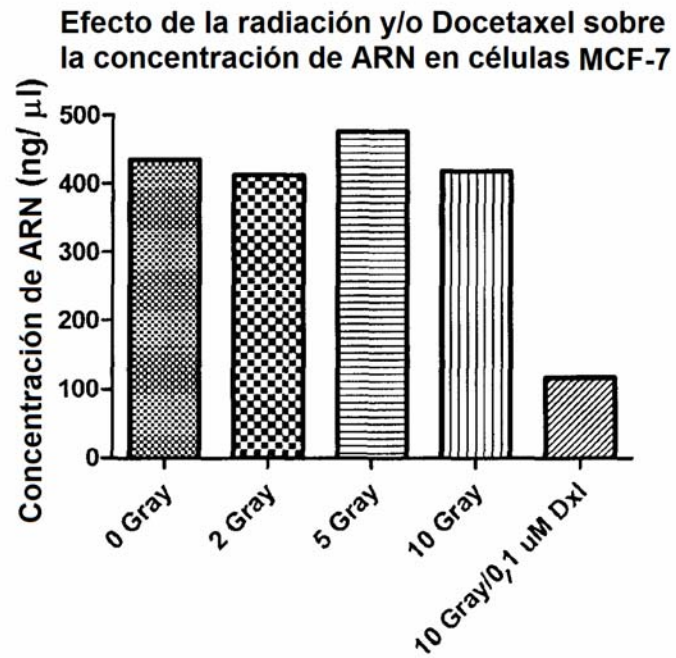


Fig. 7B

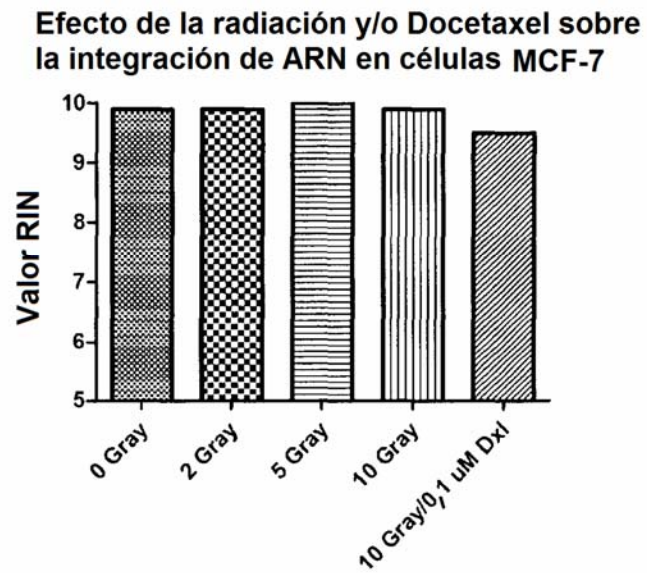


Fig. 8

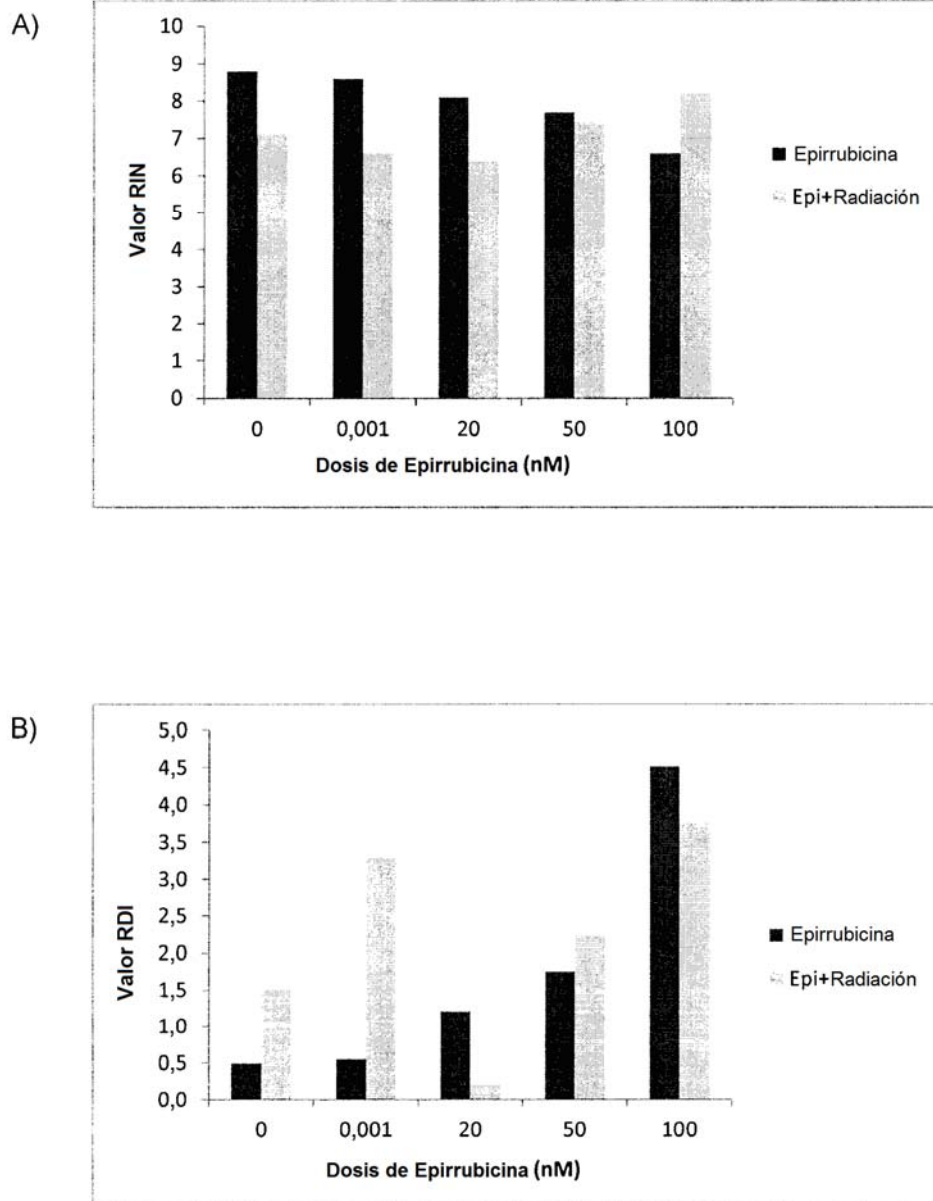


Fig. 8 Cont.

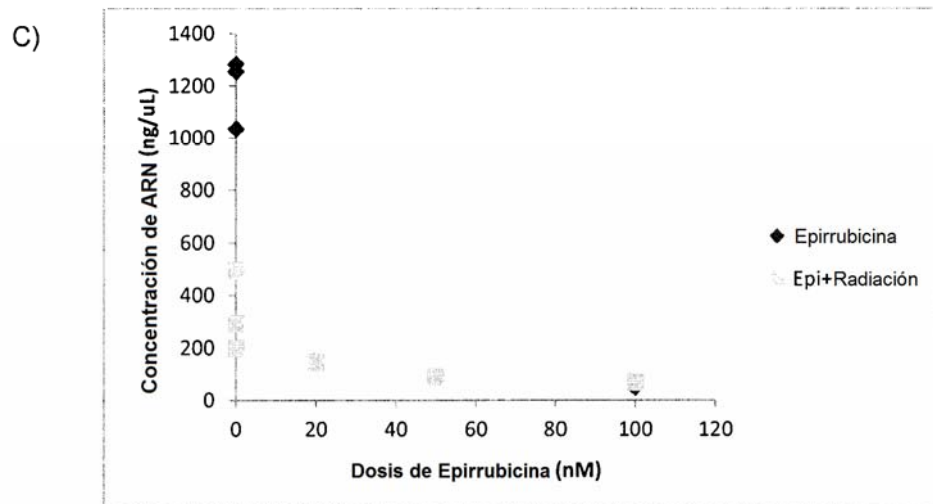


Fig. 9

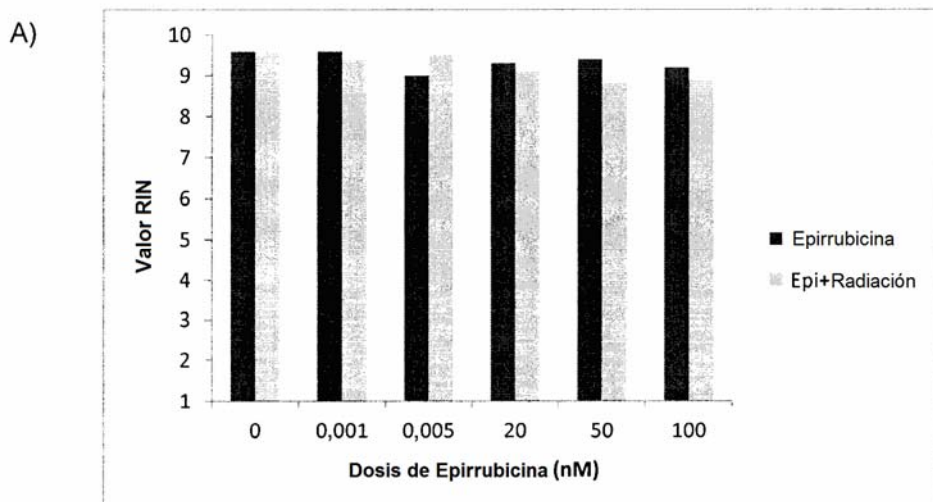
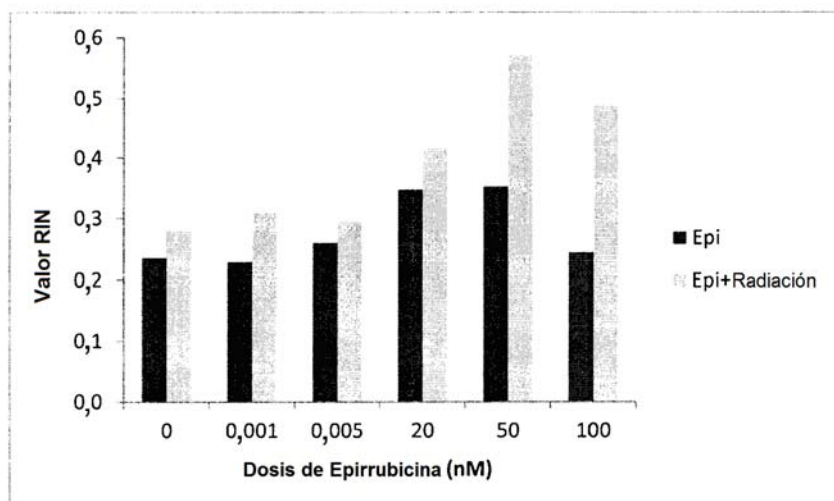


Fig. 9 Cont.

B)



C)

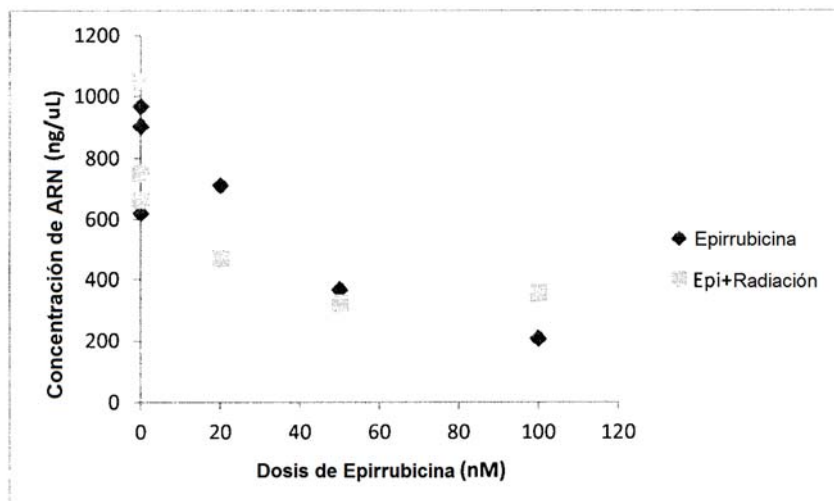


Fig. 10

A)

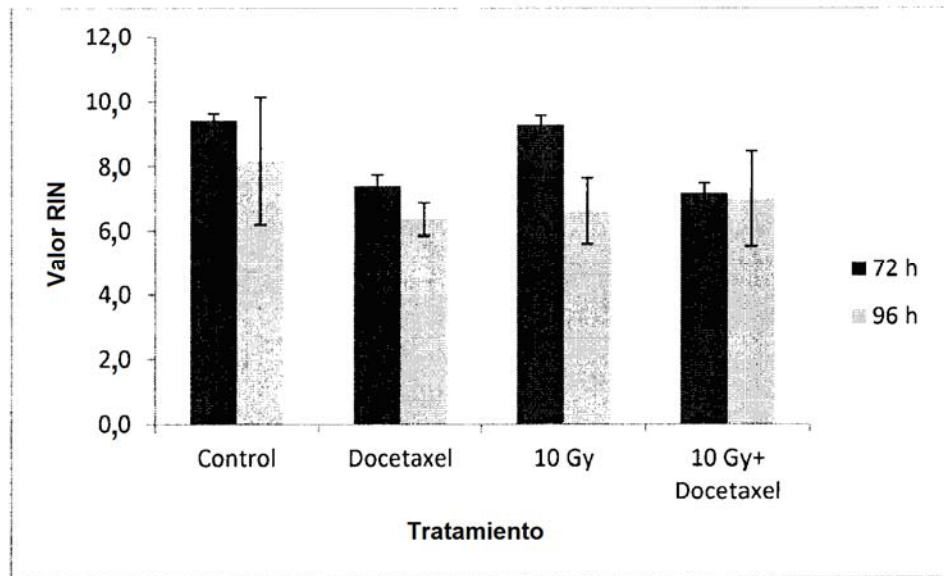


Fig. 10 Cont.

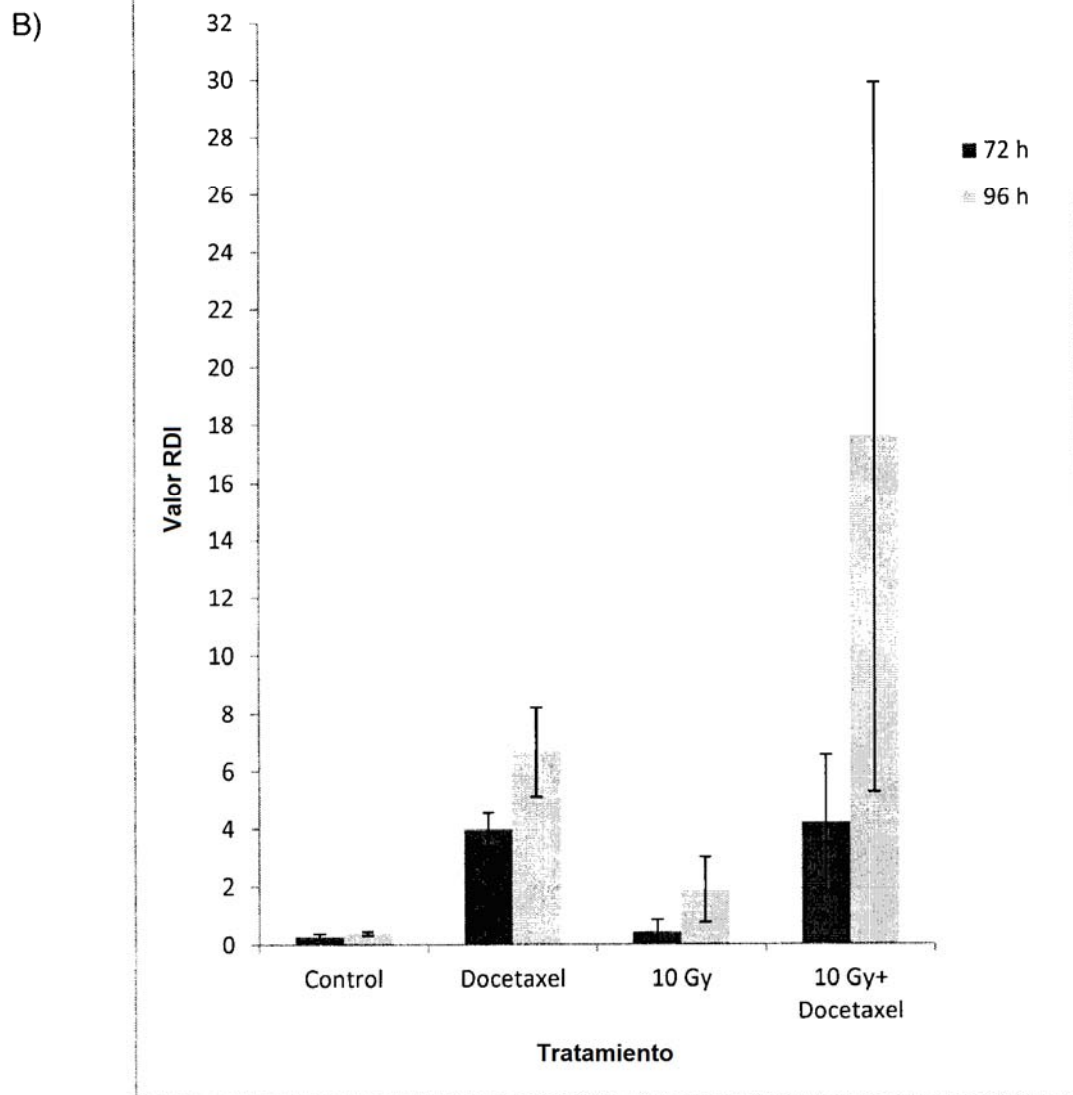
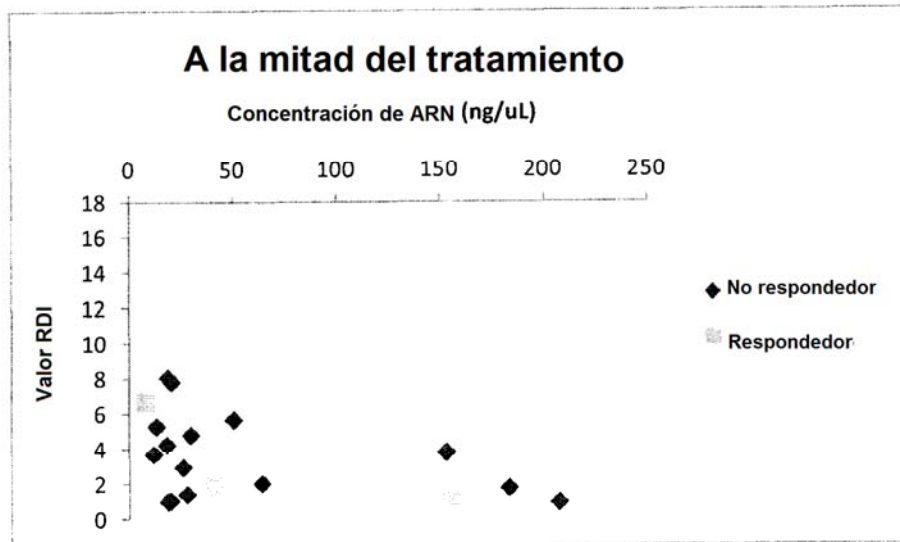


Fig. 11

A)



B)

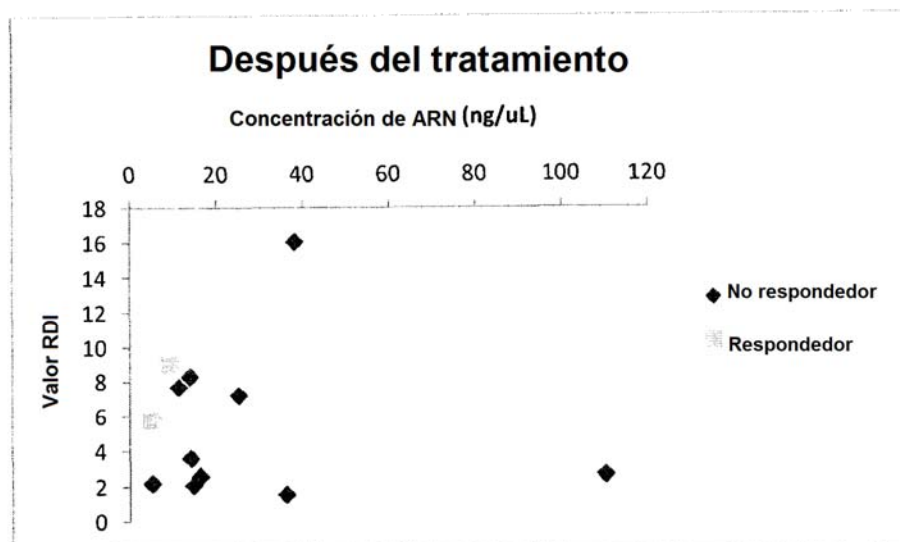


Fig. 12

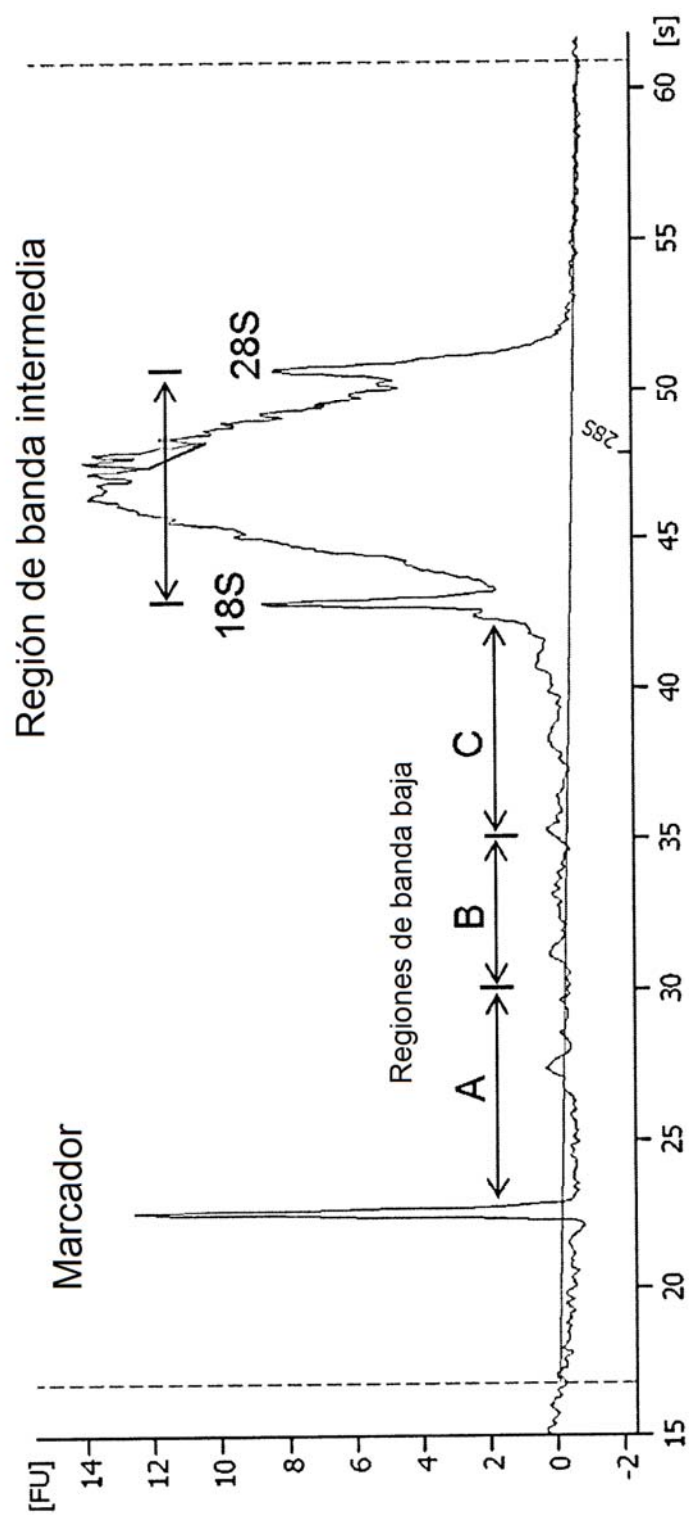


Fig. 13

