

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 485**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012 PCT/US2012/026552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12116295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012 E 12749091 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2678424**

54 Título: **Células progenitoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y células progenitoras endoteliales como indicadores pronósticos para el cáncer**

30 Prioridad:

**24.02.2011 US 201161446296 P**  
**19.08.2011 US 201161525285 P**

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

**10.12.2019**

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)**  
**Center for Technology Licensing at Cornell**  
**University, 395 Pine Tree Road, Suite 310**  
**Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**VAHDAT, LINDA;**  
**RAFII, SHAHIN;**  
**NAIK, RAKHI;**  
**LANE, MAUREEN y**  
**MITTAL, VIVEK**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 734 485 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

Células progenitoras hematopoyéticas derivadas de la médula ósea y células progenitoras endoteliales como indicadores pronósticos para el cáncer

5

**Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad sobre la solicitud provisional de EE. UU. 61/446.296 presentada el 24 de febrero de 2011, y la solicitud provisional de EE. UU. 61/525.285, presentada el 19 de agosto de 2011.

10

**Antecedentes de la divulgación**

El cáncer de mama sigue siendo el cáncer diagnosticado más comúnmente entre las mujeres y la segunda causa de mortalidad por cáncer en los Estados Unidos (Jemal A, et al., *CA Cancer J Clin*; 60: 277-300 (2010)). A pesar de los importantes avances en la terapia adyuvante para el cáncer de mama en estadios tempranos, los pacientes siguen teniendo de un 20 a un 50 % de probabilidades de recaída en 10 años (Brewster AM, et al., *J Natl Cancer Inst*; 100: 1179-83 (2008)). La metástasis, la etapa final de la progresión del cáncer, es responsable de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer y puede producirse después de un periodo de tiempo extraordinariamente largo después el diagnóstico inicial y el tratamiento (Chiang AC, et al., *N Engl J Med*; 359: 2814-23 (2008), Saphner T, et al., *J Clin Oncol*; 14: 2738-46 (1996)). Tradicionalmente, la probabilidad de metástasis se había correlacionado con el tamaño tumoral y el estado ganglionar en el cáncer de mama, pero los datos recientes sugieren que el subtipo molecular puede superar en último término todos los factores pronósticos tradicionales teniendo los subtipos basal y HER2/neu los peores pronósticos (Perou CM, et al., *Nature*; 406: 747-52 (2000), Sorlie T, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*; 98: 10869-74 (2001), Sorlie T, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100: 8418-23 (2003), Cheang MC, et al., *Annu Rev Pathol*; 3: 67-97 (2008)). Aunque se han hecho grandes avances para delinear los factores de riesgo asociados con la recurrencia, no existe un ensayo fiable para anunciar una recaída clínica. Hay disponibles varios marcadores tumorales basados en el suero en la práctica clínica para el cáncer de mama, sin embargo, habitualmente es demasiado tarde para una intervención clínica cuando un marcador tumoral acaba de volverse anormal, para evitar una recaída latente. Por lo tanto, las directrices de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) no recomienda la exploración de rutina con marcadores tumorales como adyuvantes en pacientes con cáncer de mama (Harris L, et al., *J Clin Oncol*; 25: 5287-312 (2007)).

15

20

25

30

Está bien establecido que la angiogénesis tumoral, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del sistema vascular preexistente, así como la diferenciación y migración de células endoteliales, tiene un papel crucial en el crecimiento y metástasis de los tumores (Folkman J., *N Engl J Med*; 285: 1182-6 (1971), Carmeliet P, et al., *Nature*; 407: 249-57 (2000)). Sin embargo, se conoce menos con respecto a los mecanismos que permiten la transición de las células cancerosas durmientes, u ocultas, a recaída clínica en pacientes de cáncer. Las pruebas emergentes de los modelos preclínicos sugieren que las señales derivadas del tumor estimulan el compartimento quiescente de la médula ósea, que resulta en la expansión y movilización de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) (BMD) VEGFR1<sup>+</sup> y células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR2<sup>+</sup>, entre otras. Las HPC migran hacia el órgano diana y forman agrupamientos, o nichos premetastáticos, que proporcionan un microentorno local permisivo para el reclutamiento de las células tumorales que llegan y el establecimiento de micrometástasis. Entonces se reclutan EPC para la periferia de las lesiones micrometastáticas donde modulan un cambio angiogénico, la transición de lesiones micrometastáticas avasculares a una enfermedad macrometastática. En estos modelos murinos, la inhibición del VEGFR1<sup>+</sup> reduce significativamente la localización de las HPC en el nicho premetastático y el desarrollo de metástasis. De manera similar, el bloqueo de la movilización de EPC inhibe fuertemente la vasculogénesis e impide la formación de macrometástasis (Lyden D, et al., *Nature Medicine*; 7: 1194-201 (2001), Carmeliet P, et al., *Nature*; 438: 820-7 (2005), Gao D, et al., *Science*; 319: 195-8 (2008)).

35

40

45

50

55

60

La contribución de HPC y EPC a la progresión del cáncer humano y la patogénesis se entiende menos. Las HPC se han implicado en la definición del nicho premetastático en los ganglios linfáticos axilares de los pacientes de cáncer de mama y los ganglios linfáticos pélvicos de pacientes de cáncer de próstata (Kaplan RN, et al., *Nature*; 438: 820-7 (2005), Fujita K, et al., *Cancer Sci*; 100: 1047-50 (2009)). Una revisión del papel de las HPC VEGF1<sup>+</sup> en el inicio de los cambios tempranos en tejidos premetastáticos se proporciona en Kaplan et al. (*Cancer Metastasis Rev*; 25: 521-9 (2006)). Se ha observado una elevación de EPC en pacientes con cáncer con respecto a los controles sanos (Taylor M, et al., *Clin Cancer Res*; 15: 4561-71 (2009)). También se han asociado las EPC con un estadio avanzado y peor pronóstico en varios estudios de cánceres malignos hematológicos y algunos pero no todos los cánceres de mama (Gao D, et al., *Trends Mol Med*; 15: 333-43 (2009), Roodhart JM, et al., *Biochim Biophys Acta*; 1796: 41-9 (2009), Dome B, et al., *Cancer Res*; 66: 7341-7 (2006), Furstenberger G, et al., *Br J Cancer*; 94: 524-31 (2006), Massa M, et al., *J Clin Oncol*; 23: 5688-95 (2005), Richter-Ehrenstein C, et al., *Breast Cancer Res Treat*; 106: 343-9 (2007), Naik RP, et al., *Breast Cancer Res Treat*; 107: 133-8 (2008)).

65

Es bien conocido que los regímenes terapéuticos típicos del cáncer, aunque son eficaces en el tratamiento de los cánceres, se asocian con efectos secundarios significativamente negativos. Por lo tanto, en los pacientes en remisión o sin enfermedad activa, se interrumpe o se limita el uso del tratamiento hasta una progresión o recaída garantizando un tratamiento más agresivo. En los pacientes en riesgo de progresión o recaída futura de cáncer,

sería altamente deseable un biomarcador que indique una progresión o recaída inminente, pero que permita el tiempo suficiente para tratar al paciente antes de que se produzca la progresión o recaída.

Se ha hecho la hipótesis de que la recurrencia tumoral resulta de micrometástasis residuales ocultas que hacen la transición a macrometástasis y se convierte en enfermedad clínicamente detectable. La angiogénesis es fundamental para este proceso y los modelos preclínicos demuestran inequívocamente que se tiene que activar un "cambio angiogénico" para la progresión del soporte tumoral (Folkman J., *Nat Med.*; 1(1):27-31 (1995), Gao D, et al., *Science.*; 319(5860):195-8 (2008), Weidner N, et al., *N Engl J Med.*; 324:1-8 (1991), Iruela-Arispe M, et al., *Thromb Hemostasis.*; 78:672-7 (1997)). Aunque hay muchos componentes críticos de angiogénesis, el cobre ha surgido como esencial ya que los experimentos demuestran una disminución de la proliferación celular endotelial, formación de vasos sanguíneos y crecimiento tumoral con el agotamiento de cobre (Badet J, et al., *Proc Natl Acad Sci USA.*; 86:8427-31 (1989), Brem S, et al., *Am J Pathol.*; 137:1121-42 (1990), Juarez JC, et al., *Clin Cancer Res.*; 12(16):4974-82 (2006), Hassouneh B, et al., *Mol Cancer Ther.*; 6(3):1039-45 (2007)). El cobre parece que modula la angiogénesis mediante múltiples mecanismos incluyendo NF- $\kappa$ B, HIF-1  $\alpha$  y mediante la incorporación en enzimas superóxido dismutasa-1 que contienen cobre (SOD1), proteína-1 de adhesión vascular (VAP-1) y lisil oxidasa (LOX) (11-14). El tetratiomolibdato (TM), un quelante del cobre oral desarrollado para la enfermedad de Wilson, bloquea la angiogénesis mediante la inactivación de los chaperones de cobre y la disminución de la incorporación de cobre en enzimas que contienen cobre (Alvarez HM, et al., *Science.*; 327(5963):331-4 (2010)). El cobre también puede tener un papel en la migración e invasión ya que el cobre perinuclear se transloca al extremo anterior de las proyecciones celulares endoteliales durante la angiogénesis (Finney L, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 104(7):2247-52.3 (2007)). Eventualmente, se transporta a través de la membrana celular en el espacio extracelular resultando en la activación de citocinas proangiogénicas y otras moléculas (Finney L, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 104(7):2247-52.3 (2007)). Los quelantes de cobre alteran la organización de las células endoteliales en los nuevos vasos sanguíneos restringiendo la disponibilidad de cobre extracelular a enzimas que contienen cobre críticas para la fabricación de una estructura vascular madura (Finney L, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 104(7):2247-52.3 (2007)). El agotamiento de cobre en primates no humanos disminuye la circulación periférica de las células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR+, que son necesarias para la formación de nuevos vasos sanguíneos (Donate F, et al., *Br J Cancer.*; 98(4):776-83 (2008)). Aunque las células progenitoras hematopoyéticas VEGFR+ (HPC) y células progenitoras mieloides CD11b+ establecen el nicho premetastático mediante la remodelación de la matriz extracelular (Kaplan RN, et al., *Nature.*; 438(7069):820-7 (2005), Erler JT, et al., *Cancer Cell.*; 15(1):35-44 (2009)), la colonización del nicho premetastático por EPC, entre otras células, activa el cambio angiogénico (Gao D, et al., *Biochim Biophys Acta.*; 1796(1):33-40 (2009)).

El TM quela el cobre mediante dos mecanismos distintos. Cuando se da con alimento, forma un complejo estable con el cobre y proteína y evita la absorción del cobre en el tracto abdominal. Cuando se da entre comidas, se absorbe en la sangre cuando se une al cobre y la albúmina sérica. El cobre unido al TM no queda disponible para la captación celular y se elimina lentamente. El agotamiento de cobre sistémico se mide mediante la ceruloplasmina (Cp) sérica, el principal transportador extracelular del cobre, mientras que el cobre que forma un complejo con el TM es detectable pero no biodisponible (Gartner EM, et al., *Invest New Drugs.*; 27(2):159-65 (2009)). En los estudios en fase I inicial de cáncer maligno avanzado refractario a la terapia convencional, el TM es bien tolerado y eficaz para inducir el agotamiento de cobre manteniendo 15 de 40 pacientes con la enfermedad estable durante al menos 90 días (Brewer G, *Clin Ca Res.*; 6:1-11 (2000)). Un estudio en fase II daba lugar a una enfermedad estable una mediana de 34,5 semanas en 13 pacientes con carcinoma celular renal avanzado (Redman B, et al., *Clin Ca Res.*; 9:1666-16672 (2003)). Los pacientes con mesotelioma maligno en estadio temprano tardaban un el doble de tiempo de progresión de 10 a 20 meses después del adyuvante TM (24). Aunque se producía una toxicidad hematológica de grado 3 o 4 en hasta el 40 % de los pacientes, era reversible y se manejaba fácilmente con reducciones de dosis.

Hay actualmente varios biomarcadores basados en el suero, tales como el CEA y CA15-3, en uso clínico como indicadores de la progresión o recaída del cáncer. Lamentablemente, dichos marcadores anuncian eventos de estadios relativamente tardíos en la progresión del cáncer, y no pueden predecir las recaídas suficientemente pronto en el proceso metastático para ser capaces de diseñar un tratamiento para detener la progresión posterior de la enfermedad. Nowak et al. (*Eur J Cardio-Thor Surg*; 37: 758-3 (2010)) describen el aumento del número de EPC VEGF2<sup>+</sup>CN133<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> circulantes en los pacientes de cáncer de pulmón en comparación con los pacientes sanos, y sugieren una asociación del número de estas EPC circulantes con el estadio y la progresión tumoral. El documento US2010/0150932 describe un método para el control de la metástasis en un paciente de cáncer controlando los niveles de células derivadas de médula ósea VEGF1<sup>+</sup> y un método de inhibición de la formación de tumores administrando un inhibidor de las células derivadas de la médula ósea VEGF1<sup>+</sup>. El documento WO2008/085951 expone que las EPC son reclutadas hacia el tumor precediendo la formación de vasos. La eliminación selectiva de EPC da como resultado el retraso del crecimiento tumoral. Se describe un método de inhibición de la angiogénesis tumoral.

Existe una necesidad urgente de métodos mejores para la predicción de la progresión del cáncer, y de la respuesta o resistencia a la terapia, que proporcione una señal suficientemente temprana para que se puedan administrar tratamientos adicionales para evitar la renovación de metástasis y el aumento de malignidad.

## 65 Breve resumen de la divulgación

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de determinación de la progresión de un cáncer de mama o la recaída de un cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método la medición del nivel de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) y células progenitoras endoteliales (EPC) en muestras de sangre obtenidas de dicho sujeto separadas entre una semana y cuatro meses, donde dichas HPC son VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y dichas EPC son VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>, y la determinación de si hay un aumento en el número de HPC seguido por un aumento en el número de EPC donde el aumento es un aumento de al menos un 10 % del nivel de HPC o EPC, y donde un aumento en el número de HPC seguido por el aumento en el número de EPC indica un aumento del riesgo de progresión o recaída de un cáncer de mama en dicho sujeto.

Los niveles de HPC y EPC pueden medirse al mismo tiempo para determinar si hay un aumento de HPC o EPC. Los aumentos de HPC y EPC indican un aumento de riesgo de la progresión o recaída, pero el espacio de tiempo en el que la afección se puede manifestar difiere dependiendo de si el aumento se ve en las HPC o las EPC. El aumento de HPC se produce antes que el aumento de EPC, con respecto a la aparición de la progresión o recaída. Un aumento en los niveles de HPC indica un aumento del riesgo de progresión o recaída dentro de un año, mientras que un aumento en los niveles de EPC indica que dichos eventos pueden ocurrir dentro de cuatro meses.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un agente terapéutico del cáncer para su uso en un método de reducción del riesgo de progresión del cáncer de mama o recaída del cáncer de mama en un sujeto, donde el sujeto tiene un aumento del número de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) seguido por un aumento del número de células progenitoras endoteliales (EPC), donde dichas HPC son VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y dichas EPC son VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>, según se mide utilizando el método *in vitro* de la invención, y donde el agente terapéutico del cáncer reduce el nivel o actividad de las HPC y/o reduce el nivel o actividad de las EPC, donde el agente terapéutico del cáncer para reducir el nivel o actividad de las HPC es un anticuerpo anti-VEGFR1, y donde el agente terapéutico para reducir el nivel o actividad de las EPC es uno o ambos de entre un quelante del cobre y un anticuerpo anti-VEGFR2.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método *in vitro* de determinación de la respuesta o resistencia al tratamiento del cáncer en un sujeto sometido a tratamiento del cáncer de mama, comprendiendo el método la medición del nivel de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y el nivel de células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> en muestras de sangre obtenidas de dicho sujeto separadas entre una semana y cuatro meses, y la determinación de si hay una disminución o aumento de los niveles de HPC y/o EPC, donde una disminución de al menos un 5 % de los niveles de HPC y/o EPC indica que dicho cáncer de mama del sujeto está respondiendo a dicho tratamiento del cáncer, y donde un aumento de al menos un 10 % de los niveles de HPC y EPC indica que dicho cáncer de mama del sujeto es resistente al tratamiento del cáncer.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Este esquema representa los 2 estudios de los que se han agrupado las observaciones. El Estudio 1 contenía 2 cohortes de pacientes de cáncer de mama (estadios 1 a 3 y pacientes metastáticos), mientras que el Estudio 2 representa pacientes de cáncer de mama en estadio 2 a 4 sin evidencia de enfermedad, pero con alto riesgo de recaída. Abreviaturas: BC = cáncer de mama, NED = sin evidencia de enfermedad, n = número de pacientes, t = número de ciclos de tratamiento, TM = tetratiomolibdato, <sup>a</sup> = pacientes que pueden haber tenido más de 1 respuesta a lo largo del estudio, <sup>b</sup> = 1 paciente que era NED con terapia recayó, por lo tanto, estaba comprendido en el grupo de "recaída", <sup>c</sup> = evaluable en 4 pts.

**Figuras 2A-2B:** Se observa un aumento de HPC VEGFR1<sup>+</sup> (A) y EPC VEGFR2<sup>+</sup> (B) desde la línea basal (barra blanca) inmediatamente antes de la recaída (barra negra) en 7 pacientes de cáncer de mama sin evidencia de enfermedad al entrar en el estudio.

**Figura 3:** Se observa un patrón de características de células progenitoras hemangiogénicas VEGFR1<sup>+</sup> y VEGFR2<sup>+</sup> antes de la recaída del cáncer de mama de los que no había evidencias de enfermedad al entrar en el estudio. Un aumento inicial de HPC VEGFR1<sup>+</sup> es seguido por un aumento de EPC VEGFR2<sup>+</sup> antes de una recaída visible. Se muestran los valores de la mediana de la línea basal, el aumento de HPC, el aumento de EPC y en la recaída de los pacientes con recaída (n = 3). Entre paréntesis, el intervalo en meses *antes* de una recaída visible.

**Figuras 4A-4F:** Cambio en las HPC VEGFR2<sup>+</sup> y EPC VEGFR2<sup>+</sup> desde la línea basal a un momento posterior estratificado según la respuesta a la terapia, como se define por (A, B) progresión de la enfermedad, (C, D) enfermedad que responde, y (E, F) enfermedad estable. 1 punto de datos está fuera de los límites del eje de los gráficos (A, B) y 2 en los gráficos (C, D). La línea horizontal son los valores de la mediana.

**Figuras 5A-5C:** Recuento de células progenitoras hematopoyéticas (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>): (A) Se utilizó la ventana de análisis R1 para seleccionar los eventos de células nucleadas y la ventana de análisis R2 para seleccionar los eventos linfocíticos. (B) Se utilizó la ventana de análisis R2 para seleccionar los eventos de CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> de la ventana de análisis de R1. (C) Las ventanas de análisis del cuadrante se utilizaron para

identificar los eventos VEGFR1<sup>+</sup> de la ventana de análisis R3: se utilizó el isotipo de control (panel superior) para colocar con precisión la ventana de análisis del cuadrante para las células con CD34, VEGFR1 teñidas (panel inferior). Se calculó el número absoluto de HPC por ml de sangre multiplicando el número de eventos HPC recolectados por una relación del recuento absoluto de linfocitos/ ml de muestra de sangre respecto al número de linfocitos (determinado por la ventana de análisis R2) en los datos recolectados (HPC/ml = recuento absoluto de linfocitos x eventos HPC/número de eventos en la ventana de análisis de linfocitos).

**Figuras 6A-6C:** Recuento de células progenitoras endoteliales (CD45<sup>dim</sup> /CD133<sup>+</sup> / VEGFR2<sup>+</sup>): (A) Se utilizó la ventana de análisis R1 para seleccionar los eventos de células nucleadas, y se utilizó la ventana de análisis R2 para seleccionar los eventos linfocíticos. (B) Se utilizó la ventana de análisis R3 para seleccionar los eventos de CD45<sup>dim</sup> de la ventana de análisis de R1. (C) Las ventanas de análisis del cuadrante se utilizaron para identificar los eventos CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup> de la ventana de análisis R3: se utilizó el isotipo de control (panel superior) para colocar con precisión la ventana de análisis del cuadrante para las células con VEGFR2, CD133 teñidas (panel inferior). Se calculó el número absoluto de EPC por ml de sangre multiplicando el número de eventos EPC recolectados por una relación del recuento absoluto de linfocitos/ ml de muestra de sangre respecto al número de linfocitos (determinado por la ventana de análisis R2) en los datos recolectados (EPC/ml = recuento absoluto de linfocitos x eventos EPC/número de eventos en la ventana de análisis de linfocitos).

**Figuras 7A-7B:** (A) ceruloplasmina (Cp) de los pacientes del estudio. (B) reducción de cobre en los pacientes TNBL en comparación con otros subtipos.

**Figuras 8A-8B:** (A) Disminución de EPC con el agotamiento de cobre (B) ninguna disminución de EPC en estado normal de cobre.

**Figuras 9A-9D:** En la cohorte con agotamiento de cobre se observó una gran disminución sostenida de EPC en la cohorte BC triple negativa (A); en comparación con los subtipos de luminal A (B); luminal B (C); y HER2 neu (D).

### Descripción detallada de la divulgación

Los avances en los tratamientos del cáncer han añadido años a la vida de muchos pacientes de cáncer. Sin embargo, el curso y seguimiento a menudo caro de los pacientes de cáncer cuyo cáncer está en remisión, o de quienes el cáncer no progresa, solo se informa cuando un paciente de cáncer ha progresado o recaído finalmente, en cuyo punto el cáncer normalmente se vuelve mucho más agresivo y difícil de tratar. Un método de diagnóstico de predictores precoces de la progresión del cáncer en un punto lo suficientemente temprano para impedir la recaída o que se pueda evitar la progresión, sería tremendamente beneficioso para los pacientes de cáncer y los diagnosticadores.

Con todo, dichos factores de predicción precoz se han mantenido ocultos. Sin embargo, los inventores han identificado tipos de células circulantes que se han asociado de manera demostrable con el desarrollo del cáncer latente. La aparición de un número creciente de estas células en la circulación señala el inicio de eventos fisiológicos que culminan con la recaída o progresión del cáncer. La identificación de estas células de "aviso temprano", específicamente las células progenitoras hematopoyéticas (HPC) VEGFR1<sup>+</sup> y células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR2<sup>+</sup> proporcionan un biomarcador diagnóstico nuevo para la progresión o recaída del cáncer. La identificación de los aumentos de las HPC y EPC es útil además para la optimización de los regímenes de tratamiento para los pacientes de cáncer en remisión, proporcionando información de eventos celulares que dan lugar al desarrollo del cáncer que se puede evitar o enlentecer mediante la administración de tratamientos apropiados. Adicionalmente, las mediciones de HPC y EPC pueden identificar si el cáncer de un paciente responde o es resistente al tratamiento con agentes terapéuticos del cáncer.

Basándose en los datos preclínicos que caracterizan el cambio angiogénico en sistemas de modelos murinos, los inventores diseñaron un estudio para caracterizar el cambio angiogénico en una población con cáncer. A partir del análisis de la relación temporal de HPC y EPC en pacientes de cáncer, los inventores han descubierto una relación predecible de los aumentos de HPC seguidos por aumentos en las EPC, que anuncia una recaída latente en los pacientes de cáncer. Además, los inventores han determinado que los cambios cuantitativos en estas células podrían predecir también la respuesta o resistencia a la terapia en pacientes de cáncer que reciben terapia sistémica para una enfermedad avanzada, que da lugar a la progresión del cáncer en dichos pacientes.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención, se proporciona un método *in vitro* de determinación de la progresión de un cáncer de mama o la recaída de un cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método la medición del nivel de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) y células progenitoras endoteliales (EPC) en muestras de sangre obtenidas de dicho sujeto separadas entre una semana y cuatro meses, donde dichas HPC son VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y dichas EPC son VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>, y la determinación de si hay un aumento en el número de HPC seguido por un aumento en el número de EPC donde el aumento es un aumento de al menos un 10 % del nivel de HPC o EPC, y donde un aumento en el número de HPC seguido por el aumento en el número de EPC indica un aumento del riesgo de progresión o recaída de un cáncer de mama en dicho sujeto.

La expresión "CD45<sup>dim</sup>" es entendida por el experto y se refiere a células que expresan el marcador CD45, pero con mucha menos intensidad, como puede determinarse, por ejemplo, en el análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), con respecto a las células CD45<sup>+</sup> (a las que también se hace referencia como células "CD45 brillantes") tal como monocitos o HPC. Las EPC (a las que también se hace referencia en la técnica como células progenitoras endoteliales circulantes o CEP) se ha postulado que contribuyen a la angiogénesis y ayudan a la formación de nuevos vasos (Bertolini et al., Nat Rev Canc. 6:835-45 (2006); Yoder et al., Blood 109:1801-9 (2007)). Las EPC son menos maduras que las células endoteliales circulantes (CEC) y que son CD45<sup>-</sup>. Por lo tanto, las EPC se asocian con eventos angiogénicos tempranos en oposición a las CEC que representan un fenotipo más maduro y se asocian con eventos más tardíos de angiogénesis.

Los métodos de la invención incluyen la medición de los niveles de HPC y EPC y la determinación de aumentos o disminuciones del número de células y medidas predictivas. Como se utiliza en el presente documento un "aumento" indica un aumento pronunciado del nivel de células relevantes, normalmente de una medición a una medición a una o más mediciones posteriores. En otros casos, un aumento del nivel de las células relevantes se puede determinar a partir de una medición en un sujeto de interés con respecto a un control (por ejemplo, un valor o intervalo de valores para los individuos normales, es decir, sanos). Los aumentos pueden ser aumentos de dos veces los niveles celulares (es decir, el doble de recuentos celulares), un aumento de tres veces los niveles celulares (es decir, el triple de recuentos celulares), un aumento de cuatro veces los niveles celulares (es decir un aumento de cuatro veces el número de células de una medición anterior), o un aumento de cinco veces o mayor. Además del aumento pronunciado descrito como un aumento, también tienen relevancia aumentos menores de los niveles de células relevantes para los métodos de la invención. Los aumentos de los niveles celulares se pueden describir en términos de porcentajes. Los aumentos también se pueden describir en términos de porcentajes. Por ejemplo, un aumento o incremento puede ser un aumento de los niveles celulares de un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % o más. Una "disminución" indica un descenso de una medición a uno o más mediciones posteriores. Una disminución puede ser de un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, o 85 % o una disminución mayor de los niveles celulares de una medición a una o más mediciones posteriores.

Para medir los niveles de HPC y EPC en un sujeto, se puede tomar una muestra de sangre del sujeto.

La muestra de sangre se somete a análisis para determinar el número de HPC y EPC con respecto al número total de linfocitos en la muestra. El análisis puede incluir poner en contacto una muestra con uno o más anticuerpos selectivos para los marcadores de superficie celular de HPC y/o EPC; separando o cuantificando las células basándose en la unión a dichos anticuerpos, y determinando la fracción de células que se une a los anticuerpos. El método se puede llevar a cabo en un dispositivo adaptado para separar o cuantificar las células basándose en la unión a los anticuerpos, y además dicho dispositivo se programa para proporcionar un informe que identifique la fracción de HPC y/o EPC que se unen a los anticuerpos. El dispositivo puede ser un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS). Las mediciones celulares se pueden llevar a cabo, por ejemplo, por inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a transferencias de Western, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, hibridación *in situ*, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunofluorescencia o citometría de flujo. De manera alternativa, la detección puede incluir la detección o cuantificación de ARNm de HPC y/o EPC, por ejemplo, mediante PCR en tiempo real.

Las HPC y EPC se pueden identificar por análisis FACS utilizando las estrategias de ventana de análisis que se proporcionan en el Ejemplo 1 y las Figuras 5A-5C y 6A-6C.

Las muestras se obtienen de un sujeto como determine el médico. Las muestras se pueden obtener una vez a la semana, cada dos semanas, cada cuatro semanas, cada seis semanas, cada mes, cada dos meses, cada tres meses, o cada cuatro meses o más. Las muestras se pueden obtener separadas cada cuatro a seis semanas, cada uno a dos meses, cada uno a tres meses, cada uno a cuatro meses, o cada dos a cuatro meses.

El término "cáncer" se refiere a una clase de enfermedades en las que un grupo de células presentan un crecimiento descontrolado, invasión y metástasis. El cáncer puede ser un tumor sólido, un tumor no sólido, o una metástasis distante de un tumor. Los aspectos de la presente invención se limitan al cáncer de mama.

Como se utiliza en el presente documento, "recaída" o "recurrencia" se define como la aparición de una o más lesiones tumorales nuevas en un sujeto que ha tenido cáncer previamente pero no tenía ninguna prueba visible de cáncer como resultado de una cirugía y/o terapia hasta la recaída. Dicha recurrencia de las células cancerosas puede ser local, producirse en la misma área que una o más lesiones tumorales previas, o distante, produciéndose en un área previamente libre de lesiones tal como en ganglios linfáticos u otras áreas del cuerpo.

La progresión, respuesta al tratamiento y resistencia al tratamiento se definen de acuerdo con las directrices RECIST (Eisenhauer et al., Eur J Cancer 45:228-247, 2009). Para los pacientes con una enfermedad medible, que se define como la presencia de al menos una lesión medible ("lesión diana") como se describe en las directrices RECIST, se

utiliza una evaluación inicial de las lesiones tumorales/ganglios linfáticos, para determinar la línea base de la carga tumoral total, para determinar la respuesta futura o progresión.

"Respuesta al tratamiento" incluye la respuesta completa y la respuesta parcial al tratamiento. "Respuesta completa" (CR) se define como la desaparición de todas las lesiones diana y lesiones no diana y la normalización de los niveles de marcador tumoral. "Respuesta parcial" (PR) se define como una disminución de al menos un 30 % en la suma de los diámetros de lesiones diana. Por lo tanto, "respuesta al tratamiento" incluye al menos un 30 %-100 % en la suma de los diámetros de las lesiones diana o la desaparición de todas las lesiones diana y lesiones no diana y la normalización de los niveles marcadores tumorales. "Progresión" o "enfermedad progresiva" (PD) se define como un aumento de al menos un 20 % en la suma de los diámetros de lesiones diana, progresión (aumento en tamaño) de cualquier lesión no diana existente, y también se determina por la aparición de una o más lesiones nuevas. No CR/no PD se identifica por la persistencia de una o más lesiones diana y/o el mantenimiento de los niveles de marcador tumoral por encima de lo normal. "Enfermedad estable" (SD) se define como un aumento insuficiente para calificarla como una PD, pero con una disminución insuficiente para calificarla como una PR.

El sujeto o paciente puede ser cualquier mamífero, incluyendo un ser humano. En particular, el sujeto puede ser un mamífero que tenía previamente un cáncer, pero parece haberse recuperado como resultado de una cirugía y/o terapia, o que en el presente tiene un cáncer y se ha sometido a terapia para el cáncer, o ha completado un régimen terapéutico de cáncer, o no ha recibido terapia para el cáncer.

De acuerdo con la presente divulgación, en un sujeto que tenía previamente un cáncer pero que se ha recuperado, un aumento de las HPC detectado en dicho sujeto indica un aumento del riesgo o probabilidad de recaída del cáncer en un año, o dentro de 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o 3, a menudo dentro de cuatro a ocho meses. El aumento de riesgo se compara con un sujeto (por ejemplo, el mismo sujeto) sin un aumento en las HPC. De manera similar, en un sujeto que tiene cáncer en el presente, un aumento de las HPC detectadas en dicho sujeto indica un aumento del riesgo o probabilidad de progresión del cáncer dentro de un año, a menudo dentro de cuatro a ocho meses. Esto permite una ventana de oportunidad para el tratamiento para evitar la progresión o recaída del cáncer del sujeto, antes de que se produzca la progresión o recaída. Sin quedar unido a teoría alguna, se cree que un aumento de las HPC sensibiliza los tejidos para el desarrollo futuro del tumor creando áreas "nicho" para el crecimiento tumoral, por lo tanto, un aumento de los niveles de HPC señala el inicio de eventos tumorigénicos antes de que se produzca el crecimiento o recrecimiento tumoral.

Adicionalmente de acuerdo con la presente divulgación, en un sujeto que previamente tenía un cáncer pero que parece haberse recuperado, un aumento de las EPC detectado en dicho sujeto indica un aumento del riesgo o probabilidad de que ocurra una recaída dentro de tres a cinco meses, a menudo dentro de uno, dos o tres meses. El aumento de riesgo se compara con un sujeto (por ejemplo, el mismo sujeto) sin un aumento en las EPC. De manera similar, en un sujeto que tiene cáncer en el presente, un aumento de las EPC detectadas en dicho sujeto indica un aumento del riesgo o probabilidad de progresión del cáncer dentro de un tres a cinco meses, a menudo dentro de uno, dos o tres meses. "Inminente progresión o recaída" se define por lo tanto como la progresión o recaída de dicho cáncer del sujeto dentro de tres a cinco meses, normalmente dentro de uno, dos o tres meses. Por lo tanto, un aumento en las EPC indica que la progresión o recaída del cáncer es inminente, y se garantiza un tratamiento agresivo para parar dicha progresión o recaída. Sin quedar ligados por teoría alguna, se piensa que un aumento en las EPC señala un aumento del desarrollo angiogénico necesario para la formación del tumor.

Los inventores han determinado adicionalmente que el aumento en HPC y/o EPC en una muestra de un sujeto sometido a un tratamiento terapéutico de un cáncer, respecto a las mediciones de HPC y EPC en una muestra del sujeto en un momento anterior, indica que el cáncer del sujeto es resistente al tratamiento, y el paciente tiene un aumento de riesgo de progresión del cáncer, con respecto a un sujeto que no presenta un aumento de HPC y/o EPC en sus muestras de paciente durante el tiempo que se somete a tratamiento. De manera similar, los inventores han determinado que las disminuciones en los niveles de HPC y/o EPC en una muestra de un paciente, con respecto a las mediciones de HPC y EPC de la muestra de un paciente en un momento anterior, indica que dicho cáncer del sujeto está respondiendo al tratamiento, y que el riesgo del sujeto a la progresión está reducido con respecto a un sujeto que no muestra una disminución de los niveles de HPC y/o EPC en sus muestras de pacientes durante el tiempo que se somete a tratamiento.

Por lo tanto, en otro aspecto, adicional de la presente invención proporciona un método *in vitro* de determinación de la respuesta o resistencia al tratamiento del cáncer en un sujeto sometido a tratamiento del cáncer de mama, comprendiendo el método la medición del nivel de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y el nivel de células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> en muestras de sangre obtenidas de dicho sujeto separadas entre una semana y cuatro meses, y la determinación de si hay una disminución o aumento de los niveles de HPC y/o EPC, donde una disminución de al menos un 5 % de los niveles de HPC y/o EPC indica que dicho cáncer de mama del sujeto está respondiendo a dicho tratamiento del cáncer, y donde un aumento de al menos un 10 % de los niveles de HPC y EPC indica que dicho cáncer de mama del sujeto es resistente al tratamiento del cáncer.

Debido a que los aumentos de HPC y EPC se han identificado como "avisos tempranos" para la progresión o

recaída del cáncer, el control de los niveles de estas células proporciona una base importante de optimización de regímenes de tratamiento.

5 Los términos "tratamiento", "tratar", y similares, como se utiliza en el presente documento incluye la mejora o eliminación de una enfermedad o afección desarrollada una vez que se ha establecido o el alivio de los síntomas característicos de dicha enfermedad o afección. Como se utiliza en el presente documento estos términos también engloban, dependiendo de la enfermedad del sujeto, la prevención de la aparición de una enfermedad o afección del sujeto, incluyendo la reducción de la gravedad de una enfermedad o afección o los síntomas asociados con esta antes de padecer dicha enfermedad o afección. Dicha prevención o reducción antes del padecimiento se refiere a la administración de uno o más agentes terapéuticos del cáncer a un sujeto que no padecía en el momento de la de la administración la enfermedad o afección. "Prevención" también engloba la prevención de la recurrencia o recaída de una enfermedad o afección existente previamente o de síntomas asociados a estas, por ejemplo, después de un periodo de mejoría.

15 Por ejemplo, las células progenitoras hematopoyéticas (HPC) VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y el nivel de células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> se pueden controlar en pacientes que parecen haberse recuperado del cáncer, así como los pacientes que tienen un cáncer en el presente. De acuerdo con la presente divulgación, para evitar la recaída o progresión del cáncer, se indica un tiempo óptimo para administrar un agente terapéutico del cáncer que reduzca el nivel o actividad de HPC una vez que se detecta el aumento del nivel de HPC, y donde se indica un tiempo óptimo para administrar un agente terapéutico que reduzca el nivel o actividad de las EPC y/o células cancerosas una vez que se detecta un aumento en el nivel de EPC. En algunas realizaciones, se administra un agente terapéutico del cáncer a un paciente una vez que se ha detectado un aumento el nivel de HPC y no se ha detectado un aumento del nivel de EPC.

25 La expresión "tratamiento del cáncer" se refiere a cualquier tratamiento que reduzca los niveles, función o actividad de las HPC, EPC, y/o células cancerosas y/o produzca la destrucción de dichas células. El tratamiento del cáncer incluye la administración de cualquier agente contra el cáncer incluyendo isótopos radioactivos, agentes quimioterápicos y toxinas tal como toxinas de molécula pequeña o toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos. Ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero no se limitan a maitansinoides, itrio, bismuto, ricino, cadena A de ricino, doxorubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracina diona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina A de Pseudomonas (PE), PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de sapaonaria officinalis, y glucocorticoides y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos. El tratamiento del cáncer incluye adicionalmente la retirada del tejido o células cancerosas mediante cirugía, biopsia, u otros medios.

40 Las dosificaciones recomendadas de agentes para el cáncer utilizadas actualmente para la prevención, tratamiento, y/o manejo del cáncer se pueden obtener a partir de cualquier referencia en la técnica incluyendo, pero no se limitan a Hardman et al., eds., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 10<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, N.Y., 2001; y Physician's Desk Reference (60<sup>a</sup> ed., 2006).

45 La presente invención también proporciona un agente terapéutico del cáncer para su uso en un método de reducción del riesgo de progresión del cáncer de mama o recaída del cáncer de mama en un sujeto, donde el sujeto tiene un aumento del número de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) seguido por un aumento del número de células progenitoras endoteliales (EPC), donde dichas HPC son VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y dichas EPC son VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>, según se mide utilizando el método *in vitro* de la invención, y donde el agente terapéutico del cáncer reduce el nivel o actividad de las HPC y/o reduce el nivel o actividad de las EPC, donde el agente terapéutico del cáncer para reducir el nivel de actividad de las HPC es un anticuerpo anti-VEGFR1, y donde el agente terapéutico para reducir el nivel o actividad de las EPC es uno o ambos de entre un quelante del cobre y un anticuerpo anti-VEGFR2.

55 El agente terapéutico del cáncer de la presente divulgación puede ser un antagonista que inhiba las HPC, EPC, y/o células cancerosas. Un "antagonista" reduce la actividad o función de una proteína y/o célula. Por ejemplo, un compuesto puede actuar como un antagonista inhibiendo, reduciendo o eliminando la expresión proteica, o evitando la actividad proteica, o evitando la interacción de una proteína con otras proteínas, dando como resultado una inhibición de la función o señalización mediada por proteínas, cualquiera de las cuales puede inhibir la actividad o función de una célula. Ejemplos de antagonistas de la presente divulgación incluyen péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, ARNi/ARNip, moléculas pequeñas, agentes quimioterápicos y fragmentos derivados y análogos de los mismos que inhiban la actividad o función de HPC, EPC y/o células cancerosas. Por ejemplo, un antagonista del VEGFR1 puede inhibir la actividad o función de HPC, mientras que un antagonista de VEGFR2 puede inhibir la actividad o función de las EPC.

65 Los tratamientos preferidos reducen el nivel o actividad de las HPC y/o EPC.

Los antagonistas de las HPC y EPC incluyen los anticuerpos terapéuticos comercializados con el nombre cediranib

(AZD2171/Recentin<sup>RTM</sup>; AstraZeneca), sunitinib (Sutent<sup>RTM</sup>; Pfizer), axitinib (Inlyta<sup>RTM</sup>; Pfizer), pazopanib (Votrient<sup>RTM</sup>; GlaxoSmithKline), y bevacizumab (Avastin<sup>RTM</sup>; Genentech). Los antagonistas de HPC/EPC también incluyen la proteína inflamatoria 1-alfa de macrófagos (MIP-1-alfa) y LD78 (véase la patente de EE. UU. N.º 5.856.301), la cadena alfa de globina de la hemoglobina y la cadena beta de la hemoglobina, (véase la Pat. de EE. UU. N.º 6.022.848), interferón gamma (véase la patente de EE. UU. N.º 5.807.744), G-CSF humano metionil recombinante (Neupogen<sup>RTM</sup>; Filgastim; Amgen), GM-CSF (Leukine<sup>TM</sup>, Sargramostim; Immunex), eritropoyetina (rhEPO, Epogen<sup>RTM</sup>; Amgen), trombopoyetina (rhTPO; Genentech), interleucina-11 (rhIL-11, Neu-mega<sup>TM</sup>; American Home Products), ligando de Flt3 (Mobista; Immunex), factor hematopoyético multilinjaje (MARstem<sup>TM</sup>; Maret Pharm.), mielopoyetina (Leridistem; Searle), IL-3, factor inhibidor-1 de progenitor mielóide (Mirostipen; Human Genome Sciences), factor de células madre (rhSCF, Stemgen<sup>RTM</sup>; Amgen), e inhibidores de CDK4/6.

Los antagonistas de HPC incluyen los anticuerpos anti-VEGF y los anticuerpos anti-VEGFR1.

Los antagonistas de EPC incluyen los anticuerpos anti-VEGFR2 tales como sorafenib (Nexavar<sup>TM</sup>; Bayer). Un agente anti-angiogénico que antagoniza con la actividad de EPC es el tetratiomolibdato (TM), un quelante del cobre oral. El TM y otros quelantes del cobre disminuyen la circulación periférica de EPC y evitan la angiogénesis.

Los agentes para el cáncer, que incluyen antagonistas de HPC, EPC, y/o células cancerosas, se pueden administrar a un sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se utilizan de manera intercambiable para referirse a una cantidad de una composición de la invención que es suficiente para dar como resultado la prevención del desarrollo, recurrencia o aparición de células madre del cáncer o un cáncer y uno o más síntomas del mismo, para mejorar o aumentar el efecto profiláctico de otra terapia, reducir la gravedad y duración del cáncer, mejorar uno o más de los síntomas del cáncer, evitar el avance del cáncer, producir una regresión del cáncer, y/o aumentar o mejorar los efectos terapéuticos de los tratamientos anticáncer adicionales.

Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz a un paciente en una o más dosis suficientes para paliar, mejorar, estabilizar, revertir o enlentecer la progresión de la enfermedad, o de otra manera reducir las consecuencias patológicas de la enfermedad, o reducir los síntomas de la enfermedad. No es necesario que la mejora o reducción sea permanente, pero puede ser por un periodo de tiempo que varía desde al menos una hora, al menos un día, o al menos una semana o más. La cantidad eficaz se determina en general por el médico con una base de caso por caso y está en la experiencia del experto en la técnica. Normalmente se tienen en cuenta varios factores cuando se determina una dosificación apropiada para alcanzar una cantidad eficaz. Estos factores incluyen la edad, sexo y peso del paciente, la afección que se va a tratar, la gravedad de la afección, así como la vía de administración, forma de dosificación y régimen y el resultado deseado.

Si se determina que un tratamiento de cáncer es ineficaz, según se evidencia por un aumento de las HPC y/o EPC durante el curso del tratamiento, se puede administrar entonces un tratamiento alternativo, por ejemplo, un tipo de agente diferente, al sujeto con la esperanza que se consiga un mejor resultado.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Los aumentos de HPC y EPC predicen la progresión del cáncer

Se inscribieron pacientes de cáncer de mama en uno o dos estudios aprobados por la Junta de Revisión Institucional en el Weill Cornell Medical College (WCMC) Iris Cantor Breast Cancer Center. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

#### Estudio de la población y diseño

**Estudio 1:** Se inscribieron pacientes con cáncer de mama en estadio 1 a 4 confirmado patológicamente del WCMC Iris Cantor Breast Cancer Center desde marzo de 2005 a julio de 2009 y se dividieron en 2 cohortes:

*Cohorte 1:* Se inscribieron pacientes con cáncer de mama en estadio 1 a 3 a continuación de una cirugía definitiva (lumpectomía y evaluación axilar o mastectomía) y antes del inicio de la terapia sistémica adyuvante. La terapia sistémica adyuvante se basaba en la elección del médico y podía consistir en la siguiente: quimioterapia, terapia hormonal, biológica y/o radioterapia. Se obtuvieron especímenes clínicos al inicio de la terapia sistémica, a la mitad de la quimioterapia sistémica y cada tres meses como seguimiento de rutina a partir de entonces.

*Cohorte 2:* Los pacientes con cáncer de mama en estadio 4 con metástasis establecida o con presentación de una enfermedad en estadio 4 recién diagnosticado (cáncer de mama en estadio 4 *de novo*) se inscribieron al comenzar una nueva terapia sistémica. Se obtuvieron especímenes clínicos mensualmente y coincidentes con la exploración por imagen para evaluar la respuesta a la terapia.

**Estudio 2:** Se inscribieron pacientes sin evidencia de cáncer de mama pero con un alto riesgo de recaída con cáncer de mama en estadio 2 confirmado patológicamente o mayor, cáncer de mama triple negativo y cualquier subtipo del cáncer de mama en estadio 3 o el estadio 4 sin evidencia de enfermedad (estadio 4 NED) en un ensayo de fase II de tetratiomolibdato (TM), un compuesto de agotamiento del cobre en el WCMC Iris Cantor Breast Cancer Center (NCT00195091, 0903-882) desde julio de 2007 a junio de 2010. En este ensayo, se obtuvieron especímenes clínicos con una base mensual durante hasta dos años.

### Respuesta clínica

La respuesta se basó en los Criterios de Evaluación de respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) (Eisenhauer EA, et al., Eur J Cancer; 45: 228-47 (2009)). Los pacientes con enfermedad progresiva (PD) comprendían el grupo de "progresión de la enfermedad". Los pacientes con respuesta completa (CR) o respuesta parcial (PR) comprendían el grupo de "enfermedad que responde". Los pacientes con enfermedad progresiva (PD) comprendían el grupo de "progresión de la enfermedad".

### Cuantificación de HPC y EPC

Se obtuvieron muestras de sangre antes de la administración de la quimioterapia. Se recolectaron de diez a 20 ml de sangre venosa en tubos que contenían EDTA y se procesaron en 12 horas. La evaluación de laboratorio de los especímenes en ambos estudios era idéntica. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll. Para cuantificar las EPC circulantes, se tiñeron las células con CD133-PE (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), VEGFR2-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN), y CD45-PerCP (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Para cuantificar las HPC, se tiñeron las células con CD34-FITC (BD Biosciences), VEGFR1-APC (R&D Systems), y CD45-PerCP (BD Biosciences). También se tiñó una alícuota de las células con los controles de isotipo apropiado (anti-IgG1k humana de ratón). Se analizaron las muestras utilizando el citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se recolectaron trescientos mil eventos en la ventana de análisis de células nucleadas (excluyendo residuos y plaquetas). El análisis de los datos se utilizó el software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR). Se hizo una serie de ventanas de análisis consecutivas para incluir y excluir eventos adquiridos para cuantificar las poblaciones específicas tales como CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, VEGFR1<sup>+</sup>. Se calculó el número de EPC y HPC por ml de sangre de la siguiente manera: HPC/ml = (nº de eventos HPC/nº de eventos de linfocitos) x recuento absoluto de linfocitos (linfocitos/ml). EPC/ml = (nº de eventos EPC/nº de eventos de linfocitos) x recuento absoluto de linfocitos (linfocitos/ml).

### Definición de HPC y EPC

La definición de HPC y EPC se basó en los fenotipos identificados (Bertolini F, et al., Nat Rev Cancer; 6:835-45 (2006); Mancuso P, et al., Clin Cancer Res; 15: 267-73 (2009)). Las HPC se definieron como CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, VEGFR1<sup>+</sup>. Las EPC se definieron como CD45<sup>dim</sup>, CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup>.

**Recuento de células progenitoras hematopoyéticas (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/VEGFR1<sup>+</sup>):** (Véase las Figuras 5A-5C) (A) Se utilizó la ventana de análisis R1 para seleccionar los eventos de células nucleadas, y la ventana de análisis R2 para seleccionar los eventos linfocíticos. (B) Se utilizó la ventana de análisis R2 para seleccionar los eventos de CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup> de la ventana de análisis de R1. (C) Las ventanas de análisis del cuadrante se utilizaron para identificar los eventos VEGFR1<sup>+</sup> de la ventana de análisis R3: se utilizó el isotipo de control (panel superior) para colocar con precisión la ventana de análisis del cuadrante para las células con CD34, VEGFR1 teñidas (panel inferior). Se calculó el número absoluto de HPC por ml de sangre multiplicando el número de eventos HPC recolectados por una relación del recuento absoluto de linfocitos/ ml de muestra de sangre respecto al número de linfocitos (determinado por la ventana de análisis R2) en los datos recolectados (HPC/ml = recuento absoluto de linfocitos x eventos HPC/número de eventos en la ventana de análisis de linfocitos).

**Recuento de células progenitoras endoteliales (CD45<sup>dim</sup> / CD133<sup>+</sup> / VEGFR2<sup>+</sup>):** (Véase las Figuras 6A-6C) (A) Se utilizó la ventana de análisis R1 para seleccionar los eventos de células nucleadas, y se utilizó la ventana de análisis R2 para seleccionar los eventos linfocíticos. (B) Se utilizó la ventana de análisis R3 para seleccionar los eventos de CD45<sup>dim</sup> de la ventana de análisis de R1. (C) Las ventanas de análisis del cuadrante se utilizaron para identificar los eventos CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup> de la ventana de análisis R3: se utilizó el isotipo de control (panel superior) para colocar con precisión la ventana de análisis del cuadrante para las células con VEGFR2, CD133 teñidas (panel inferior). Se calculó el número absoluto de EPC por ml de sangre multiplicando el número de eventos EPC recolectados por una relación del recuento absoluto de linfocitos/ ml de muestra de sangre respecto al número de linfocitos (determinado por la ventana de análisis R2) en los datos recolectados (EPC/ml = recuento absoluto de linfocitos x eventos EPC/número de eventos en la ventana de análisis de linfocitos).

### Análisis estadístico

Todos los análisis se llevaron a cabo en un GraphPad Prism Versión 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los resultados se expresaron como medianas e intervalos. En los pacientes metastáticos, se definió la línea basal como el inicio de una nueva terapia sistémica, y se hicieron comparaciones entre la línea basal y los valores de HPC y

EPC tras la respuesta con el ensayo de intervalo con signo de Wilcoxon. Se hicieron comparaciones entre la línea basal y los valores absolutos de linfocitos tras la respuesta con un ensayo *t* pareado convencional. En los pacientes que habían recaído desde un estado de enfermedad sin evidencias, se definió la línea basal como la mediana de los valores de EPC y HPC antes del aumento de EPC o HPC, y se hicieron las comparaciones entre la línea basal y "antes de la recaída" con el ensayo de intervalos con signo de Wilcoxon. Todos los valores de P eran de dos lados con una significación estadística evaluada en el nivel alfa de 0,05.

### Resultados:

Se inscribieron ciento treinta y dos pacientes en dos estudios, Fig. 1. Los datos de ambos estudios se combinaron para analizar los pacientes que entraron en el estudio sin un cáncer de mama visible y que desarrollaron una recurrencia mientras estaban en el estudio ("grupo de recaída": Estudio 1 [estudio de observación]/Cohorte 1 y Estudio 2 [ensayo de TM]). Los pacientes con cáncer de mama en estadio 4 se agruparon de acuerdo con la respuesta mediante RECIST (Estudio 1/Cohorte 2). Las variables demográficas se muestran en la Tabla I.

**Tabla I:** Características del paciente al entrar en el estudio.

	Estudio 1	Estudio 2	Agrupados
Total de pacientes, <i>n</i>	91	41	132
Mediana de edad, <i>y</i> (intervalo)	48 (26-74)	51 (29-66)	49 (26-74)
Estadio 1, <i>n</i> (%)	16 (17,6 %)	0 (0 %)	16 (12,1 %)
Estadio 2, <i>n</i> (%)	24 (26,4 %)	3 (7,3 %)	27 (20,5 %)
Estadio 3, <i>n</i> (%)	21 (23,1 %)	26 (63,4 %)	47 (35,6 %)
Estadio 4, <i>n</i> (%)	30 (33,0 %)	12 (29,2 %)	42 (31,8 %)
<i>De novo</i> , <i>n</i>	808		
Metástasis establecida, <i>n</i>	22	0	22
Sin evidencias de enfermedad, <i>n</i>	0	12	12
Pacientes con adyuvante, <i>n</i>	61	29	90
Quimioterapia	60	28	88
Solo antraciclina	3	1	4
Antraciclina y Taxano	25	27	52
Quimio y trastuzumab	21	5	26
Pacientes metastáticos, <i>n</i>	30	12	42
Mediana de regímenes de quimio, <i>n</i> (intervalo)	2 (0-6)	1 (0-3)	1 (0-6)
Taxanos	22	6	28
Vinorelbina	9	0	9
Gemcitabina	6	0	6
Capecitabina	22	2	24
Ixabepilona	8	0	8
Mediana de regímenes hormonales, <i>n</i> (intervalo)	1(0-4)	1 (0-4)	1 (0-4)
Mediana de biológicos. <i>n</i> (intervalo)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)

De los 102 pacientes que entraron en el estudio no tenían evidencias de enfermedad en el examen físico, datos de laboratorio, marcadores tumorales o imágenes, 10 pacientes desarrollaron una recaída del cáncer de mama visible mientras se hacía el estudio. Tres pacientes recayeron 1 o 2 meses después de entrar en el estudio y no se incluyeron en el análisis. De los siete pacientes evaluables, 3 eran del Estudio 1 y 4 del Estudio 2. Cuatro pacientes tenían un cáncer de mama en estadio 4 sin ninguna evidencia de enfermedad (2 eran positivos al receptor estrogénico [ER], 1 era positivo a HER2/neu, 1 era triple negativo), 2 pacientes tenían un diagnóstico previo de cáncer de mama en estadio 3C (positivo a ER y triple negativo) y 1 paciente tenía un diagnóstico previo de cáncer de mama en estadio 2 (triple negativo). La mediana del tamaño del tumor primario era 3 cm (intervalo de 1,7 a 4,3 cm) y el número positivo de ganglios linfáticos implicados era 1 (intervalo de 1 a 42).

### El aumento creciente de HPC VEGFR1<sup>+</sup> y EPC VEGFR2<sup>+</sup> predice la recaída en pacientes con cáncer de mama que no tienen evidencia de enfermedad

En los 7 pacientes que desarrollaron una recaída sin evidencia anterior de la enfermedad, la mediana de HPC/ml aumentó desde la línea base 645,8 (intervalo 23,5 a 1.914) a 2.899 (intervalo de 1.176 a 37.336) antes de la recaída, *p* = 0,016 (Figura 2A). De manera similar, la mediana de EPC/ml aumentaba desde la línea basal de 21,3 (intervalo de 4,7 a 42,5) a 94,7 (intervalo de 28,2 a 201,3) inmediatamente antes de la recaída *p* = 0,016 (Figura 2B). Para los 4 pacientes del Estudio 2, se obtuvieron especímenes mensualmente permitiendo una vista de la relación temporal

de las HPC y las EPC antes de la recaída (Tabla II). En estos pacientes, emergió un patrón idéntico en las células progenitoras que anunciaba una recaída del cáncer de mama. Un aumento inicial seguido por una disminución de las HPC y un posterior aumento de EPC precedía una recurrencia visible (Figura 3). En estos pacientes, la mediana de tiempo entre un aumento de las HPC y EPC antes de la recaída visible era de 6 meses (intervalo de 4 a 8) y 1 mes (intervalo de 1 a 2), respectivamente. Debido a que el aumento de HPC que antecede la recaída es entre 4 y 8 meses, los 3 pacientes que recayeron dentro de los 2 meses de la entrada en el estudio habían recaído activamente en ese momento por lo tanto se excluyeron de este análisis.

**Tabla II.** Niveles de HPC y EPC por paciente

	Aumento pre HPC	Aumento HPC	Aumento post HPC	Aumento pre EPC	Aumento EPC	Aumento post EPC
<b>paciente 1</b>	0,409	<b>1,579</b>	0,875	0,042498938	<b>0,157751037</b>	
<b>paciente 2</b>	0,403	<b>2,899</b>	1,857	0,021310777	<b>0,090206782</b>	0,01
<b>paciente 3</b>	16,29	<b>34,94</b>	2,81	0,11	<b>0,20</b>	0,03
<b>paciente 4</b>	0,70	<b>16,23</b>	1,26	0,009	<b>0,050</b>	0,000
<b>mediana</b>	0,554	<b>9,565</b>	1,561	0,031904857	<b>0,123978909</b>	0,01

**El aumento creciente de HPC VEGFR1<sup>+</sup> y EPC VEGFR2<sup>+</sup> predice la progresión clínica de enfermedad/resistencia al tratamiento en pacientes sometidos a terapia sistémica**

Treinta pacientes con cáncer de mama en estadio 4 se inscribieron en la Cohorte 2 del Estudio 1 y se sometieron a evaluación al inicio de la terapia y a intervalos de 3, 4 o 6 semanas durante el curso de tres años y 40 ciclos de tratamiento. Ocho pacientes no se incluyeron en el análisis final debido a su muerte antes de la recolección de muestras posterior (4 pacientes) y la pérdida del seguimiento (4 pacientes). Como no se había establecido previamente un intervalo normal para las células progenitoras derivadas de la médula ósea, se necesitaron puntos de tiempo posteriores para la comparación con la línea basal. De los 22 pacientes evaluables, el tratamiento sistémico incluía solo quimioterapia (19 ciclos), terapia hormonal (6 pacientes) y combinaciones de ambos con biológicos (trastuzumab y/o lapatinib [11 pacientes], bevacizumab [2 pacientes], bevacizumab [2 pacientes], y dasatinib [2 pacientes]). Se analizaron las HPC y EPC en los pacientes estratificados por la respuesta según el RECIST (Tabla III). Los pacientes con enfermedad progresiva que representaban 20 ciclos de tratamiento tenían un aumento significativo en HPC precediendo la progresión visible en comparación con los valores de la línea basal al inicio de un nuevo tratamiento (Figuras 4A-4B). La mediana de HPC/ml aumentaba desde la línea basal de 1.696 (intervalo de 10 a 16.470) a 5.124 (intervalo de 374 a 77.605) inmediatamente antes de la progresión, p = 0,0009. La mediana de EPC/ml aumentaba desde la línea basal de 26 (intervalo de 0 a 560) a 71 (intervalo de 0 a 615) antes de la progresión, p = 0,10. La mediana de tiempo entre la línea base y el aumento de HPC y EPC era de 7,5 semanas (intervalo de 4 a 88). No había cambios significativos en la mediana del recuento absoluto de linfocitos (ACL)/ ml en estos pacientes después de recibir la quimioterapia, 1.255 (intervalo de 500 a 2.800) en la línea base y 1.450 (intervalo de 470 a 3.460) después de la quimioterapia, p = 0,08.

**Tabla III:** Mediana de HPC VEGFR1<sup>+</sup>/ml y EPC VEGFR2<sup>+</sup>/ml por respuesta terapéutica en pacientes en estadio 4.

Respuesta clínica	Mediana HPC/ml		Valor de p	Mediana de EPC/ml		Valor de p
	Línea basal	Respuesta		Línea basal	Respuesta	
<b>Enfermedad que responde</b> <i>t = 12</i>	6147	633	0,05	46	23	0,41
<i>Intervalo</i>	912-85070	47-18065		0-197	0-105	
<b>Enfermedad estable</b> <i>t = 8</i>	1309	1188	0,31	78	29	0,15
<i>Intervalo</i>	390-55377	135-20690		11-484	9-331	
<b>Progresión de la enfermedad</b> <i>t=20</i>	1696	5124	0,0009	26	71	0,10
<i>Intervalo</i>	10-16470	374-77605		0-560	0-615	

**Disminución de HPC VEGFR1<sup>+</sup> y EPC VEGFR2<sup>+</sup> predice la respuesta clínica a la terapia sistémica**

Once pacientes con cáncer de mama que representaban 12 ciclos de tratamiento que respondieron a la terapia sistémica tenían una reducción en la mediana de los valores de HPC y EPC (Figuras 4C-4D). La mediana de HPC/ml disminuía desde la línea basal de 6.147 (intervalo de 912 a 85.070) a 633 (intervalo de 47 a 18.065) en la respuesta, p = 0,05. Se veía una tendencia para la disminución de la mediana de EPC/ml; de 46 (intervalo de 0 a 197) en la línea base disminuía a 23 (intervalo de 0 a 105) en la respuesta, p = 0,41. La mediana de tiempo entre la

línea base y la disminución de HPC y EPC era de 6 semanas (intervalo de 4 a 23). La mediana de ALC/ml no cambiaba significativamente después de la quimioterapia en este grupo, 1.150 (intervalo de 600 a 400) en la línea basal y 1.250 (intervalo 260 a 2.800) después de la quimioterapia,  $p = 0,53$ .

- 5 Cinco pacientes con enfermedad estable clínicamente después de 8 ciclos de tratamiento no tenían un cambio significativo en ninguna de las células progenitoras desde la línea basal a un momento después del tratamiento, (mediana 9 semanas, intervalo de 8,5 a 32,5, Figuras 4E-4F). Las HPC/ml se mantenían estables a 1.309 (intervalo 390 a 55.377) en la línea basal en comparación con 1.188 (intervalo 135 a 20.690) en un momento después del tratamiento,  $p = 0,31$ . Las EPC/ml disminuían de 78 (intervalo de 11 a 484) en la línea basal hasta 29 (intervalo de 9 a 331) en un momento después del tratamiento, aunque esto no alcanzaba la significación estadística,  $p = 0,15$ . De manera similar la mediana de ALC/ml no cambiaba significativamente: 1.235 (intervalo de 1.000 a 2.300) a 1.450 (de 720 a 2.300),  $p = 0,7$ .

### 15 Conclusión

- 15 El entendimiento del proceso metastático es crítico para la erradicación de las muertes por cáncer. En este estudio, los inventores identificaron eventos terminales que dan lugar al desarrollo de metástasis visible en cohortes bien definidas de pacientes con cáncer de mama. Los inventores han descubierto un aumento sustancial en las HPC VEGFR1+ meses antes de la recaída seguida por un aumento en las EPC VEGFR2+ precediendo inmediatamente una recaída abierta del cáncer. Sin quedar ligados por teoría alguna, el aumento de HPC antes de la llegada de las EPC circulantes se piensa que representan el inicio del nicho pre-metastático, produciéndose una recaída visible después de que las EPC "encienden" el cambio angiogénico. Se observaba este patrón característico en pacientes sin evidencia objetiva de enfermedades que recayeron, así como en pacientes con metástasis estabilizada que progresaba durante la terapia. En los 92 pacientes sin evidencia de enfermedad que se mantuvieron libres de recaída a lo largo del estudio, este patrón de las HPC y EPC no se observaba. Estas observaciones confirmaban los modelos preclínicos de metástasis en los pacientes de cáncer de mama.

- 30 Además, los niveles de HPC circulantes en pacientes con metástasis clínicas visibles precedía la respuesta terapéutica. El cambio en las HPC era más significativo en los tumores refractarios al tratamiento (grupo de progresión de la enfermedad) sugiriendo que la neoangiogénesis tumoral activa es dirigida por estas células. De hecho, inmediatamente antes de la muerte de un paciente, los niveles de HPC además de las EPC era varias veces mayor que en cualquier momento anterior del curso de tratamiento del paciente. En los tumores sensibles al tratamiento (grupo de enfermedad que responde), se observaba una reducción significativa en las HPC con la terapia. El recuento absoluto de linfocitos en estos pacientes se mantenía estable durante el tratamiento, por lo tanto, es improbable que los efectos supresores de la médula de la quimioterapia contribuyeran a la disminución de HPC observada. Un cambio significativo en las EPC no se producía en ningún grupo, aunque había una tendencia al aumento de EPC en el grupo de progresión de la enfermedad y una disminución de las EPC en el grupo que responde. Esto se podría deber al tiempo del espécimen ya que el cambio angiogénico es un proceso dinámico, y un examen posterior de las EPC incluso una semana más tarde puede revelar un cambio adicional que alcance una significación estadística. No está claro si la movilización de EPC inducida por la quimioterapia, descrita en los modelos de ratón y pacientes humanos puede haber contribuido (Shaked Y, et al., Cancer Cell; 14: 263-73 (2008), Farace F, et al., Ann Oncol; 18: 1421-2 (2007)). El cambio en las HPC puede ser el marcador más robusto para controlar la respuesta terapéutica. Finalmente, como se esperaba con el modelo actual, en los pacientes en los que la enfermedad permanecía estable con la terapia, no había cambios significativos ni en HPC o EPC.

- 45 Es importante reconocer las dificultades de analizar estas células progenitoras. La falta de consenso en la definición del fenotipo de las HPC y EPC o el método óptimo para ensayar estas células puede tener un impacto en la cuantificación precisa. La rareza de estas células en la circulación periférica, constituyendo menos de un 0,0001-0,01 % de las células mononucleares periféricas circulantes, enfatiza adicionalmente esta dificultad (Khan SS, et al., Cytometry B Clin Cytom; 64: 1-8 (2005)). Los niveles de EPC pueden estar afectados por varios factores que incluyen las medicaciones, factores de crecimiento y las comorbilidades comunes tales como una enfermedad cardiovascular (Bahlmann FH, et al., Blood; 103: 921-6 (2004), Friedrich EB, et al., Basic Res Cardiol; 104: 613-20 (2009)).

- 55 El conjunto de datos presentado en el presente documento está anotado y controlado totalmente por estas variables. Además, este estudio sugiere que la relación entre estas dos poblaciones distintas de células progenitoras BMD puede ser más importante que los valores absolutos.

- 60 Hay una clara ventaja en el uso de HPC y EPC como marcador clínico por encima del uso de los biomarcadores basados en suero existentes (por ejemplo, CEA y CA15-3), ya que este último no predice la recaída en el proceso metastático temprano y es un evento relativamente tardío del estadio. En este estudio, 9 de 14 pacientes en ambas cohortes de progresión de la enfermedad y recaída tenían una elevación de un marcador tumoral al menos 2 meses después del aumento de HPC. Posiblemente, este cambio de células progenitoras BMD representa una etapa suficientemente temprano de la progresión de la metástasis que permite la oportunidad de intervenir con una terapia dirigida para promover el mantenimiento de la latencia del tumor y la prevención de la recaída o progresión. Se han introducido varios agentes que se dirigen a las células BMD en la arena clínica con datos prometedores que incluyen

el cediranib, (inhibidor pan-VEGFR ), ramucirumab (IMC-1121B, anticuerpo anti-VEGFR2 ) y IMC-18F1 (anticuerpo anti-VEGFR1 ) (Goss GD, et al., J Clin Oncol; 28: 49-55, Spratlin JL, et al., J Clin Oncol; 28: 780-7, Schwartz JD, et al., Cancer; 116:1027-32). Finalmente, el Estudio 2 descrito en el presente documento es un ensayo clínico en fase II en curso de un compuesto de agotamiento del cobre anti-angiogénico, que pretende modular el cambio angiogénico mediante mecanismos dependientes del cobre, en pacientes de cáncer de mama con alto riesgo de recaída. En este estudio, los pacientes que tenían un agotamiento de cobre adecuado tenían una reducción significativa en las EPC respecto a la línea basal (Jain S, et al., Proc Breast Cancer Symp.; abstr 297 (2010)). Un ensayo clínico que investiga el ramucirumab, un anticuerpo anti-VEGFR2, e IMC-18F1, un anticuerpo VEGFR1, en combinación con capecitabina en mujeres con cáncer de mama metastático está en marcha y se espera que proporcione muchos conocimientos sobre el papel de estas células progenitoras BMD y el efecto de la terapia dirigida sobre el resultado (identificador ClinicalTrials.gov NCT01234402).

Este es el primer estudio que ofrece un conocimiento sobre el cambio angiogénico *in vivo*, específicamente en la recaída y progresión *de novo* de la metástasis del cáncer de mama. Se demuestra ahora que las HPC y EPC circulantes sirven como un biomarcador para predecir la recaída o progresión de la enfermedad, así como que sirven como diana terapéutica para los que tengan alto riesgo de recaída.

## Ejemplo 2- agotamiento de cobre

### Diseño del estudio

Este estudio en fase II, de marcador abierto, de brazo único se llevó a cabo para evaluar los pacientes con cáncer de mama con alto riesgo de recaída. Los pacientes se inscribieron en un ensayo aprobado por la Junta de Revisión Institucional (NCT00195091, 0903-882, 0309006307) en el Weill Cornell Medical College (WCMC) Iris Cantor Breast Cancer Center. Se obtuvo un consentimiento informado por escrito antes de someterse a cualquier procedimiento específico del estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### Objetivos del estudio

Los objetivos primarios eran evaluar la seguridad y cambios en el número de EPC en pacientes tratados con Tetratiomolibdato (TM). Los objetivos secundarios eran para evaluar la supervivencia libre de progresión (PFS), número de HPC, y niveles de factores angiogénicos plasmáticos y citocinas.

### Pacientes

Los pacientes femeninos eran elegibles para la inclusión en el estudio si cumplían los siguientes criterios: tener al menos 18 años de edad; cáncer de mama confirmado histológicamente con a) estadio 3, b) estadio 4 sin evidencia de la enfermedad (NED), o c) cáncer de mama triple negativo; que carezca de evidencia radiográfica, bioquímica o física de cáncer de mama recurrente, al menos 6 semanas desde la quimioterapia, terapia biológica, cirugía, o radiación previa; estado de actuación ECOG de 0 o 1; una función orgánica adecuada (hemoglobina > 10, ANC > 1500, plaquetas > 100.000, Cr < 1,5x de los límites normales, bilirrubina total < 1,5x de los límites normales y AST/ALT < 1,5x de los límites normales).

Los pacientes con cáncer de mama en estadio 2 triple negativo se incluyeron debido a que su riesgo estimado de recaída es equivalente a los pacientes con cáncer de mama positivo el receptor hormonal en estadio 3. Se permitía una terapia hormonal concurrente pero los pacientes no podían recibir quimioterapia o terapia biológica. Los estudios de exploración que se llevaron a cabo a las 4 semanas de la entrada en el estudio incluían un examen físico, estudios de laboratorio (recuento de sangre completa, bioquímica sanguínea, perfil hepático, marcadores tumorales (CEA, CA15-3) y estudios por imagen (tomografía computarizada [CT] del tórax, abdomen y pelvis y escáner óseo o tomografía de emisión de positrones [PET]/CT según la elección del médico).

### Tratamiento

Todos los tratamientos se administraron en una base de paciente ambulatorio. Se adquirió el TM de calidad clínica a granel en Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI) con el IND nº 71380 reservado por la Dr. Linda Vahdat. Se almacenó en lotes de 100 gramos en argón ya que solamente es estable durante 8 semanas cuando se expone al aire (Brewer G, et al., Arch Neurol.; 48:42-7 (1991)). Los farmacéuticos de investigación dispensaban la dosis apropiada de TM en cápsulas de gelatina a los pacientes cada 4-8 semanas y mantenían un cuidadoso inventario utilizando el Formulario de Registro de Recuento de Fármacos NCI. Se llevó a cabo un ensayo de estabilidad de cada nuevo envío y no menos de 4 veces al año.

El TM se administró en dos fases, inducción y mantenimiento: A) *Inducción*: Los pacientes se auto-administraban 180 mg de TM por boca diariamente en 4 dosis divididas hasta que los niveles de Cp descendían a un intervalo diana de 5-16 mg/dl. Un mes de terapia con TM comprendía 1 ciclo. Los niveles de Cp se ensayaban cada 2 semanas durante las 4 primeras semanas y luego semanalmente hasta que se alcanzaba el Cp diana. Cuando los niveles de Cp estaban en el intervalo diana, los pacientes se cambiaban a la fase de mantenimiento. B)

**Mantenimiento:** 100 mg de TM tomados diariamente en dosis divididas. Se hizo un seguimiento de los pacientes cada 2 semanas durante 4 semanas para asegurar que los niveles de Cp eran estables y luego cada 4 semanas. Se permitieron reducciones de dosis en disminuciones de 20 mg para minimizar la toxicidad. Se permitieron aumentos de incrementos de 20 mg cada 2 semanas para mantener los niveles de Cp en el intervalo diana. Los pacientes se retiraban del estudio si desarrollaban progresión de la enfermedad, toxicidad excesiva o no alcanzaban el agotamiento de cobre después de la intensificación de la dosis. Los pacientes llevaban los registros de medicación completados en cada visita. La duración del ensayo fue de 2 años.

### Evaluaciones clínicas y radiográficas

Los pacientes se veían en la línea basal y cada mes a partir de entonces para el examen físico y los estudios de laboratorio que incluían el recuento sanguíneo total, panel metabólico completo, marcadores tumorales, y estudios experimentales. Los pacientes se sometían a diagnóstico por imágenes a elección del investigador, CT de tórax, abdomen, y pelvis o PET/CT cada 6 meses y según se necesitara para evaluar una recaída, utilizando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST).

### Seguridad y tolerancia

Se utilizaron los Criterios de Toxicidad Común para Efectos Secundarios (CTCAE) del Instituto Nacional del Cáncer versión 3.0 para el registro de toxicidad y efectos secundarios. En el evento de toxicidad de grado 3/4, se suspendió la dosificación hasta la recuperación. El tratamiento se retomó a discreción del investigador al 50% de la dosis previa. Si la recuperación no se producía en 2 semanas, el paciente se retiraba del estudio. En el evento de toxicidad de grado 2, la dosis de TM se suspendía hasta la recuperación y se podía iniciar un nuevo ciclo al 100 %. Si recurría la toxicidad de grado 2, se suspendía la dosis hasta la recuperación y el siguiente ciclo se retomaba al 50 %. Todos los pacientes estuvieron disponibles para la evaluación de toxicidad.

### Recuento de las células progenitoras hemangiogénicas

Se recolectaron de diez a 20 ml de sangre venosa en tubos que contenían EDTA y se procesaron en 12 horas. Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll. Para cuantificar las EPC circulantes, se tiñeron las células con CD133-PE (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), VEGFR2-APC (R&D Systems, Minneapolis, MN), y CD45-PerCP (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Para cuantificar las HPC, se tiñeron las células con CD34-FITC (BD Biosciences), VEGFR1-APC (R&D Systems), y CD45-PerCP (BD Biosciences). También se tiñó una alícuota de las células con los controles de isotipo apropiado (anti-IgG1k humana de ratón). Se analizaron las muestras utilizando un citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se recolectaron trescientos mil eventos en la ventana de análisis de células nucleadas (excluyendo residuos y plaquetas). El análisis de los datos se utilizó el software FlowJo (FlowJo, Ashland, OR). Se hizo una serie de ventanas de análisis consecutivas para incluir y excluir eventos adquiridos para cuantificar las poblaciones específicas tales como CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, VEGFR1<sup>+</sup>. Se calculó el número de EPC y HPC por ml de sangre de la siguiente manera: HPC/ml = (nº de eventos HPC/nº de eventos de linfocitos) x recuento absoluto de linfocitos (linfocitos/ml). EPC/ml = (nº de eventos EPC/nº de eventos de linfocitos) x recuento absoluto de linfocitos (linfocitos/ml). Las HPC se definieron como CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, VEGFR1<sup>+</sup> (Figuras 5A-5C). Las EPC se definieron como CD45<sup>dim</sup>, CD133<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup> (Figuras 6A-6C).

### Perfil de factores angiogénicos y citocinas

Se detectó el SDF-1 plasmático mediante un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles plasmáticos de c-kit, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, bFGF, y PIGF se detectaron por un ensayo múltiple (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) con el protocolo del fabricante.

### Análisis estadístico

La población de intento de tratamiento (ITT) consistía en todos los pacientes que recibieron al menos una dosis de TM. Un paciente no tomó el TM después de la inscripción debido a una decisión personal. Se registraron los siguientes resultados: la toxicidad atribuible al TM, el tiempo hasta la progresión de la enfermedad, el número de células progenitoras hemangiogénicas, los marcadores de angiogénesis en el suero. Se calcularon las estadísticas descriptivas de las variables demográficas y angiogénicas para todos los pacientes. La incidencia de efectos adversos y sus intervalos de confianza del 95 % se estimaron utilizando métodos convencionales para las proporciones. Se analizó la PFS utilizando técnicas de análisis de supervivencia. Los valores de la mediana de VEGFR1<sup>+</sup> y VEGFR2<sup>+</sup> se computaron en la línea basal y se compararon con los siguientes momentos mediante el intervalo con signo de Wilcoxon. Todos los valores de p eran de dos lados con una significación estadística evaluada en el nivel alfa de 0,05. Todos los análisis se llevaron a cabo con el SPSS Versión 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). La estrategia de modelo mixto para análisis de medidas repetidas de varianza (RMANOVA) se llevó a cabo para determinar los cambios significativos a lo largo del tiempo den los marcadores séricos de angiogénesis. Se hizo un análisis multivariado para controlar los factores clínicos y patológicos convencionales.

**Resultados:****Características de los pacientes**

5 Entre el 1 de junio de 2007 y el 30 de junio de 2010, se inscribieron 40 pacientes. Veintisiete pacientes permanecen actualmente en el estudio. Las razones de abandono del estudio incluyen la progresión de la enfermedad (6), toxicidad (3) y preferencias del paciente (2) y la pérdida de seguimiento (1). La edad media era de 50 años (con un intervalo de 29 a 66) y más de la mitad de los pacientes (un 65 %) tenían un estado de actuación ECOG de 0 en la línea basal. La mayoría de los pacientes tenía un riesgo muy alto de recaída (es decir, excedían el 60% de riesgo de recaída a los 10 años) incluyendo cualquier subtipo de cáncer de mama en estadio 4 NED (un 30 %), estadio 3 triple negativo (un 12,5 %) y estadio 3 enriquecido en HER2 (un 17,5 %). De los 28 pacientes con adyuvante, 26 (el 92,9 %) habían recibido antraciclina y/o taxano, 7 (un 17,5 %) habían recibido trastuzumab, y 2 (un 5 %) habían recibido quimioterapia a altas dosis seguido por soporte de células madre. Veintiséis pacientes (un 65 %) estuvieron recibiendo terapia endocrina concomitante durante el ensayo. La cohorte metastática había recibido una mediana de 0 regímenes de quimioterapia (intervalo de 0-1).

**Niveles de Ceruloplasmina (Cp)**

20 La población ITT consistía en 39 pacientes. La mediana de la línea basal del nivel de Cp era 29,7 mg/dl (con un intervalo de 21 a 47), que disminuía a un nivel medio de Cp de 14,2 mg/dl (con un intervalo de 7 a 26) a una mediana de 4 semanas. El objetivo de agotamiento de cobre se definió como una Cp por debajo de 17 mg/dl. De los que habían tomado al menos una dosis de TM, el 59 % (23/40) de los pacientes había agotado el cobre eficazmente y 15 pacientes (un 37,5 %) eran incapaces de agotar el cobre. La Cp media de pacientes con el cobre agotado y pacientes con cobre no agotado era de 13,5 y 22,3 mg/dl, respectivamente (Figura 1a). Los pacientes pasaron una mediana del 78% del tiempo (con un intervalo de 58 al 100 %) con niveles diana de Cp durante el estudio. Los pacientes con enfermedad triple negativa tenían una Cp más baja en la línea base (media de 25,9 mg/dl) en comparación con los pacientes con cáncer positivo al receptor hormonal (31,7). El 91 % de los pacientes triple negativos agotaban el cobre satisfactoriamente en comparación con los subtipos de receptor hormonal (un 38-43 %) y los subtipos positivos a HER2 (un 40-67 %) (Figura 7B). Los de tamoxifeno (n = 10) tenían un nivel de Cp en la línea base más alto de 35,9 mg/dl (con un intervalo de 29-45) en comparación con 27,8 (22-36) de inhibidores de la aromatasa (n = 13). Los modelos lineales de efectos mixtos de Cp a lo largo del tiempo demostraban una asociación significativa con el tipo de terapia hormonal concomitante (p = 0,006) y la coadministración de un inhibidor de la bomba de protones (PPI; p = 0,011), y una interacción significativa.

**Niveles de EPC**

40 La mediana del número de la línea base de 0,0398 células/ul (con un intervalo de 0-0,21), que disminuía a lo largo del tiempo a 0,0363 (con un intervalo de 0-0,18) al año de la terapia con TM (Figura 8A). La mayoría de las EPC de los pacientes se mantenían por debajo de la línea basal cuando la Cp estaba en el intervalo objetivo. Los subtipos con alto riesgo (triple negativo, positivo a HER2, y estadio 4 NED) tenían mayores niveles de EPC/ul en la línea basal (0,0456, con un intervalo de 0-0,207) en comparación con los pacientes en estadio 3 positivos al receptor hormonal (0,0277, con un intervalo de 0-0,114) con disminuciones más rápidas de los recuentos de EPC en respuesta al agotamiento de cobre (**Figura 3**). En 4 de 6 pacientes que desarrollaron una recaída durante el estudio, un aumento significativo de las EPC precedía el aumento de un marcador tumoral y la recaída objetiva a los 6 meses.

50 Los modelos lineales de efectos mixtos de las EPC a lo largo del tiempo demostraban una asociación significativa con el tipo de terapia hormonal concomitante (p = 0,0073) y la coadministración de un inhibidor de la bomba de protones (PPI; p = 0,0030), similares a los niveles de Cp. También había una interacción significativa entre el tipo de terapia hormonal, el uso de PPI, o el tiempo (p < 0,0001).

**Toxicidad**

55 El TM total era bien tolerado con pocos efectos adverso. Se administraron 426 ciclos de TM a 39 pacientes en los primeros 12 meses de la terapia. De los 39 pacientes de la población ITT, 3 (un 7,7 %) experimentaron interrupciones, retrasos, reducciones u omisiones de la dosis debido a toxicidad durante el estudio. No hubo muertes relacionadas con el tratamiento.

60 67 ciclos (un 15,7 %) se complicaron por una neutropenia de grado 1/2 en 23 pacientes (un 59,0 %) y 13 ciclos (un 3,1 %) por una neutropenia de grado 3/4 en 9 pacientes (un 23,1 %). El TM se suspendió durante 5 a 13 días hasta la resolución de la neutropenia y se retomó a una dosis menor. Un paciente necesitó el ingreso en el hospital por fiebre neutropénica y se retiró posteriormente del estudio. Se complicaron 50 ciclos (un 11,7 %) por anemia de grado 1/2 en 14 pacientes (un 35,9 %). Solamente 1 ciclo (un 0,2 %) se afectó por anemia de grado 3 en un paciente diagnosticado posteriormente de deficiencia de B12. No hubo incidencias de anemia de grado 4. Ninguno de los pacientes necesitó un soporte de factor de crecimiento.

*Toxicidad no hematológica:* No hubo toxicidad no hematológica de grado 3 o 4. Ocho pacientes tuvieron toxicidad gastrointestinal de grado 1 o 2 (náuseas, vómitos o diarrea) que se manejó solo con un ajuste de dosis. Un paciente que tuvo diarrea de grado 2 debido a la lactosa utilizada como carga en las píldoras de TM abandonó el estudio. Un eructo sulfuroso afectó a 79 de los ciclos (un 18,5 %), que se resolvió con el inicio de un PPI en > 90 % de los pacientes. Se vieron fatiga de grado 1 y neuropatía periférica en 29 (un 6,8 %) y 6 (un 1,4 %) ciclos, respectivamente.

#### **Resultados clínicos**

10 Seis pacientes (un 15 %) desarrollaron recurrencia en los primeros 12 meses de estudio. Tres de estos pacientes tenían una enfermedad de estadio 3 (1 triple negativo) y recayeron a los 2, 3 y 10 meses del TM. Tres pacientes con un estadio 4 NED (1 triple negativo, 1 positivo a HER2) recayeron después de 1, 10 y 10 meses de terapia. De estos 6 pacientes que recayeron, la Cp disminuyó hasta el objetivo en 4 pacientes y las EPC se mantuvieron por debajo de la línea basal solamente en 1 paciente durante la terapia con TM. En todos los pacientes, la PFS a los 10 meses era del 85,0 % (una CI del 95 %, de 74,6-96,8 %). La PFS a los 10 meses era menor en los pacientes en estadio 4 NED en comparación con los pacientes en estadio 2 y 3 (un 75,0 vs un 89,3 %) y en pacientes triple negativos en comparación con pacientes positivos al receptor hormonal (un 81,8 vs un 85,7 %).

#### **HPC y marcadores séricos de angiogénesis**

20 No había cambios significativos en la HPC de pacientes con TM. Las HPC no se asociaban con ningún factor clínico incluyendo el estadio, subtipo molecular, tipo de terapia endocrina, capacidad para agotar el cobre, edad, BMI, o uso de PPI. El SDF1, VEGFR2, y C-kit no cambiaban significativamente en los pacientes durante la terapia ni se asociaban con los niveles de Cp, niveles de EPC, estado de recaída, características de los pacientes o tumorales.

25 En pacientes que recayeron, el SDF1 medio aumento de 2093 a 3052 pg/ml, mientras que el SDF1 de los pacientes que no recayeron disminuyó de 1870 a 1811 pg/ml.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de determinación de la progresión de un cáncer de mama o la recaída de un cáncer de mama en un sujeto, comprendiendo el método la medición de los niveles de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) y células progenitoras endoteliales (EPC) en muestras de sangre obtenidas de dicho sujeto separadas entre una semana y cuatro meses, donde dichas HPC son VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y dichas EPC son VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>, y la determinación de si hay un aumento en el número de HPC seguido por un aumento en el número de EPC, donde el aumento es un aumento de al menos un 10 % del nivel de HPC o EPC, y donde un aumento en el número de HPC seguido por un aumento en el número de EPC indica un aumento del riesgo de progresión o recaída del cáncer de mama en dicho sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, donde la progresión o recaída del cáncer se indica por un aumento de al menos dos veces en el nivel de cada una de HPC y EPC.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde un aumento en el número de HPC seguido por un aumento del número de EPC indica un aumento del riesgo de que ocurra una progresión o recaída del cáncer de mama dentro de un año desde el aumento en el número de HPC, dentro de cuatro meses desde el aumento del número de EPC.
4. Un agente terapéutico del cáncer para su uso en un método de reducción del riesgo de progresión del cáncer de mama o recaída del cáncer de mama en un sujeto, donde el sujeto tiene un aumento del número de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) seguido por un aumento del número de células progenitoras endoteliales (EPC), donde dichas HPC son VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y dichas EPC son VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>, según se mide utilizando el método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y donde el agente terapéutico del cáncer reduce el nivel o actividad de las HPC y/o reduce el nivel o actividad de las EPC, donde el agente terapéutico del cáncer para reducir el nivel de actividad de las HPC es un anticuerpo anti-VEGFR1, y donde el agente terapéutico del cáncer para reducir el nivel o actividad de las EPC es uno o ambos de entre un quelante del cobre y un anticuerpo anti-VEGFR2.
5. Un método *in vitro* de determinación de la respuesta o resistencia al tratamiento del cáncer en un sujeto sometido a tratamiento del cáncer de mama, comprendiendo el método la medición del nivel de células progenitoras hematopoyéticas (HPC) VEGFR1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> y el nivel de células progenitoras endoteliales (EPC) VEGFR2<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> en muestras de sangre obtenidas de dicho sujeto separadas entre una semana y cuatro meses, y la determinación de si hay una disminución o un aumento de los niveles de HPC y/o EPC, donde una disminución de al menos un 5 % de los niveles de HPC y/o EPC indica que dicho cáncer de mama del sujeto está respondiendo a dicho tratamiento del cáncer, y donde un aumento de al menos un 10 % de los niveles de HPC y EPC indica que dicho cáncer de mama del sujeto es resistente al tratamiento del cáncer.
6. El método de la reivindicación 5, donde la respuesta al tratamiento se indica por una disminución de al menos el 10 % en los niveles de HPC y/o EPC.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el agente terapéutico del cáncer para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la medición se lleva a cabo mediante un análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).
8. El agente terapéutico del cáncer para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el nivel de HPC y EPC se mide cada uno a tres meses.

**Figura 1**

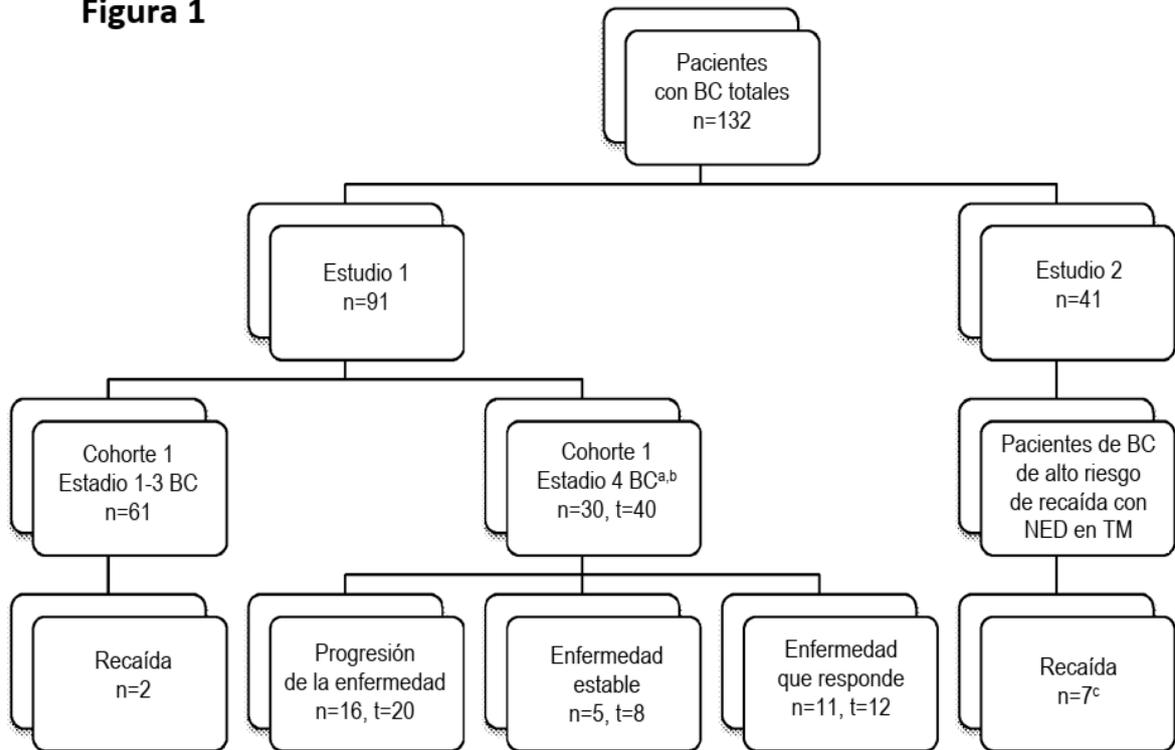


Figura 2

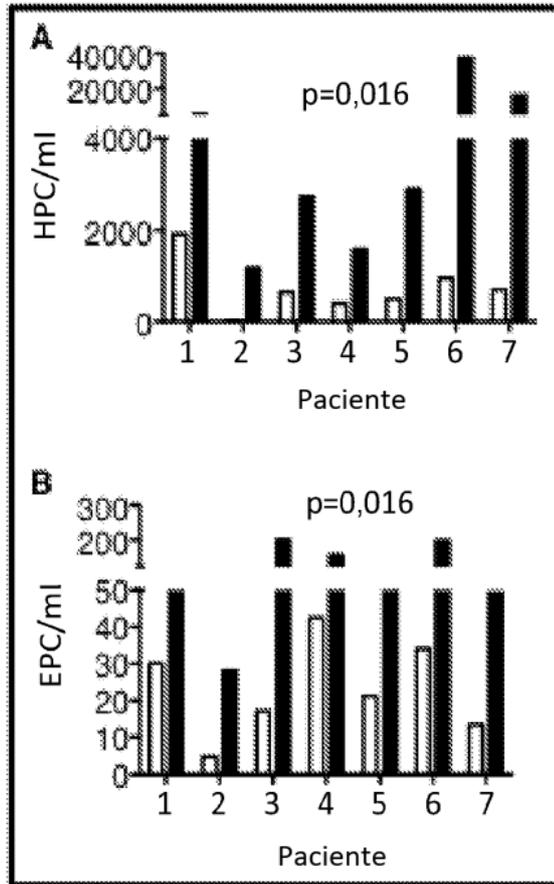


Figura 3

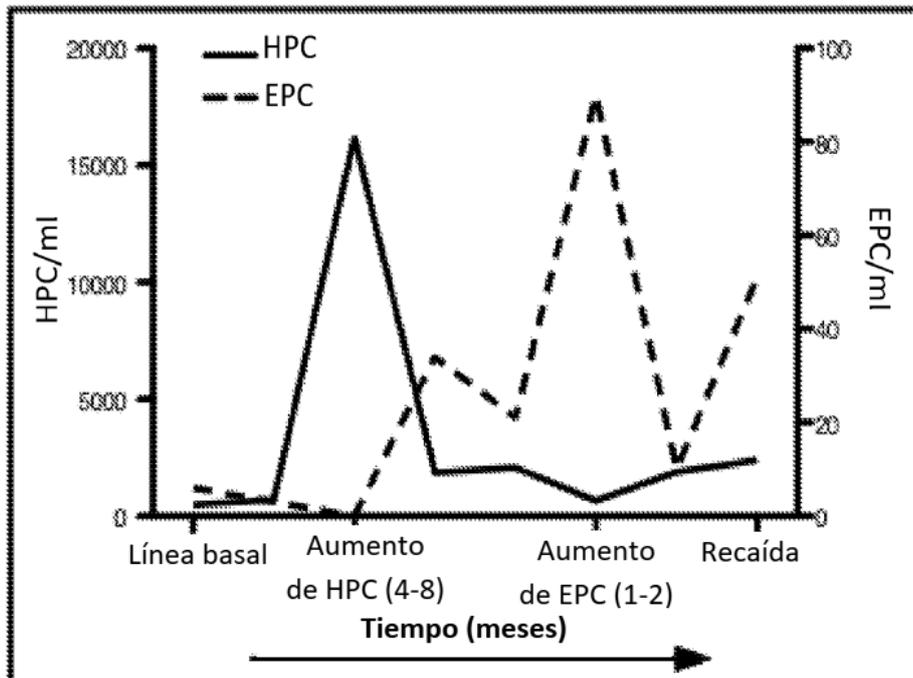


Figura 4

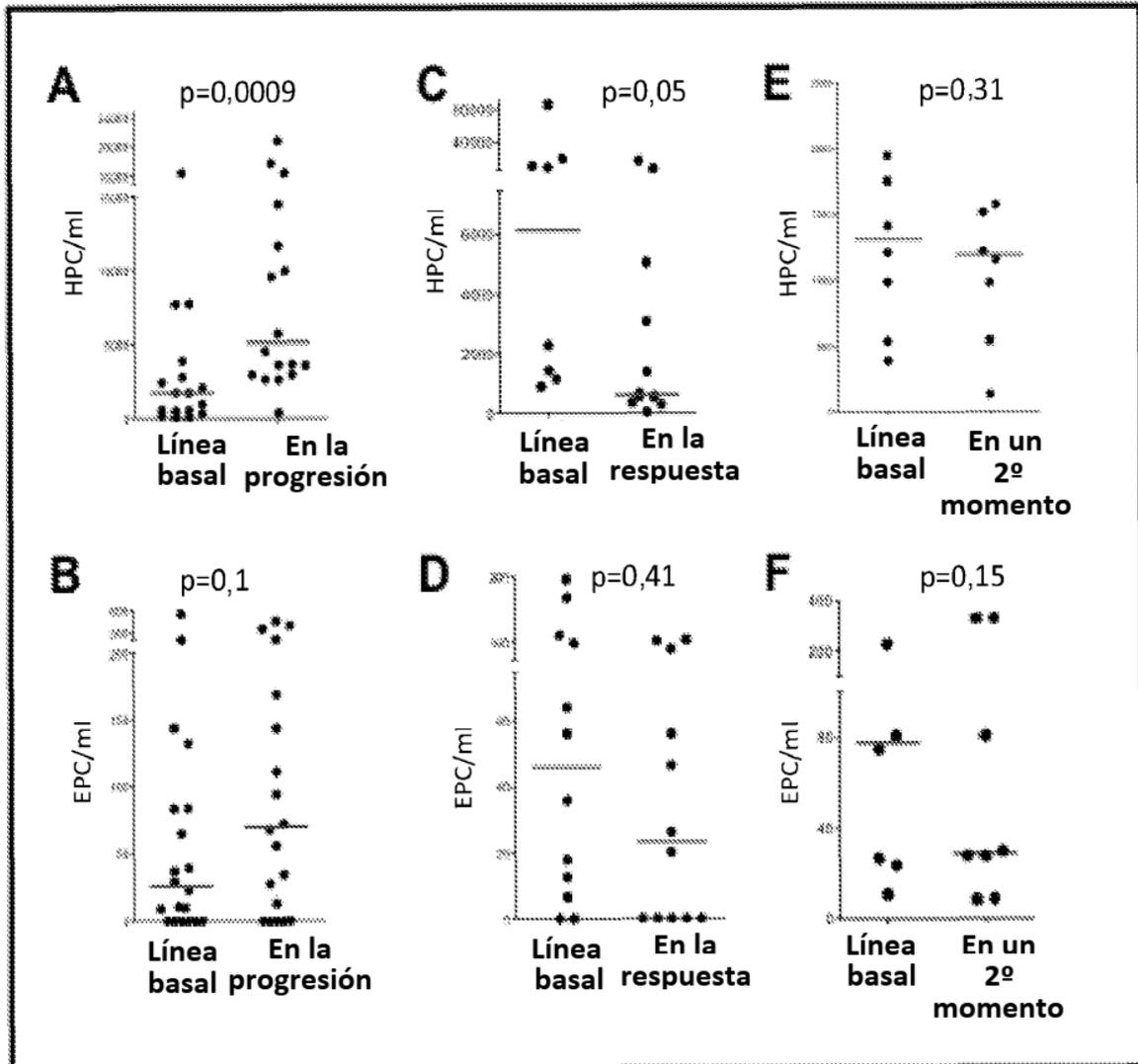


Figura 5

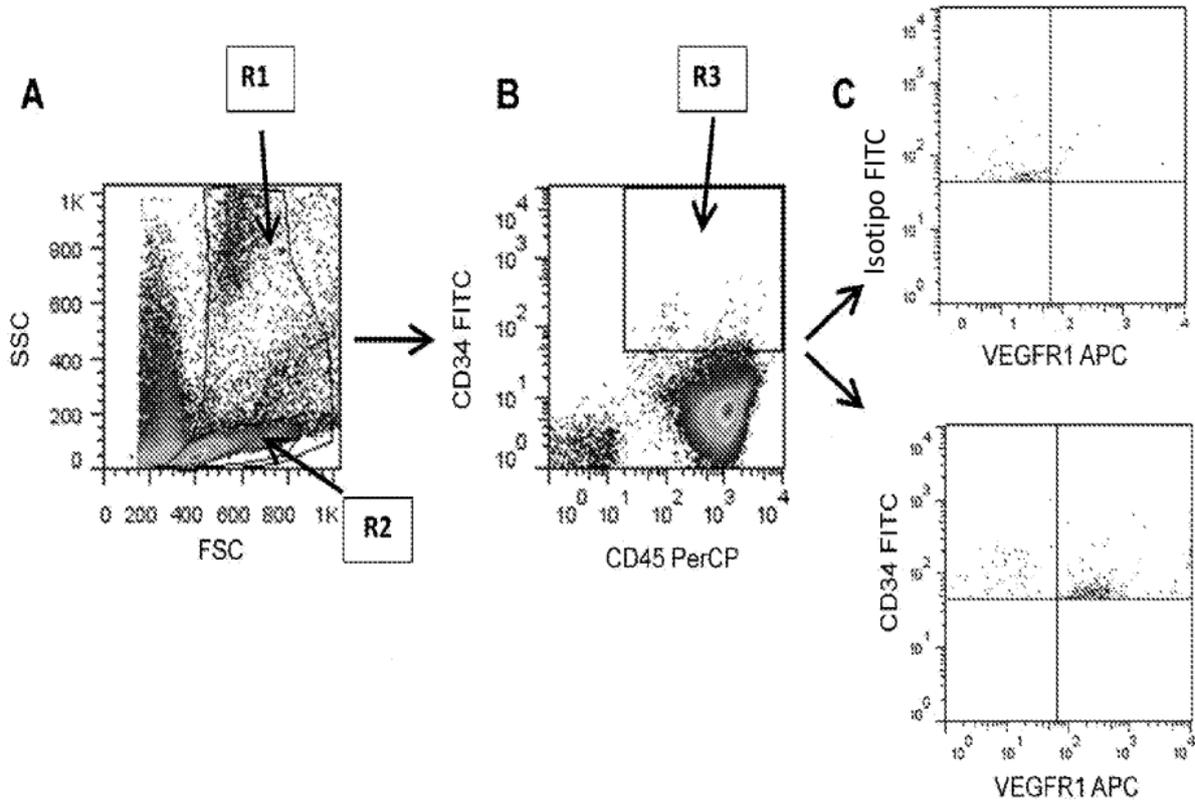


Figura 6

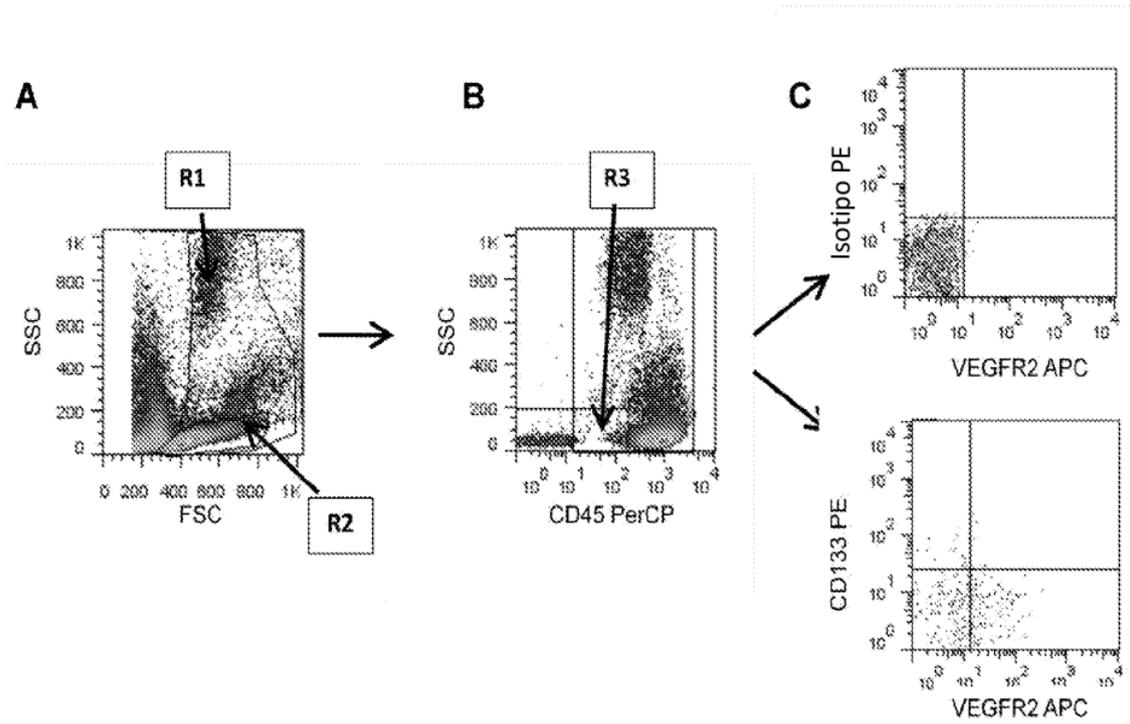
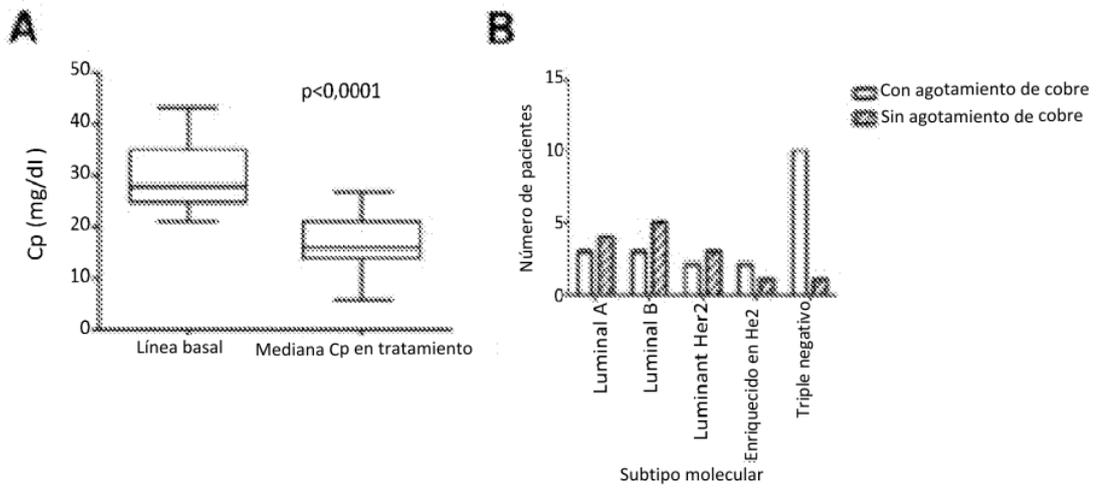
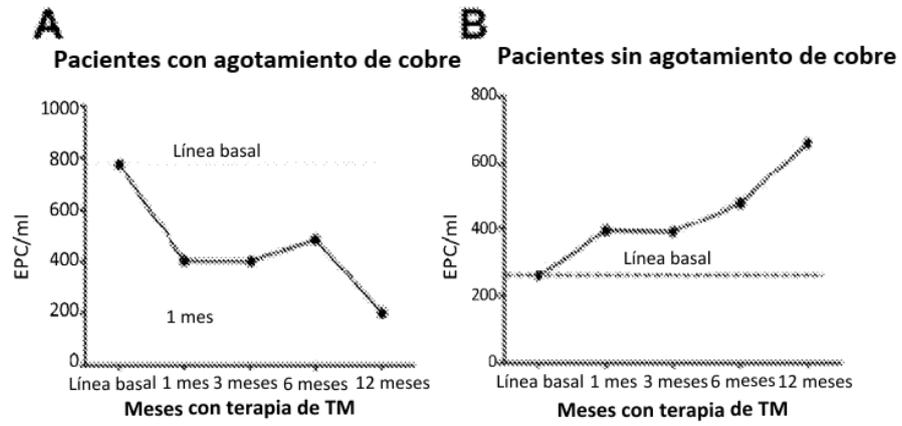


Figura 7



**Figura 8**



**Figura 9**

