

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 981**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2016 PCT/US2016/034261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16191532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2016 E 16731403 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3304074**

54 Título: **Uso del índice mitótico de células tumorales circulantes en la estratificación y diagnóstico de cáncer**

30 Prioridad:

**26.05.2015 US 201562166499 P**  
**02.05.2016 US 201662330529 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.06.2020**

73 Titular/es:

**CREATV MICROTECH, INC. (100.0%)**  
**11609 Lake Potomac Drive**  
**Potomac, MD 20854, US**

72 Inventor/es:

**ADAMS, DANIEL y**  
**TANG, CHA-MEI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 765 981 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

Uso del índice mitótico de células tumorales circulantes en la estratificación y diagnóstico de cáncer

5 **Antecedentes de la invención**

10 Cuando las células tumorales se desprenden de los tumores sólidos malignos primarios, pueden penetrar en la circulación sanguínea o linfática, y finalmente migrar a los órganos o tejidos y formar metástasis. Dichas células tumorales se denominan células tumorales circulantes (CTC) y se encuentran en hasta el 65-85 % de los pacientes con tumores sólidos metastásicos, según el tipo de cáncer.

15 Dado que el 90 % de las muertes relacionadas con el cáncer son causadas por el proceso metastásico, la detección y caracterización de las CTC podría resultar críticas para determinar, entre otras cosas, si se necesita intervención médica para bloquear o retrasar la propagación del cáncer en un paciente. Sin embargo, el uso clínico de las CTC se ha limitado hasta la fecha debido a una variedad de razones, incluida la rareza de las CTC en la circulación y la incapacidad actual para distinguir con precisión los tipos de células altamente agresivas de los tipos de células menos agresivas [1-4].

20 Algunos estudios han indicado que la enumeración de CTC se puede usar como un indicador de pronóstico independiente de la supervivencia en pacientes con cáncer, es decir, un alto número de CTC en la circulación equivale a la supervivencia del paciente a corto plazo [2-4, 17-20]. Por lo tanto, las CTC pueden tener utilidad clínica en que sus números en una muestra de sangre pueden correlacionarse con la información del pronóstico de supervivencia y la respuesta terapéutica en cánceres en etapa tardía [1-3, 19]. Si bien se ha establecido que enumerar las CTC utilizando el umbral de  $\geq 5$  CTC por muestra es valioso para el pronóstico, trasladar esta información al tratamiento directo para mejorar la supervivencia del paciente ha sido difícil [1, 2, 12, 28].

30 Durante muchos años, la investigación de CTC ha intentado diferenciar las CTC clínicamente relevantes de las CTC que no juegan ningún papel en la diseminación metastásica mediante el análisis de las tasas de mutación, proteomas, transición epitelial a mesenquimal etc., para mejorar su utilidad clínica [2, 17, 19, 20, 28]. Recientemente, el fenotipado proteómico y genómico de las CTC individuales ha demostrado que son una población heterogénea de múltiples fenotipos complicados [28, 29] y el subtipado de las CTC por heterogeneidad de biomarcadores es un área de estudio en curso. Sin embargo, la heterogeneidad compleja, los bajos números de CTC por muestra y el hecho de que el 20-35 % de los pacientes en etapa tardía no tienen CTC medibles, son factores de confusión que inhiben la utilidad clínica [1, 2, 4, 12, 19].

35 Como la clasificación del cáncer es una forma de clasificación morfológica, se ha sugerido que la caracterización de los fenotipos de CTC puede proporcionar estratificación pronóstica adicional en pacientes con cáncer [3, 21-23]. Por ejemplo, la clasificación patológica para la diferenciación celular, incluida la evaluación del índice mitótico (IM) en las biopsias de tejido tumoral, es el estándar dorado en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer, y una parte compleja de los algoritmos de estadificación del tumor [1, 5-9]. Los histopatólogos utilizan actualmente la clasificación de las células tumorales filtradas para identificar y clasificar las células cancerosas de una serie de fluidos corporales, incluyendo orina (vejiga) [10], aspirados pulmonares (pulmón) [25] y líquido cefalorraquídeo (cerebro/neurona) [26], aunque no se usa comúnmente para biopsias con base en sangre [3]. Recientemente se ha demostrado que las CTC aisladas de sangre periférica mediante filtros especializados conservan una arquitectura celular detallada, lo que permite una evaluación más descriptiva de las CTC [3, 17, 18, 24]. Por lo tanto, dicha clasificación podría aplicarse a las CTC aisladas por filtro.

40 La incapacidad para proporcionar una evaluación citológica detallada en las CTC también ha llevado a algunos grupos a confiar en el índice de proliferación (IP) en su cuantificación (es decir, MIB-1, PCNA, Ki-67, etc.) [11-14]. Sin embargo, el uso de biomarcadores de IP en el cáncer es un objetivo muy controvertido [13, 14].

55 Konstantinos Tryfonidis et al. en "Detection of Circulating Cytokeratin-19 mRNA-Positive Cells in the Blood and the Mitotic Index of the Primary Tumor Have Independent Prognostic Value in Early Breast Cancer", *Clinical Breast Cancer*, Vol. 14, No. 6, 442-50, evaluaron la asociación de ARNm de citoqueratina (CK)-19 en sangre antes y después de la quimioterapia adyuvante y el índice de actividad mitótica (IAM) de tumores primarios en 223 pacientes con cáncer de mama en estadio temprano.

60 Maria Spiliotaki et al., en "Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women early breast cancer who are candidates for tumor dormancy", *Breast Cancer Research* (2014) 16:485, con el objetivo de caracterizar las células tumorales circulantes (CTC) en las candidatas latentes (CL) con cáncer de mama temprano en términos de proliferación y apoptosis.

Cristina Raimondi et al., en "Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells

from breast cancer patients", *Breast Cancer Res Treat* (2011) 130:449-455, investigó la expresión de la transición epitelial-mesenquimatosa (TEM) y marcadores de severidad en las CTC de pacientes con cáncer de mama en todas las etapas de la enfermedad.

- 5 L. Rossi et al., en "Prognostic impact of discrepant Ki67 and mitotic index on hormone receptor-positive, HER2-negative breast carcinoma", *British Journal of Cancer* (2015) 113, 996-1002, describió el pronóstico de los tumores HER2 positivos para receptores hormonales (HR+) que tienen IM y Ki67 discrepantes.

10 La elucidación de fenotipos y características de CTC adicionales que definen grados de enfermedad y/o que están directamente relacionados con la supervivencia del paciente podría usarse en combinación con el conocimiento actual con respecto a los números de CTC en metodologías importantes, que incluyen estratificación y diagnóstico del cáncer. La presente invención está dirigida a estos y otros objetivos relevantes.

15 **Breve resumen de la invención**

Un objetivo de la presente invención es un procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- 20 (a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en el que preferentemente la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, en el que incluso más preferentemente, la muestra biológica es al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica, y  
 (b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifica una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, se predice que el sujeto tiene una menor probabilidad de supervivencia en comparación con un sujeto que tiene el mismo cáncer que no tiene una o más CTC identificadas por estar en una fase del ciclo celular mitótico, por lo que predice la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, preferentemente en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinar visualmente la fase del ciclo celular.

30 Otro objetivo de la presente invención es el procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el cáncer se selecciona de:

- un carcinoma, y en el que las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- 35 (a) diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros,  
 (b) presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en citoqueratina filamentosa (CK 8, CK18, CK19 y  
 (c) ausencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD14 y CD31, preferentemente en el que las CTC se caracterizan preferentemente por la presencia de uno o más marcadores  
 40 seleccionados del grupo que consiste en EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2,  
 o

45 - un melanoma y en el que las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a)' diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
 (b)' presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T;  
 o

50 - un sarcoma y en el que las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a)" diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
 (b)" presencia de vimentina.

Otro objetivo de la presente invención es uno de los procedimientos anteriores, en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinando visualmente la fase del ciclo celular.

60 El siguiente objetivo de la presente invención es un procedimiento para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el procedimiento comprende:

- (a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene un tumor sólido maligno, en el que preferentemente la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, en el que incluso más preferentemente la muestra biológica es al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica, y

(b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifica una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, el tumor del sujeto se clasifica como agresivo, calificando así un tumor sólido maligno en un sujeto, preferentemente en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinando visualmente la fase del ciclo celular.

5 Otro objetivo de la presente invención es el procedimiento anterior para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el tumor sólido maligno se selecciona entre los siguientes:

10 - un carcinoma y en el que las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a) diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros,
- (b) presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en citoqueratina filamentosa (CK 8, CK18, CK19 y
- 15 (c) ausencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD14 y CD31, preferentemente en el que las CTC se caracterizan preferentemente por la presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2;
- o

20 - un melanoma y las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a)' diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y
- (b)' presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T;
- 25 o

- un sarcoma y las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a)" diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y
- (b)" presencia de vimentina.

30 El siguiente objetivo de la presente invención es un procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- 35 (a) obtener una primera población de CTC de una primera muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en el que preferentemente la primera muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, más preferentemente la primera muestra biológica es al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica,
- (b) cribar la primera población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,
- 40 (c) obtener una segunda población de CTC a partir de una segunda muestra biológica del sujeto después del tratamiento del cáncer, en el que preferentemente la segunda muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, con la condición de que la segunda muestra biológica sea de la misma fuente que la primera muestra biológica, lo más preferentemente, tanto la primera como la segunda muestra biológica tienen al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica,
- 45 y
- (d) cribar la segunda población por células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que un aumento en el número de CTC mitóticas en la segunda población frente a la primera población, o un aumento en el índice mitótico calculado para la segunda población frente a la primera población, sugiere que el tratamiento es ineficaz, preferentemente en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinando visualmente la fase del ciclo celular.
- 50

Otro objetivo de la presente invención es el procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el cáncer se selecciona de lo siguiente:

55 - un carcinoma y en el que las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a) diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros,
- (b) presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en citoqueratina filamentosa (CK 8, CK18, CK19 y
- 60 (c) ausencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD14 y CD31, preferentemente en el que las CTC se caracterizan preferentemente por la presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2;
- o

65 - un melanoma y las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- (a)' diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)' presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T;

5 o

- un sarcoma y las CTC se caracterizan por una o más de las siguientes características:

- 10 (a)" diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)" presencia de vimentina.

15 Otro objetivo de la presente invención es uno de los procedimientos anteriores, en el que la población de CTC se obtiene de una muestra biológica usando metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de glóbulos rojos, agotamiento de glóbulos blancos, FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo y chip microfluídico, o una combinación de los mismos.

Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento anterior, en el que la metodología de exclusión por tamaño es la microfiltración.

20 Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento previo, en el que la microfiltración es a través de un microfiltro que tiene un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 a 10 micrómetros.

25 Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento anterior, en el que la filtración se realiza a través de un ensayo de microfiltración de baja presión CellSieve<sup>MR</sup>, en el que el microfiltro comprende una película seca fotodefinible.

Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento anterior, en el que la población de CTC se obtiene de una muestra biológica usando FICOLL.

30 Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento anterior, en el que la población de CTC se obtiene a partir de una muestra biológica usando un chip microfluídico con base en la clasificación basada en el tamaño físico, clasificación basada en el tamaño hidrodinámico, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes, o eliminación de células pequeñas en función del tamaño.

35 Los inventores han demostrado por primera vez que las células tumorales circulantes (CTC) aisladas de una muestra biológica, tal como la sangre periférica, pueden tener variabilidad de fase del ciclo celular. Es decir, cuando una población de CTC se aísla de una muestra biológica, existe una variabilidad en la fase del ciclo celular de las células, con algunas células en una fase del ciclo celular mitótico (fase M) (por ejemplo, profase, metafase, anafase, telofase, o citocinesis) y algunas células en una fase del ciclo celular no mitótico (por ejemplo, fase de reposo o interfase).

40 Los inventores también han encontrado que cuando las CTC se aíslan de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, existe una fuerte correlación entre el número de CTC mitóticas en la muestra y el índice mitótico (IM) de las CTC en la muestra y las perspectivas de supervivencia a largo plazo del sujeto. Como se explica en detalle a continuación, cuando se descubre que las CTC se someten a una división celular activa, la supervivencia a largo plazo del sujeto es menos probable. Por lo tanto, tanto el número absoluto de CTC mitóticas como el IM de las CTC aisladas de un paciente con cáncer pueden usarse para hacer ciertas predicciones sobre la supervivencia y ciertas decisiones con respecto al tratamiento, y para monitorear la efectividad de un tratamiento dado.

50 La presente invención también se dirige, en un grupo adicional de realizaciones, a procedimientos para predecir la probabilidad de supervivencia en sujetos que tienen cáncer.

Por lo tanto, la invención se dirige a un procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- 55 (a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, y  
(b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, se predice que el sujeto tiene una menor probabilidad de supervivencia en comparación con un sujeto que tiene el mismo cáncer que no tiene una o más CTC identificadas por estar en una fase del ciclo celular mitótico, lo que predice la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.

60

La invención también se dirige a un procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- 65 (a) aislar células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer,

(b) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una población de CTC, y  
(c) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, se predice que el sujeto tiene una menor probabilidad de supervivencia en comparación con un sujeto que tiene el mismo cáncer que no tiene una o más CTC identificadas por estar en una fase del ciclo celular mitótico, lo que predice la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.

En ciertos aspectos de estas realizaciones, la probabilidad de supervivencia es de dos años.

La presente invención también se dirige, en un grupo adicional de realizaciones, a procedimientos para clasificar tumores sólidos malignos de un sujeto.

Por lo tanto, la invención también se dirige a un procedimiento para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el procedimiento comprende:

(a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene un tumor sólido maligno, y  
(b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, el tumor del sujeto se clasifica como agresivo, calificando así un tumor sólido maligno en un sujeto.

La invención también se dirige a un procedimiento para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el procedimiento comprende:

(a) aislar células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una muestra biológica de un sujeto que tiene un tumor sólido maligno,  
(b) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una población de CTC, y  
(c) cribar la población de CTC para detectar células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, el tumor del sujeto se clasifica como agresivo, calificando así un tumor sólido maligno en un sujeto.

La presente invención también se dirige a procedimientos para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer.

Por lo tanto, la invención se dirige a un procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

(a) obtener una primera población de CTC de una primera muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer,  
(b) cribar la primera población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,  
(d) obtener una segunda población de CTC de una segunda muestra biológica del sujeto después del tratamiento,  
y  
(e) cribar la segunda población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,

en el que un aumento en el número de CTC mitóticas en la segunda población frente a la primera población, o un aumento en el índice mitótico calculado para la segunda población frente a la primera población, sugiere que el tratamiento es ineficaz.

En una novena realización, la invención se dirige a un procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

(a) aislar células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una primera muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer,  
(b) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una primera población de CTC,  
(c) cribar la primera población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,  
(e) aislar células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una segunda muestra biológica del sujeto después del tratamiento,  
(f) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una segunda población de CTC, y  
(g) cribar la segunda población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,

en el que un aumento en el número de CTC mitóticas en la segunda población frente a la primera población, o un aumento en el índice mitótico calculado para la segunda población frente a la primera población, sugiere que el tratamiento es ineficaz.

En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, la fase del ciclo celular se determina examinando la morfología de los núcleos de CTC a través de medios que incluyen, pero no se limitan a, tinciones nucleares (por ejemplo, colorantes DAPI, colorantes Hoechst, colorantes Sytox y colorantes de yoduro de propidio) y colorantes colorimétricos (por ejemplo, H&E, hematoxilina, colorante kernechtrot, verde de metilo y azul de metileno).

- 5 Se puede determinar que la fase del ciclo celular es una fase del ciclo celular mitótico (por ejemplo, la célula está en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase o citocinesis) o una fase del ciclo celular no mitótico (por ejemplo, la célula está en una fase de descanso o interfase). De manera similar, una fase del ciclo celular mitótico puede ser profase, prometafase, metafase, anafase, telofase o citocinesis. Las CTC que se determina que están en una fase mitótica (por ejemplo, profase, metafase, anafase, telofase o citocinesis) se denominan "CTC mitóticas" en el presente documento. Las CTC que se determina que están en una fase no mitótica (por ejemplo, fase de reposo o interfase) se denominan en este documento "CTC no mitóticas".
- 10 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, el índice mitótico (IM) es una relación de las CTC mitóticos a no mitóticos en una muestra. El IM se calcula dividiendo el número de CTC que se determinó que están en una fase mitótica por el número de CTC que se determinó que están en una fase no mitótica. Alternativamente, el índice mitótico se calcula dividiendo el número de CTC que se determinó que están en una fase mitótica por el número total de CTC en la población de CTC que se analiza.
- 15 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, las CTC se caracterizan o identifican como CTC en función de una o más características que incluyen, pero no se limitan a, tamaño celular, morfología celular, morfología nuclear y expresión o falta de expresión de marcadores seleccionados. Debe entenderse que las CTC tienen diferentes características dependiendo de la identidad del tumor sólido maligno del que se derivan.
- 20 Un tamaño característico para todas las CTC es un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros.
- 25 Las características morfológicas para todos las CTC incluyen, pero no se limitan a, la falta de segmentación nuclear en gránulos.
- 30 Los marcadores para CTC de tumor epitelial (es decir, carcinoma) incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: citoqueratina (CK)8, CK18, CK19, EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2, y la ausencia de uno o más de CD45, CD14 y CD31. Los tumores epiteliales incluyen, pero no se limitan a, tumores de mama, próstata, pulmón, colorrectal y pancreático.
- 35 Los marcadores para CTC de melanoma incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T.
- Los marcadores para las CTC de sarcoma incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: vimentina.
- 40 Los marcadores de CTC de carcinoma de células renales incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: vimentina, CD10, CK8, CK18, CK19, c-Kit y E-cadherina.
- La presencia o ausencia de marcadores de CTC puede determinarse usando medios que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos marcados, manchas celulares, manchas cromogénicas, manchas *in situ* y radiomarcado. En aspectos preferidos, los marcadores de CTC se determinan usando anticuerpos marcados con una etiqueta fluorescente, una etiqueta cromogénica, una etiqueta radioactiva o una etiqueta quimioluminiscente.
- 45 En un aspecto específico de las realizaciones relevantes, las CTC son CTC de tumores epiteliales y se caracterizan por la expresión de EpCAM y las citoqueratinas 8, 18 y 19, y la falta de expresión de CD45.
- 50 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, las células pueden obtenerse y/o aislarse de una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica puede ser, pero no se limita a, sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. La muestra biológica puede ser una muestra fresca o una muestra criopreservada que se descongela. En un aspecto preferido, la muestra biológica es sangre periférica. En otros aspectos, la sangre es sangre de vena antecubital, sangre de vena cava inferior o sangre de vena yugular.
- 55 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, la muestra biológica tiene un volumen de entre aproximadamente 1 y 50 ml, preferentemente entre aproximadamente 5 y 15 ml. En ciertos aspectos, la muestra biológica tiene un volumen de al menos aproximadamente 7,5 ml.
- 60 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, las células pueden obtenerse y/o aislarse de una muestra biológica de un sujeto usando uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de glóbulos rojos, agotamiento de glóbulos blancos, FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo y chip microfluídico, o una combinación de los mismos. En un aspecto particular, la metodología de exclusión por tamaño comprende el uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poros. En ciertos aspectos, el tamaño de poro varía de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. Los poros pueden tener una forma de poro redonda, ovalada, oval, cuadrada o rectangular. El microfiltro puede tener geometría de poro de precisión y distribución de poro uniforme. En un aspecto particular, las células se aíslan usando un ensayo de microfiltración de baja presión CellSieve<sup>MR</sup>, en el que el filtro comprende una película seca fotodefinible. En otros aspectos, las células se aíslan usando un chip microfluídico
- 65

con base en la clasificación basada en el tamaño físico, clasificación basada en el tamaño hidrodinámico, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas en función del tamaño.

5 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, las células pueden caracterizarse en el dispositivo usado para recoger las células de una muestra biológica. Por ejemplo, cuando se identifican CTC en una población de células obtenidas de una muestra biológica, la expresión fenotípica de los marcadores celulares, tales como EpCAM, citoqueratinas 8, 18, 19, DAPI y CD45 con respecto a las CTC de tumores epiteliales, se puede determinar sin eliminar las células de los dispositivos. En un ejemplo particular y cuando se utilizan microfiltros para recoger las células, las células pueden caracterizarse a medida que se depositan en la superficie del microfiltro. En otros aspectos y realizaciones, las células se retiran del dispositivo y luego se caracterizan. Además, las células pueden estar fijadas o no fijadas cuando se caracterizan.

15 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, el sujeto es un ser humano, un primate no humano, un pájaro, un caballo, una vaca, una cabra, una oveja, un animal de compañía, tal como un perro, un gato o un roedor, u otro mamífero.

20 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, el cáncer es uno o más de un linfoma y un tumor sólido maligno, tal carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, hepatoblastoma, retinoblastoma o melanoma. Los carcinomas son de origen epitelial e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal. El tumor sólido puede estar en Etapa I, Etapa II, Etapa III y/o Etapa IV.

25 En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, el tumor sólido maligno puede ser carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, hepatoblastoma, retinoblastoma o melanoma. En particular, el tumor sólido puede ser un tumor de mama, un tumor de próstata, un tumor de pulmón, un tumor pancreático o un tumor colorrectal.

30 Lo anterior ha delineado de manera bastante amplia las características y ventajas técnicas de la presente invención para que la descripción detallada de la invención que sigue se pueda entender mejor. Se describirán aquí características y ventajas adicionales de la invención, que constituyen el objeto de las reivindicaciones de la invención. Las características novedosas que se consideran características de la invención, tanto en cuanto a su organización como a su procedimiento de operación, junto con otros objetivos y ventajas se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción cuando se consideren en relación con las figuras adjuntas.

### Breve descripción de los dibujos

35 **Figuras 1A-1J.** Citologías comunes reconocibles de CTC en mitosis (fase M) aisladas de pacientes con cáncer de mama. Las células se tiñen para núcleo, citoqueratina 8, 18 y 19, EpCAM y CD45. Los marcadores se muestran individualmente y también se muestran imágenes con los marcadores combinados. Imágenes representativas de (Figura 1A) la CTC "clásica" positiva de EpCAM en interfase, es decir, no en mitosis; (Figura 1B) CTC en Profase temprana con condensación de cromatina observada como puntos pequeños en el núcleo; (Figura 1C) CTC en Profase con cromatina condensada y mitocondrias altamente activas observadas fuera del núcleo como puntos DAPI; (Figura 1D) CTC en Prometáfase en la que se puede observar la cromatina condensándose en el centro de la CTC; (Figura 1E) CTC en Metafase con cromatina condensada alineándose a lo largo del eje de la célula; (Figura 1F) CTC en la transición Metafase/Anafase, se puede observar que las dos cromatinas comienzan a separarse a lo largo de la placa celular; (Figura 1G) CTC en Anafase con los dos conjuntos de cromosomas observados moviéndose a los extremos polares de la célula; (Figura 1H) CTC en Telofase se observa con dos envolturas celulares distintas y un anillo contráctil en el centro de la célula; (Figura 1I) CTC en Telofase Tardía/Citocinesis como un anillo contráctil que está pellizcando la célula en dos células pero la cromatina permanece condensada; (Figura 1J) final de la Citocinesis a medida que se reforman las envolturas nucleares, el anillo contráctil casi completo y la cromatina se ha expandido. Primera columna: fusión de imágenes de la segunda a la quinta columna; segunda columna: tinción nuclear con DAPI; tercera columna: tinción de citoqueratina para CK8, 18 y 19; cuarta columna: tinción para EpCAM; quinta columna: tinción para CD45. Barra de escala = 15  $\mu$ m

50 **Figuras 2A-2B.** Estimaciones de Kaplan-Meier de las probabilidades de supervivencia general en las poblaciones de pacientes con cáncer de mama, recuento total de CTC frente recuento mitótico de CTC (n = 36). La Figura 2A proporciona estimaciones de Kaplan-Meier de las probabilidades de supervivencia general de pacientes con cáncer de mama con <5 CTC por muestra (línea superior) frente a pacientes con  $\geq 5$  CTC por muestra (línea continua inferior). La Figura 2B proporciona estimados de Kaplan-Meier de las probabilidades de supervivencia general de pacientes con cáncer de mama con 0 CTC mitóticas por muestra (línea superior) frente a pacientes con  $\geq 1$  CTC mitótica por muestra (línea continua inferior). Las muestras fueron de 7,5 ml de sangre periférica.

60 **Figuras 3A-3B.** Estimaciones de Kaplan-Meier de las probabilidades de supervivencia global de las subpoblaciones de pacientes con base en el estado del receptor de la Figura 2A (n = 33). Tres de los 36 pacientes no tenían un estado de receptor conocido. \* Todas las razones de riesgo se calcularon con base en la cohorte de pacientes Luminal A. Figura 3A: las células "positivas para el receptor" son aquellas células que expresan cada uno de ER, PR y HER2; las células "triple negativas" son aquellas que carecen de expresión de ER, PR y HER2. Figura 3B - "luminal A" y "luminal B" son subtipos de cáncer de mama establecidos; las células "triple negativas" son aquellas que carecen de expresión de ER, PR y HER2; las células "Her2+" son aquellas que expresan HER2.

**Figura 4.** Gráfico de cajones del número total de CTC en cada paciente frente a las CTC mitóticas para cada paciente de 7,5 ml de sangre periférica. Cuadrados = pacientes que expiraron en 2 años; diamantes = pacientes vivos en el lapso de 2 años.

## 5 Descripción detallada de la invención

### I. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan de acuerdo con el uso convencional. Se pueden encontrar definiciones de términos comunes en biología molecular, por ejemplo, en Benjamin Lewin, Genes VII, publicado por Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X); Kendrew et al., (eds.); The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); y otras referencias técnicas similares.

Como se usa en este documento, "un" o "uno, una" pueden significar uno o más. Como se usa en el presente documento cuando se usa junto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno, una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluyen los plurales y los términos plurales incluyen el singular.

Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a un valor numérico, que incluye, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, indicados explícitamente o no. El término "aproximadamente" generalmente se refiere a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo, +/- 5-10 % del valor mencionado) que un experto en la materia consideraría equivalente al valor mencionado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). En algunos casos, el término "aproximadamente" puede incluir valores numéricos que se redondean a la cifra significativa más cercana.

### II La presente invención

La clasificación del cáncer se realiza mediante el examen histopatológico de una biopsia de tejido extraída de muestras de tejido sospechosas, principalmente para su uso en el diagnóstico de cáncer [1, 5-9]. En segundo lugar el examen histopatológico permite la estratificación de los pacientes según la morfología de las células del tejido (es decir, el grado celular) para ayudar a la evaluación y el tratamiento del paciente [1, 5-8]. Aunque muchos tipos de cáncer se clasifican utilizando diferentes sistemas de clasificación (por ejemplo, Gleason, Bloom y Richardson Nottingham) y existen problemas con la subjetividad y la heterogeneidad tumoral, ciertos aspectos son universales en la evaluación patológica de malignidad, tales como el índice mitótico (IM) y la diferenciación celular [1, 5-9]. La mitosis en la clasificación de células tumorales, identificada por eventos celulares específicos que ocurren durante la división celular (por ejemplo, profase, metafase, anafase, telofase), se considera un predictor primario de supervivencia y un indicador de la respuesta a la terapia [5-10].

Se encuentran CTC en hasta el 65-85 % de los pacientes con enfermedad metastásica, y se usan para pronósticos enumerando el número de células en una muestra (es decir, un alto número de CTC equivale a tiempos de supervivencia más cortos), sin ningún subtipo adicional. Recientemente, los inventores descubrieron que el aislamiento con base en un filtro de CTC produjo células que retienen su arquitectura celular detallada y los detalles de la arquitectura celular pueden visualizarse, lo que permite su clasificación como CTC por morfología. Como la clasificación del cáncer es una forma de clasificación de la morfología, los inventores consideraron que la clasificación de las CTC puede proporcionar una estratificación pronóstica adicional en pacientes con cáncer y ayudar a identificar fenotipos agresivos de CTC. Los histopatólogos utilizan actualmente la clasificación de las células tumorales después de la filtración para identificar y clasificar las células cancerosas de una serie de fluidos corporales, incluyendo orina (cáncer de vejiga), aspirados pulmonares (cáncer de pulmón) y líquido cefalorraquídeo (cáncer de cerebro/neuronal) a través de procedimientos tradicionales. Los inventores descubrieron que lo mismo podría aplicarse a las CTC.

Como se discute en los ejemplos a continuación, se realizaron experimentos para determinar si una evaluación citológica visual de las células en mitosis es aplicable a las CTC. El estado mitótico de las CTC también se evaluó para evaluar el valor pronóstico de las CTC enumeradas y sus índices mitóticos. Los datos resultantes indican que la aplicación de determinaciones con base en la histología con respecto al número de CTC mitóticas en una muestra y/o índices mitóticos de poblaciones de CTC puede mejorar la estratificación del paciente y puede proporcionar una mejora en las decisiones de tratamiento.

Por lo tanto, la presente invención se dirige a (i) procedimientos para predecir la probabilidad de supervivencia en sujetos que tienen cáncer, (ii) procedimientos para clasificar tumores sólidos malignos de un sujeto y (iii) procedimientos para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer.

### Procedimientos para predecir la probabilidad de supervivencia

65

5 En otro grupo de realizaciones, la invención se dirige a procedimientos para predecir la probabilidad de supervivencia en sujetos que tienen cáncer. Dichos procedimientos se pueden usar solos para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, o en combinación con otros medios que brindan información pronóstica relevante. Dichos procedimientos se pueden usar simplemente para proporcionar a un sujeto que tiene cáncer información adicional relevante para su condición, o se pueden usar para ayudar a un médico a tomar decisiones con respecto a los cursos de tratamiento apropiados.

10 En una realización, la invención se dirige a un procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- (a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, y
- (b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, se predice que el sujeto tiene una menor probabilidad de supervivencia en comparación con un sujeto que tiene el mismo cáncer que no tiene una o más CTC identificadas por estar en una fase del ciclo celular mitótico, lo que predice la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.

20 En otra realización, la invención se dirige a un procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- (a) aislar células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer,
- (b) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una población de CTC, y
- (c) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, se predice que el sujeto tiene una menor probabilidad de supervivencia en comparación con un sujeto que tiene el mismo cáncer que no tiene una o más CTC identificados por estar en una fase del ciclo celular mitótico, lo que predice la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer.

30 La probabilidad de supervivencia puede determinarse durante períodos de tiempo seleccionados que incluyen, pero no se limitan a, un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 meses. En aspectos particulares, el período de tiempo seleccionado es un período de un año, un período de dos años o un período de tres años.

35 Procedimientos para clasificar tumores sólidos malignos

40 En un grupo de realizaciones, la invención se dirige a procedimientos para clasificar tumores sólidos malignos de un sujeto. Tales procedimientos se pueden usar, por ejemplo, para ayudar a un médico a tomar decisiones con respecto a los cursos de tratamiento apropiados, según el grado (por ejemplo, agresividad) de un tumor.

45 En una realización, la invención se dirige a un procedimiento para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el procedimiento comprende:

- (a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene un tumor sólido maligno, y
- (b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, el tumor del sujeto se clasifica como agresivo, calificando así un tumor sólido maligno en un sujeto.

50 En otra realización, la invención se dirige a un procedimiento para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el procedimiento comprende:

- (a) aislar células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una muestra biológica de un sujeto que tiene un tumor sólido maligno,
- (b) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una población de CTC, y
- (c) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifican una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, el tumor del sujeto se clasifica como agresivo, calificando así un tumor sólido maligno en un sujeto.

60 Además de clasificar los tumores como agresivos cuando se encuentra una o más CTC mitóticas, los tumores pueden clasificarse alternativamente como un tumor de Grado III o Grado IV.

Procedimientos para controlar la efectividad del tratamiento del cáncer

65 En un grupo de realizaciones, la invención se dirige a procedimientos para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer. Tal control puede usarse, por ejemplo, para ayudar a un médico a tomar decisiones con respecto a si se debe continuar un curso de tratamiento actual o si ha sido suficiente, y si se debe seguir un curso de tratamiento diferente. Estos procedimientos pueden utilizar cambios en el número total de CTC mitóticas presentes en

muestras obtenidas de un sujeto antes y después del tratamiento, o cambios en los índices mitóticos calculados para poblaciones de CTC presentes en muestras obtenidas de un sujeto antes y después del tratamiento, o ambos.

5 En una realización, la invención se dirige a un procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- (a) obtener una primera población de CTC de una primera muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer,
- (b) cribar la primera población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,
- (d) obtener una segunda población de CTC de una segunda muestra biológica del sujeto después del tratamiento,
- 10 y
- (e) cribar la segunda población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,

15 en el que un aumento en el número de CTC mitóticas en la segunda población frente a la primera población, o un aumento en el índice mitótico calculado para la segunda población frente a la primera población, sugiere o bien indica que el tratamiento no es efectivo. En otra realización, la invención se dirige a un procedimiento para controlar la efectividad del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

- (a) aislar las células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una primera muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer,
- (b) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una primera población de CTC,
- (c) cribar la primera población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,
- (e) aislar las células que tienen un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros de una segunda muestra biológica del sujeto después del tratamiento,
- (f) identificar cada CTC en las células de (a) para formar una segunda población de CTC, y
- 25 (g) cribar la segunda población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,

30 en el que un aumento en el número de CTC mitóticas en la segunda población frente a la primera población, o un aumento en el índice mitótico calculado para la segunda población frente a la primera población, sugiere o bien indica que el tratamiento no es efectivo.

35 Se debe entender que la primera y la segunda muestra biológica del sujeto deben ser lo más similares posible en características (por ejemplo, cantidad, fuente, condiciones de almacenamiento, condiciones de tratamiento, medios para el análisis), pero que variaciones menores aún producirán resultados significativos en términos del número de CTC mitóticas en la muestra y los cálculos de IM.

Las realizaciones y aspectos de la invención descritos en este documento pueden entenderse mejor mediante los siguientes detalles.

40 Como se usa en este documento, la fase del ciclo celular es la fase de desarrollo celular en la que se encuentra una célula particular. El ciclo celular generalmente comprende una fase de reposo/inactividad/senescencia, interfase y una fase de división celular. En conjunto, la fase de reposo y la interfase se denominan "fase no mitótica" o "fase del ciclo celular no mitótico" en el presente documento. La fase de división celular incluye las diversas etapas de mitosis (por ejemplo, profase, prometafase, metafase, anafase y telofase) y citocinesis, denominadas en conjunto "fase mitótica" o "fase del ciclo celular mitótico" en el presente documento.

45 La fase del ciclo celular puede determinarse para una célula seleccionada examinando la morfología de los núcleos celulares para determinar si la célula está en una fase mitótica o no mitótica. Existen muchos medios bien establecidos para examinar los núcleos celulares que incluyen, pero no se limitan a, las manchas nucleares (por ejemplo, colorantes DAPI, colorantes Hoechst, colorantes Sytox y colorantes de yoduro de propidio) y colorantes colorimétricos (por ejemplo, H&E, hematoxilina, colorante kernechtrot, verde de metilo y azul de metileno) seguido de un examen microscópico de las células, ya sea por el ojo humano o por medios electrónicos.

50 Se puede determinar que la fase del ciclo celular es una fase del ciclo celular mitótico (por ejemplo, la célula está en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase o citocinesis) o una fase del ciclo celular no mitótico (por ejemplo, la célula está en una fase de descanso o interfase). De manera similar, una fase del ciclo celular mitótico puede ser profase, prometafase, metafase, anafase, telofase o citocinesis. Las CTC que se determina que están en una fase mitótica (por ejemplo, profase, prometafase, metafase, anafase, telofase o citocinesis) se denominan "CTC mitóticas" en el presente documento. Las CTC que se determina que están en una fase no mitótica (por ejemplo, fase de reposo o interfase) se denominan en este documento "CTC no mitóticas".

60 El índice mitótico (IM) es una relación de las CTC mitóticas a no mitóticas en una muestra. El IM puede calcularse dividiendo el número de CTC que se determina que están en una fase mitótica por el número de CTC que se determina que están en una fase no mitótica. Alternativamente, el índice mitótico se puede calcular dividiendo el número de CTC que se determina que están en una fase mitótica por el número total de CTC en la población de CTC que se analiza.

65

En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, las CTC se caracterizan o identifican como CTC en función de una o más características que incluyen, pero no se limitan a, tamaño celular, morfología celular, morfología nuclear y expresión o falta de expresión de marcadores seleccionados. La identificación de una célula particular como una CTC puede ser un desafío en algunos casos porque las CTC tienen diferentes características dependiendo de la identidad del tumor sólido maligno del que se derivan. Es decir, se usan diferentes combinaciones de marcadores celulares para identificar las CTC en una muestra biológica dependiendo de la identidad del cáncer en el sujeto. Sin embargo, un tamaño característico para todos las CTC independientemente del tipo de cáncer es un diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros. Por lo tanto, las CTC definidas en el presente documento incluyen células que tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 7-24 micrómetros, 7-23 micrómetros, 7-22 micrómetros, 7-21 micrómetros, 7-20 micrómetros, 7-19 micrómetros, 7-18 micrómetros, 7-17 micrómetros, 7-16 micrómetros, 7-15 micrómetros, 7-14 micrómetros, 7-13 micrómetros, 7-12 micrómetros, 7-11 micrómetros, 8-24 micrómetros, 9-24 micrómetros, 10-24 micrómetros, 11-24 micrómetros, 12-24 micrómetros, 13-24 micrómetros, 14-24 micrómetros, 15-24 micrómetros, 16-24 micrómetros, 17-24 micrómetros, 18-24 micrómetros, 19-24 micrómetros, 20-24 micrómetros, 21-24 micrómetros, 22-24 micrómetros y 23-24 micrómetros. Las características morfológicas para todos las CTC también incluyen la falta de segmentación nuclear en gránulos.

Los marcadores para CTC de tumor epitelial (es decir, carcinoma) incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: citoqueratina (CK)8, CK18, CK19, EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2, y la ausencia de uno o más de CD45, CD14 y CD31. Los tumores epiteliales incluyen, pero no se limitan, tumores de mama, próstata, pulmón, colorrectal y pancreático.

Los marcadores para CTC de melanoma incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T.

Los marcadores para las CTC de sarcoma incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: vimentina.

Los marcadores de CTC de carcinoma de células renales incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más de: vimentina, CD10, CK8, CK18, CK19, c-Kit y E-cadherina.

La presencia o ausencia de marcadores de CTC puede determinarse usando medios de marcaje que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos marcados, manchas celulares, manchas cromogénicas, manchas *in situ* y radiomarcado. En aspectos preferidos, los marcadores de CTC se determinan usando anticuerpos marcados con una etiqueta fluorescente, una etiqueta cromogénica, una etiqueta radioactiva o una etiqueta quimioluminiscente. Después de exponer una célula o población de células a medios de marcado seleccionados, la presencia o ausencia de los marcadores se puede determinar mediante un examen microscópico de las células, ya sea por el ojo humano o por medios electrónicos.

En un aspecto específico de realizaciones relevantes, las CTC son CTC de tumor epitelial y se caracterizan por la expresión de EpCAM y las citoqueratinas 8, 18 y 19, y la falta de expresión de CD45.

Las células a analizar pueden obtenerse y/o aislarse de una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica puede ser, pero no se limita a, sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. Cuando la muestra biológica es un tejido u otro material sólido o semisólido, puede procesarse de manera que libere las células mencionadas en el presente documento. La muestra biológica puede ser una muestra fresca o una muestra criopreservada que se descongela. En un aspecto preferido, la muestra biológica es sangre periférica. En otros aspectos, la sangre es sangre de vena antecubital, sangre de vena cava inferior o vena yugular. Las células pueden someterse a tratamientos normales y habituales, es decir, fijación, como parte del procedimiento de análisis.

En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, la muestra biológica tiene un volumen de entre aproximadamente 0,1 y 100 ml. El experto en la materia entenderá que el volumen de la muestra biológica no es crítico para los procedimientos descritos en este documento. Se usó un volumen conveniente de 7,5 ml en los experimentos descritos en el presente documento y, por lo tanto, se ha demostrado que 7,5 ml proporciona datos relevantes. Sin embargo, cuando se encuentra un número bajo de CTC (por ejemplo, menos de aproximadamente 5) en un volumen dado de una muestra biológica, el volumen de la muestra se puede aumentar sin apartarse del espíritu y el alcance de los procedimientos descritos en el presente documento. Otros volúmenes útiles incluyen entre aproximadamente 1 y 100 ml, 1 y 90 ml, 1 y 80 ml, 1 y 70 ml, 1 y 60 ml, 1 y 50 ml, 1 y 40 ml, 1 y 30 ml, 1 y 22,5 ml, 1 y 20 ml, 1 y 15 ml, 1 y 10 ml, 1 y 9,5 ml, 1 y 9 ml, 1 y 8,5 ml, 1 y 8 ml, 1 y 7,5 ml, 1 y 7 ml, 1 y 6,5 ml, 1 y 6 ml, 1 y 5,5 ml, 1 y 5 ml, 1 y 4,5 ml, 1 y 4 ml, 1 y 3,5 ml, 1 y 3 ml, 1 y 2,5 ml, y entre 1 y 2 ml. En un aspecto preferido, el volumen está entre 5 y 15 ml. En ciertos aspectos, la muestra biológica tiene un volumen de al menos aproximadamente 22,5 ml, 15 ml, 10 ml, 9,5 ml, 9 ml, 8,5 ml, 8 ml, 7,5 ml, 7 ml, 6,5 ml, 6 ml, 5,5 ml, 5 ml, 4,5 ml, 4 ml, 3,5 ml, 3 ml, 2,5 ml, 2 ml, 1,5 ml, 1 ml o 0,5 ml.

Las células pueden obtenerse y/o aislarse de una muestra biológica de un sujeto utilizando medios bien conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de glóbulos rojos, agotamiento de glóbulos blancos, FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo y chip microfluídico, o una combinación de los mismos. En un aspecto particular, la metodología de exclusión por tamaño comprende el

uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. En ciertos aspectos, el tamaño de poro varía de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. Los poros pueden tener una forma de poro redonda, ovalada, oval, cuadrada o rectangular. El microfiltro puede tener una geometría de poro de precisión y distribución de poro uniforme. En un aspecto particular, las células se aíslan usando un ensayo de microfiltración de baja presión CellSieve<sup>MR</sup>, en el que el filtro comprende una película seca fotodefinible. En otros aspectos, las células se aíslan usando un chip microfluídico con base en la clasificación basada en el tamaño físico, clasificación basada en el tamaño hidrodinámico, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas en función del tamaño.

Las células se pueden caracterizar en el dispositivo utilizado para recoger las células de una muestra biológica. Por ejemplo, cuando se identifican CTC en una población de células obtenidas de una muestra biológica, la expresión fenotípica de los marcadores celulares, tales como EpCAM, citoqueratinas 8, 18, 19, DAPI y CD45 con respecto a las CTC de tumores epiteliales, se puede determinar sin eliminar las células de los dispositivos. En un ejemplo particular y cuando se utilizan microfiltros para recoger las células, las células pueden caracterizarse a medida que se depositan en la superficie del microfiltro. En otros aspectos y realizaciones, las células se retiran del dispositivo y luego se caracterizan. Además, las células pueden estar fijadas o no fijadas cuando se caracterizan.

Como se usa en este documento, el sujeto es un humano.

En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, el cáncer es uno o más de un linfoma y un tumor sólido maligno, tal como carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, hepatoblastoma, retinoblastoma o melanoma. Los carcinomas son de origen epitelial e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal. El tumor sólido maligno puede estar en Etapa I, Etapa II, Etapa III y/o Etapa IV.

En los aspectos y realizaciones relevantes de la invención, el tumor sólido maligno puede ser carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, hepatoblastoma, retinoblastoma o melanoma. En particular, el tumor sólido puede ser un tumor de mama, un tumor de próstata, un tumor de pulmón, un tumor pancreático o un tumor colorrectal.

### III. Ejemplos

**Recolección de muestras de sangre.** Se tomaron 36 muestras de sangre periférica completa prospectivamente de mujeres que estaban en tratamiento activo para cáncer de mama en etapa III o IV previamente confirmado, ya sea en el Fox Chase Cancer Center (FCCC) o en la Universidad de Maryland, Baltimore (UMB) entre 2011 y 2013. El estudio de las características del grupo se pueden encontrar en la Tabla 1. Se suministraron muestras anónimas de sangre periférica a través de un acuerdo de colaboración con el FCCC y la UMB, con el consentimiento informado por escrito y de acuerdo con la aprobación local del IRB en cada institución. Además, las mujeres sanas voluntarias donaron muestras de sangre (n = 16) con el consentimiento informado por escrito y la aprobación del IRB por la Western Institutional Review Board, con una edad promedio de 52 años. Todas las muestras de sangre anónimas se extrajeron en tubos conservadores CellSave<sup>MR</sup> (~9 ml, Janssen Diagnostics). Se usaron 7,5 ml de sangre para enumerar las CTC utilizando microfiltración CellSieve<sup>MR</sup> (Creatv MicroTech Inc.) en la UMB, FCCC o Creatv Microtech. Los resultados y la identificación del paciente de las instituciones no se compartieron ni comunicaron hasta la finalización del estudio.

Tabla 1

		Número de pacientes
Etapa	1	-
	2	-
	3	9
	4	27
ER/PR*	Positivo	16
	Negativo	17
HER2*	Positivo	9
	Negativo	24
ER/PR/HER2*	Positivo	23
	Negativo	10

(continuación)

		Número de pacientes
Tratamiento	Línea base	5
	1a línea	9
	2a línea, o posterior†	22
Grado Patológico	1	1

	2	6
	3	19
	‡ desconocido	10
Histología	Ductal	17
	Lobular	3
	‡ otro	16

\* 3 de 36 pacientes tenían un tipo de receptor desconocido; ER = receptor de estrógenos; PR = receptor de progesterona; HER2 = receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2.  
† 8 pacientes no estaban actualmente en tratamiento, pero comenzaron el tratamiento de segunda línea.  
‡ Tejido no disponible para evaluación histológica, y/o pacientes con cáncer de mama metastásico no especificado, y/o pacientes con cánceres que no sean IDC o ILC.

**Procedimiento de microfiltración de bajo flujo CellSieve<sup>MR</sup>.** Las muestras se procesaron en FCCC, UMB o Creatv MicroTech con un ensayo de microfiltración CellSieve<sup>MR</sup> (Creatv MicroTech Inc.) utilizando un sistema de vacío de baja presión [18]. El ensayo de microfiltración CellSieve<sup>MR</sup> aísla las CTC en función de la exclusión por tamaño (> 7 micrómetros) y luego un citólogo capacitado identifica las CTC en función de las características morfológicas y la expresión fenotípica/falta de expresión de EpCAM, citoqueratinas 8, 18, 19, CD45 y DAPI (Figura 1) En resumen, se colocó un vacío de baja presión con microfiltros CellSieve<sup>MR</sup>, fabricado por procedimiento litográfico usando película seca fotosensible, en un conjunto de soporte de filtro en un aparato desechable. La sangre periférica completa (7,5 ml) recolectada en tubos conservadores CellSave<sup>MR</sup> se fijó previamente, extraída a través del filtro (~ 3 min), lavada con PBS, se fijó posteriormente y se permeabilizó. El filtro se tiñó con un cóctel de anticuerpos de anticuerpos anti-citoqueratina 8, 18, 19 marcado con FITC; anti-EpCAM marcado con ficoeritrina (PE); y anti-CD45 marcado con Cy5 [3, 17, 18]. Los filtros se lavaron y se montaron en portaobjetos con Fluoromount-G/DAPI (Southern Biotech). Las CTC patológicamente definibles (PDCTC) se identificaron morfológicamente utilizando características citológicas preestablecidas como se describió anteriormente [3]. Se usó un microscopio fluorescente Olympus BX54WI con AxioCam Carl Zeiss y Zen2011 Blue (Carl Zeiss) para obtener imágenes de las células. Fluoromount-G/DAPI es una solución de montaje que contiene DAPI que se agrega como última etapa antes de agregar un cubreobjetos para "montar" la muestra. La señal DAPI se agrega y se vuelve fluorescente en contacto con ácidos nucleicos.

**Enumeración de CTC.** Sólo las células intactas que tienen características definibles patológicas (PDCTC), como se describió anteriormente [3], se contaron como CTC en este estudio. Esto incluye las CTC que son negativas para CD45, tienen una fuerte señal de citoqueratina filamentosa y tienen núcleos positivos para DAPI con criterios patológicos malignos. Las PDCTC fueron identificadas y se obtuvieron imágenes por un citólogo capacitado y confirmados por un patólogo [3]. Las CTC apoptóticas, las CTC que experimentan una transición epitelial a mesenquimatosas (es decir, ausencia de citoqueratina) y las CTC que no pudieron identificarse citológicamente como malignos no se incluyeron en el estudio [3, 24].

**Clasificación de la proliferación mitótica.** La mitosis fue identificada por un citólogo capacitado y confirmada por un patólogo en las CTC. Se tomaron imágenes de los núcleos usando un microscopio fluorescente Olympus BX54WI con AxioCam Carl Zeiss y Zen2011 Blue (Carl Zeiss). Las etapas de la mitosis activa, que incluyen profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis, están bien descritas utilizando estructuras nucleares y de citoqueratina [5-8]. Las CTC solo se contaban como mitóticas si el citólogo podía identificar que la célula estaba en una etapa de Fase M (mitótica), es decir, una o más de profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. De lo contrario, la CTC se contó como no mitótica (Figura 1).

**Procedimientos estadísticos.** Las estimaciones de Kaplan-Meier y los análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox se realizaron con el software Matlab R2013A (Matrix LABORatory; Mathworks, Natick, MA) utilizando los recuentos de CTC enumerados de todos los subtipos y las poblaciones de pacientes conocidas. Para el análisis de supervivencia, el tiempo hasta la muerte se definió como el intervalo entre el momento en que se obtuvo una muestra de sangre hasta la muerte, o se controló en la última visita de seguimiento. El estado de ER (receptor de estrógenos), PR (receptor de progesterona) y HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) se determinaron de acuerdo con las directrices locales. HER2 se consideró positivo a un valor igual o mayor que 2+ (Figura 3B y Tabla 1). El subtipo de cáncer, el estado hormonal y la etapa se determinaron en el momento en que se obtuvo la sangre. Un análisis de potencia ( $1-\beta = 0,9$ ,  $\alpha = 0,05$ ) determinó que un tamaño de muestra de 30 pacientes era suficiente para estratificar las cohortes de pacientes según el análisis de datos CTC previo [3].

**Resultados.** Se encontraron CTC en el 83 % de las muestras de pacientes y en ninguna de las muestras de control sanas, de acuerdo con los estudios publicados (es decir, CellSearch® identifica las CTC en ~65 % -80 % de cáncer de mama en etapa tardía) [1, 2, 4, 19, 20]. La mayoría de las CTC (~91 %), identificadas por la tinción diferencial de citoqueratina+, DAPI+ y CD45 negativas, tenían una apariencia maligna, es decir, altas relaciones citoplasmáticas a nucleares, alto pleomorfismo y citoqueratina filamentosa bien estructurada (Figura 1) [3, 4, 17-20].

La cohorte de pacientes se dividió en subconjuntos utilizando el corte clínico estándar de  $\geq 5$  CTC/muestra (las muestras fueron de 7,5 ml) para determinar la supervivencia del paciente [1-4, 17-20]. Específicamente, 23 de 36 pacientes (64 %) tenían  $< 5$  CTC con una mediana de supervivencia de  $> 24$  meses. Mientras que 13 de 36 pacientes (36 %) tenían  $\geq 5$  CTC con una mediana de supervivencia de 10,0 meses, razón de riesgo 5,2 (Figura 2A y Tabla 2). Esta razón de riesgo estuvo dentro del intervalo de confianza de las razones publicadas que establecieron  $\geq 5$  CTC como el punto de corte óptimo para la evaluación de pacientes (es decir, 26-49 % de pacientes con cáncer de seno en etapa tardía tienen  $\geq 5$  CTC por muestra con una mediana de supervivencia reportada que varía de 10,1 a 15 meses [1-4, 17-20]).

**Tabla 2.**

Variable	Numero de Pacientes	Razón de riesgo	CI 95 %	Valor p
1 CTC mitótica vs a 0 CTC mitótica	13 vs 23	11,1	3,1-39,7	<0,001
$\geq 5$ CTC vs $< 5$ CTC	13 vs 23	5,17	1,6-16,5	0,006
ER/PR positivo vs negativo**	16 vs 17	1,3	0,5-3,7	0,174
HER2 positivo vs negativo**	7 vs 26	1,8	0,6-5,7	0,289
Hormona positiva vs triple negativa**	23 vs 10	4,0	1,4-11,2	0,009

\*\* No se pudo determinar el estado hormonal de tres pacientes

Todas las CTC se subclasificaron con base en la identificación citológica de los fenotipos en fase M [1-4, 17-20, 27]. Las CTC se identificaron en todas las etapas de la mitosis de la cohorte de pacientes, Figuras 1A-1J [5, 6, 8, 27]. Específicamente, 23 de 36 pacientes (64 %) no tenían CTC mitóticas y tenían una supervivencia media  $> 24$  meses. En contraste, 13 de 36 pacientes (36 %) tuvieron  $\geq 1$  evento mitótico, y una mediana de supervivencia de 5,7 meses, razón de riesgo 11,1 (Figuras 2B y 4; Tabla 2). Es de destacar que los eventos mitóticos se detectaron en cuatro pacientes que tenían  $< 5$  CTC y no se detectaron en cuatro pacientes con  $\geq 5$  CTC (Figura 4). Estos datos sugieren que la caracterización visual adicional de la mitosis en CTC mejora la estratificación de pacientes con cáncer de mama para la correlación pronóstica con la supervivencia en comparación con la enumeración de CTC solamente. En la cohorte nuevamente estratificada, el 92 % de los pacientes con al menos una CTC mitótica murieron en un período de observación de 2 años versus el 13 % de los pacientes sin una CTC mitótica, lo que representa un aumento de 11 veces en el riesgo del paciente (Tabla 2 y Figura2).

La figura 3A es un gráfico de las estimaciones de Kaplan-Meier de las probabilidades de supervivencia global de las subpoblaciones de pacientes con base en el estado del receptor (n = 33). El cáncer de mama está subtipificado por el estado del receptor: receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y triple negativo. Tres de los 36 pacientes no tenían un estado de receptor conocido. La Figura 3B es una estimación de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia global de los subtipos moleculares con base en la subpoblación de pacientes: Luminal A, Luminal B, estado HER2 y pacientes triple negativos. El subtipo de cáncer de mama Luminal A generalmente se caracteriza por ER positivo y/o PR positivo, HER2 negativo y bajo Ki67. El subtipo de cáncer de mama Luminal B generalmente se caracteriza por ER positivo y/o PR positivo, HER2 positivo (o HER2 negativo con Ki67 alto). El marcador molecular Ki67 es un indicador de división celular activa en una gran cantidad de células cancerosas. Todas las razones de riesgo se calcularon con base en la cohorte de pacientes Luminal A.

La Figura 4 es un gráfico del número total de CTC en cada paciente frente a CTC mitóticas para cada paciente a partir de 7,5 ml de sangre periférica. Cuadrados = pacientes que expiraron después de 2 años; diamantes = pacientes vivos después de 2 años. En un paciente en particular, solo se detectaron dos CTC en la muestra, pero una de ellas era mitótica (IM = 0,5). Este paciente también falleció en 2 años. Estos resultados demuestran que la cantidad de CTC mitóticas es más importante que la cantidad total de CTC para determinar la supervivencia. Esto indica que también el índice mitótico es más importante que el recuento de CTC.

De los 155 eventos mitóticos identificados, la profase fue la más comúnmente observada (78 % de CTC mitóticas, o 121 células), seguida de telofase/citocinesis (15 %, o 23 células). Raramente se observaron metafase y anafase, solo 4 en anafase y 6 en metafase, 2,6 % y 3,9 %, respectivamente. Curiosamente, el número de eventos mitóticos fue más común de lo esperado, 9,3 % de todos las CTC.

Usando un tamaño de muestra suficiente para estratificar adecuadamente la cohorte de pacientes, estos resultados demuestran que, si bien el número de CTC es de hecho un indicador de pronóstico de la supervivencia del paciente, al subtipar la misma población con base en la CTC en la mitosis citológica, el riesgo aumentó dramáticamente a 11,1. Utilizando la evaluación citológica de las CTC, combinada con la supervivencia calculada del paciente, estas observaciones implican que hay poblaciones cuantificables de CTC intactas en la mitosis que se encuentran fuera del área del tumor, que podrían ser las poblaciones de CTC buscadas clínicamente relevantes. Si bien no se puede determinar si estas CTC se están dividiendo activamente en la circulación o si las CTC en división simplemente se están desprendiendo del tumor en el sistema circulatorio, el hallazgo de estas células en el cáncer de seno en etapa tardía es intrigante. Teniendo en cuenta que las células mitóticas son menos estables y propensas al colapso

estructural, el estrés de la circulación debería disminuir intuitivamente la frecuencia de las CTC mitóticas y destruir las células antes del aislamiento, lo que no ocurrió [5-8]. Biológicamente, estos eventos sugieren subtipos celulares agresivos involucrados en la cascada metastásica, y las observaciones presentes en este documento implican que hay poblaciones cuantificables de CTC en la fase mitótica que se encuentra fuera del área del tumor.

A pesar de ser una pequeña cohorte, la población de pacientes representaba un grupo heterogéneo de cánceres de mama con un estado hormonal diverso (Tablas 1 y 2) y una separación de cohorte distinta, lo que indica las posibles aplicaciones al cáncer de mama en general, e incluso a otras formas de cáncer. La presencia de CTC mitóticas, y la asociación con un mayor riesgo, indica la existencia de una cohorte estadísticamente significativa con un subtipo de cáncer agresivo.

El seguimiento de las células cancerosas mitóticas que transitan por el sistema circulatorio proporciona un procedimiento simple y no invasivo para recopilar información clínicamente relevante sobre células tumorales altamente agresivas que pueden ayudar a planificar el tratamiento del paciente a medida que evoluciona la progresión del tumor. Si bien la elaboración de perfiles ómicos del tumor promete un futuro de la medicina de tratamiento personalizado, actualmente, la propagación de la enfermedad (es decir, la etapa) seguida de la agresividad de la enfermedad (es decir, el grado) siguen siendo el primer y el segundo factor más importante en la supervivencia y el tratamiento de los pacientes. La incorporación de índices mitóticos en la evaluación de CTC podría estratificar mejor a los pacientes en grupos de pronóstico, informar mejor a un médico sobre la evolución del tumor e identificar los objetivos de cáncer más agresivos mediante una biopsia con base en sangre.

Además, analizar el número de CTC en la fase mitótica, así como un cambio en el número de CTC en la fase mitótica a lo largo del tiempo, proporciona información clínicamente útil que puede usarse para determinar qué tratamiento administrar a un paciente, si el paciente responderá a un tratamiento particular y si el paciente está respondiendo durante o después de un curso de tratamiento. La fase mitótica de CTC es, por lo tanto, también un predictor de respuesta al tratamiento. Por ejemplo, un aumento en el número de CTC mitóticas puede ser una indicación de que el paciente no responde al tratamiento. Del mismo modo, un aumento en el índice mitótico también puede ser una indicación de que el paciente no responde al tratamiento.

### Referencias

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Todas las siguientes referencias han sido citadas en esta solicitud:

1. Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, De Marzo AM, Hammond ME, Hayes DF, Iafrate AJ, Kelley RK, Marcucci G, Ogino S et al: NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2011, 9 Suppl 5:S1-32; quiz S33.
2. Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, Srkalovic G, Tejwani S, Schott AF, O'Rourke MA, Lew DL et al.: Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *Journal of Clinical Oncology* 2014, 32(31): 3483-3489.
3. Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, Cristofanilli M, Tang CM, Alpaugh RK: Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch® CTC test. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2015, 87(2): 137-144.
4. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, Uhr JW, Terstappen LW: Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, 10(20): 6897-6904.
5. Bloom HJ, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *British journal of cancer* 1957, 11(3): 359-377.
6. Clayton F: Pathologic correlates of survival in 378 lymph node-negative infiltrating ductal breast carcinomas. Mitotic count is the best single predictor. *Cancer* 1991, 68(6): 1309-1317.
7. Galea MH, Blarney RW, Elston CE, Ellis IO: The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 1992, 22(3): 207-219.
8. National Comprehensive Cancer N: Breast Cancer Screening and Diagnosis Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 2003, 1(2): 242-263.
9. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, Ellis IO, Page DL, Dupont WD, Blarney RW: Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2000, 13(7): 730-735.
10. Burton JL, Goepel JR, Lee JA: Demand management in urine cytology: a single cytospin slide is sufficient. *Journal of clinical pathology* 2000, 53(9): 718-719.
11. Stott SL, Lee RJ, Nagrath S, Yu M, Miyamoto DT, Ulkus L, Inserra EJ, Ulman M, Springer S, Nakamura Z et al: Isolation and characterization of circulating tumor cells from patients with localized and metastatic prostate cancer. *Science translational medicine* 2010, 2(25): 25ra23.

12. Paoletti C, Muniz MC, Thomas DG, Griffith KA, Kidwell KM, Tokudome N, Brown ME, Aung K, Miller MC, Blossom DL et al: Development of circulating tumor cell-endocrine therapy index in patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015, 21(11): 2487-2498.
- 5 13. Jonat W, Arnold N: Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 2011, 22(3): 500-502.
14. Colozza M, Sidoni A, Piccart-Gebhart M: Value of Ki67 in breast cancer: the debate is still open. *The Lancet Oncology* 2010, 11(5): 414-415.
- 10 15. Serrano MJ, Nadal R, Lorente JA, Salido M, Rodriguez R, Rodriguez M, Macia M, Sanchez-Rovira P, Corominas JM, Gonzalez L et al: Circulating cancer cells in division in an early breast cancer patient. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 2011, 22(9):2150-2151.
16. Andre F, Arnedos M, Goubar A, Ghouadni A, Delaloge S: Ki67--no evidence for its use in node-positive breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology* 2015, 12(5): 296-301.
- 15 17. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, Ogden IM, Catalona W, Chumsri S, Tang CM et al: Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, 111(9): 3514-3519.
18. Adams DL, Zhu P, Makarova OV, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, Li S, Amstutz P, Tang CM: The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters. *RSC advances* 2014, 9: 4334-4342.
- 20 19. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW et al: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine* 2004, 351(8): 781-791.
20. Miller MC, Doyle GV, Terstappen LW: Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *Journal of oncology* 2010, 2010: 617421.
- 25 21. Ferreira MM, Ramani VC, Jeffrey SS: Circulating Tumor Cell Technologies. *Molecular Oncology* 2016.
22. Lianidou ES, Markou A: Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges. *Clinical chemistry* 2011, 57(9): 1242-1255.
23. Low WS, Abas WABW: Benchtop Technologies for Circulating Tumor Cells Separation Based on Biophysical Properties. *BioMed Research International* 2015, 2015.
- 30 24. Adams DL, Alpaugh RK, Martin SS, Charpentier M, Chumsri S, Cristofanilli M, Adams DK, Makarova OV, Zhu P, Li S et al: Precision microfilters as an all in one system for multiplex analysis of circulating tumor cells. *RSC advances* 2016, 6(8): 6405-6414.
25. Idowu MO, Powers CN: Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics - a review. *International journal of clinical and experimental pathology* 2010, 3(4): 367-385.
- 35 26. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg F, Force ET: Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2006, 13(9): 913-922.
27. Devenport D, Oristian D, Heller E, Fuchs E: Mitotic internalization of planar cell polarity proteins preserves tissue polarity. *Nature cell biology* 2011, 13(8): 893-902.
- 40 28. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, Andergassen U, Meier-Stiegen F, Czyn ZT, Alberter B et al: Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO molecular medicine* 2014, 6(11): 1371-1386.
29. Lohr JG, Adalsteinsson VA, Cibulskis K, Choudhury AD, Rosenberg M, Cruz-Gordillo P, Francis JM, Zhang CZ, Shalek AK, Satija R et al: Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nature biotechnology* 2014, 32(5): 479-484.
- 45 30. Konstantinos Tryfonidis et al., "Detection of Circulating Cytokeratin-19 mRNA-Positive Cells in the Blood and the Mitotic Index of the Primary Tumor Have Independent Prognostic Value in Early Breast Cancer", *Clinical Breast Cancer*, Vol. 14, No. 6, 442-50.
31. Maria Spiliotaki et al., "Evaluation of proliferation and apoptosis markers in circulating tumor cells of women early breast cancer who are candidates for tumor dormancy", *Breast Cancer Research* (2014) 16: 485.
- 50 32. Cristina Raimondi et al., "Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients", *Breast Cancer Res Treat* (2011) 130: 449-455.
33. L. Rossi et al., "Prognostic impact of discrepant Ki67 and mitotic index on hormone receptor-positive, HER2-negative breast carcinoma", *British Journal of Cancer* (2015) 113, 996-1002.
- 55

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

5 (a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en el que preferentemente la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, en el que incluso más preferentemente, la muestra biológica es al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica, y

10 (b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifica una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, se predice que el sujeto tiene una menor probabilidad de supervivencia en comparación con un sujeto que tiene el mismo cáncer que no tiene una o más CTC identificadas por estar en una fase del ciclo celular mitótico, por lo que predice la probabilidad de supervivencia de un sujeto que tiene cáncer, preferentemente en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinar visualmente la fase del ciclo celular.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona de:

- un carcinoma, y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

20 (a) diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros,  
(b) presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en citoqueratina filamentosa (CK) 8, CK18, CK19 y

25 (c) ausencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD14 y CD31, preferentemente en el que las CTC **se caracterizan** además preferentemente por la presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2,  
o

30 - un melanoma y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

(a)' diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)' presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T;  
o

- un sarcoma y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

40 (a)" diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)" presencia de vimentina.

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinando visualmente la fase del ciclo celular.

45 4. Un procedimiento para clasificar un tumor sólido maligno en un sujeto, en el que el procedimiento comprende:

(a) obtener una población de CTC de una muestra biológica de un sujeto que tiene un tumor sólido maligno, en el que preferentemente la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, en le que incluso más preferentemente la muestra biológica es al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica, y

50 (b) cribar la población de CTC en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico, en el que cuando se identifica una o más CTC por estar en una fase del ciclo celular mitótico, el tumor del sujeto se clasifica como agresivo, calificando así un tumor sólido maligno en un sujeto, preferentemente en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinando visualmente la fase del ciclo celular.

55 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el tumor sólido maligno se selecciona a partir de lo siguiente:

- un carcinoma, y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

60 (a) diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros,  
(b) presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en citoqueratina filamentosa (CK) 8, CK18, CK19 y  
(c) ausencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD14 y CD31, preferentemente en el que las CTC **se caracterizan** además preferentemente **por** la presencia de uno o más

65

marcadores seleccionados del grupo que consiste en EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2,

5 o  
- un melanoma y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

(a)' diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)' presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T;

10 o  
- un sarcoma y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

15 (a)" diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)" presencia de vimentina.

6. Un procedimiento para el seguimiento de la eficacia del tratamiento en un sujeto que tiene cáncer, en el que el procedimiento comprende:

20 (a) obtener una primera población de CTC de una primera muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en el que preferentemente la primera muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, más preferentemente la primera muestra biológica es al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica,

(b) cribar la primera población en busca de células en una fase del ciclo celular mitótico,

25 (c) obtener una segunda población de CTC a partir de una segunda muestra biológica del sujeto después del tratamiento del cáncer, en el que preferentemente la segunda muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre periférica, sangre, ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y orina, con la condición de que la segunda muestra biológica sea de la misma fuente que la primera muestra biológica, lo más preferentemente, tanto la primera como la segunda muestra biológica tienen al menos aproximadamente 7,5 ml de sangre periférica, y

30 (d) cribar la segunda población por células en una fase del ciclo celular mitótico,

en el que un aumento en el número de CTC mitóticas en la segunda población frente a la primera población, o un aumento en el índice mitótico calculado para la segunda población frente a la primera población, sugiere que el tratamiento es ineficaz, preferentemente en el que la fase del ciclo celular mitótico se determina tiñendo las células con una tinción nuclear y determinando visualmente la fase del ciclo celular.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el cáncer se selecciona de los siguientes:

40 - un carcinoma, y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

(a) diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros,

(b) presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en citoqueratina filamentosa (CK) 8, CK18, CK19, y

45 (c) ausencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD45, CD14 y CD31, preferentemente en el que las CTC **se caracterizan** además preferentemente por la presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en EpCAM, EGFR, HER2, MUC-1, EphB4, CEA, CK5, CK6, CK7, CK14, CK16, CK17, CK20, PLZ4, PSMA, PSA, PDX-1, CXCR-4 y CDX2,

50 o  
- un melanoma y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

(a)' diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y

55 (b)' presencia de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD146, melanina, PAX3d, MLANA, TGFβ2, MCAM, ABCB4, CSPG4, MART-1, MAGE-A3 y GAINAc-T;

o  
- un sarcoma y en el que las CTC **se caracterizan por** una o más de las siguientes características:

60 (a)" diámetro de entre aproximadamente 7 y 25 micrómetros, y  
(b)" presencia de vimentina.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la población de las CTC se obtienen a partir de una muestra biológica usando la metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de glóbulos rojos, agotamiento de leucocitos, FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo y chip microfluídico, o una combinación de los mismos.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la metodología de exclusión por tamaño es microfiltración.

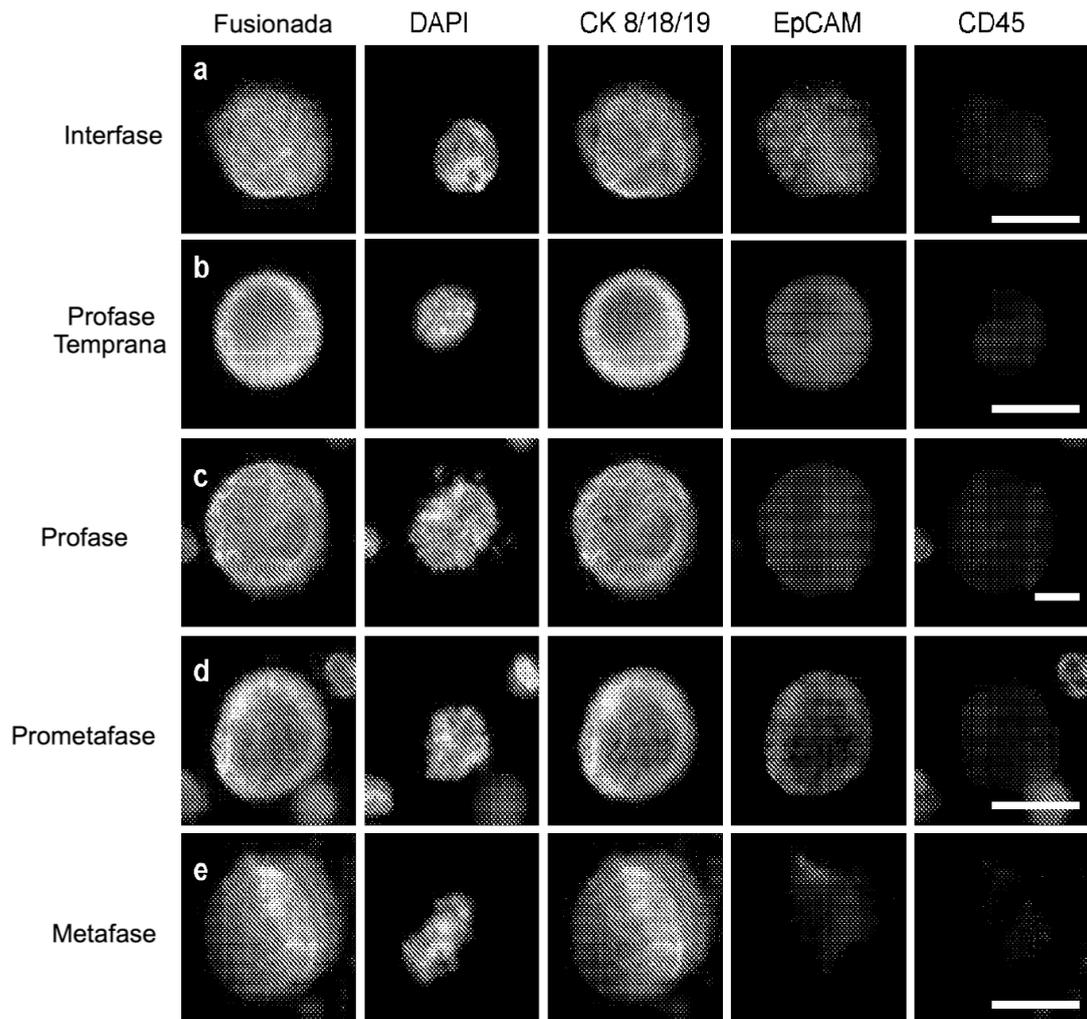
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la microfiltración es a través de un microfiltro que tiene un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 a 10 micrómetros.

5 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la filtración es a través de un ensayo de microfiltración de baja presión CellSieve<sup>MR</sup>, en el que el microfiltro comprende una película seca foto-definible.

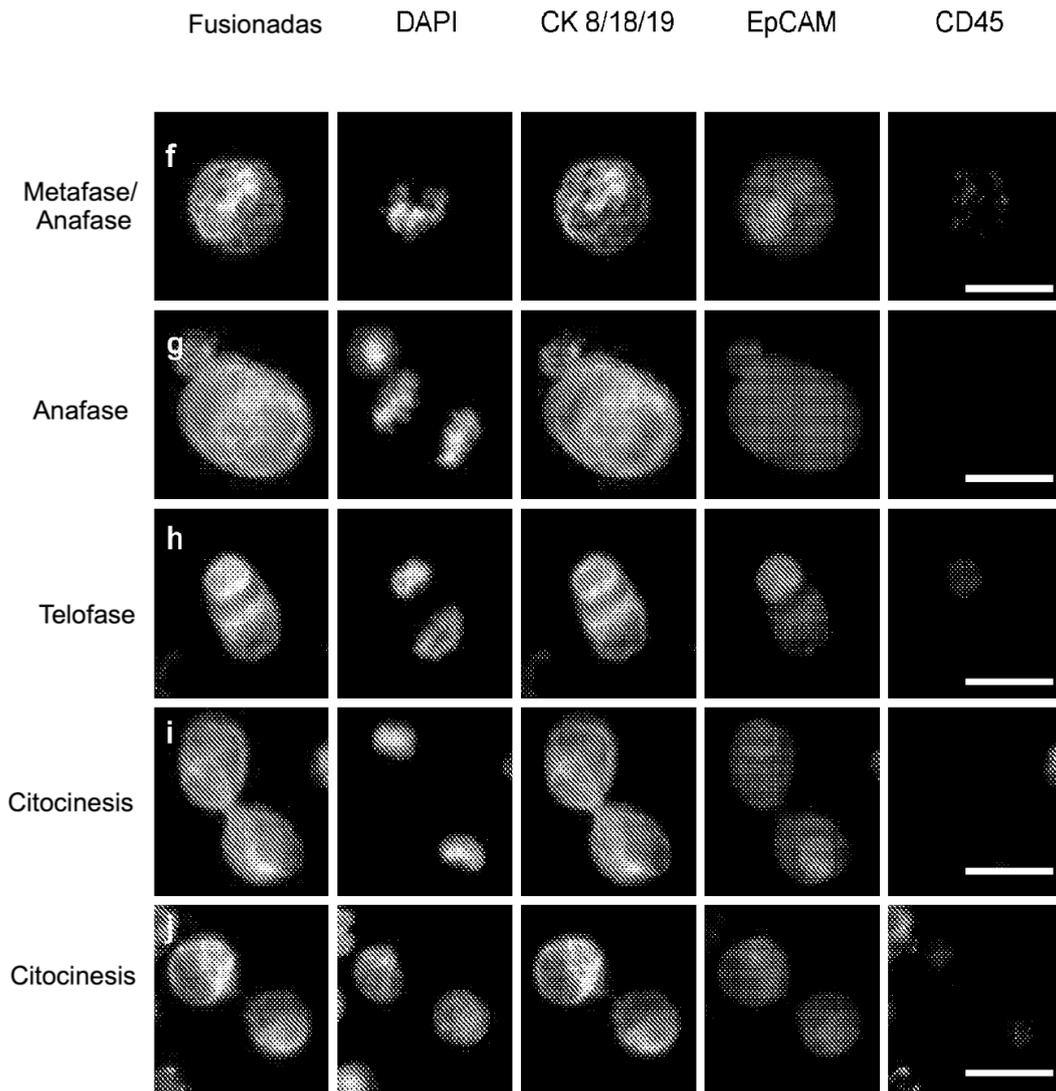
10 12. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la población de las CTC se obtienen de una muestra biológica utilizando FICOLL.

15 13. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la población de las CTC se obtienen de una muestra biológica usando un chip microfluídico con base en la clasificación basada en el tamaño físico, clasificación basada en el tamaño hidrodinámico, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes, o eliminación de células pequeñas en base al tamaño.

Figuras 1A-1E

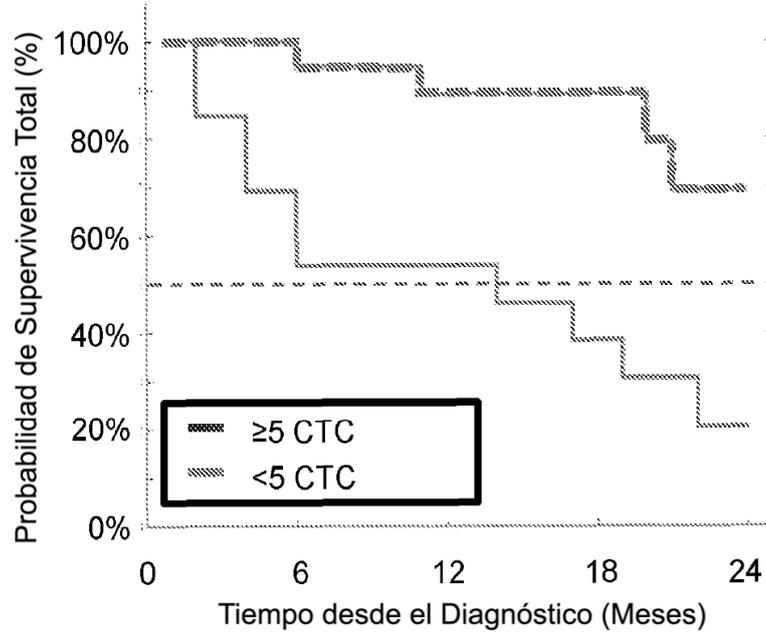


Figuras 1F-1J

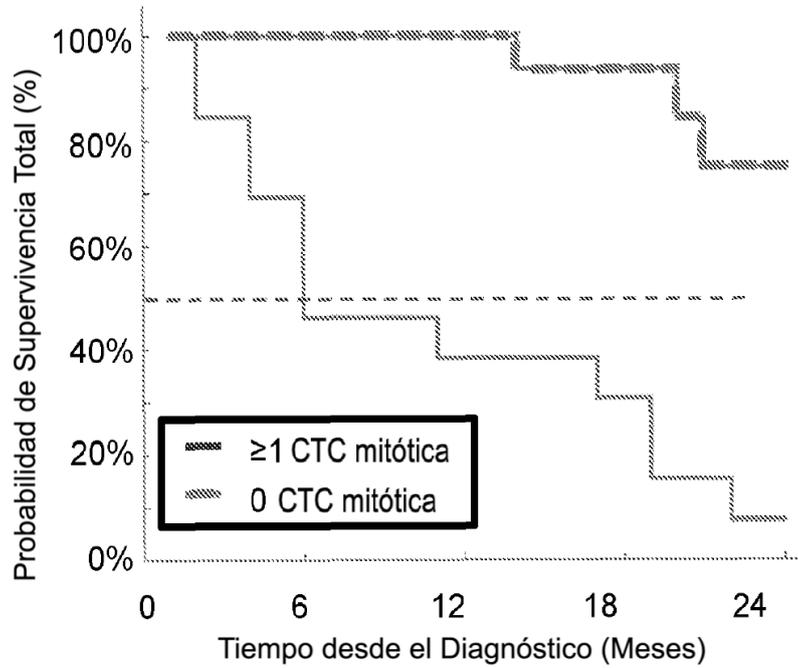


Figuras 2A-2B

A.

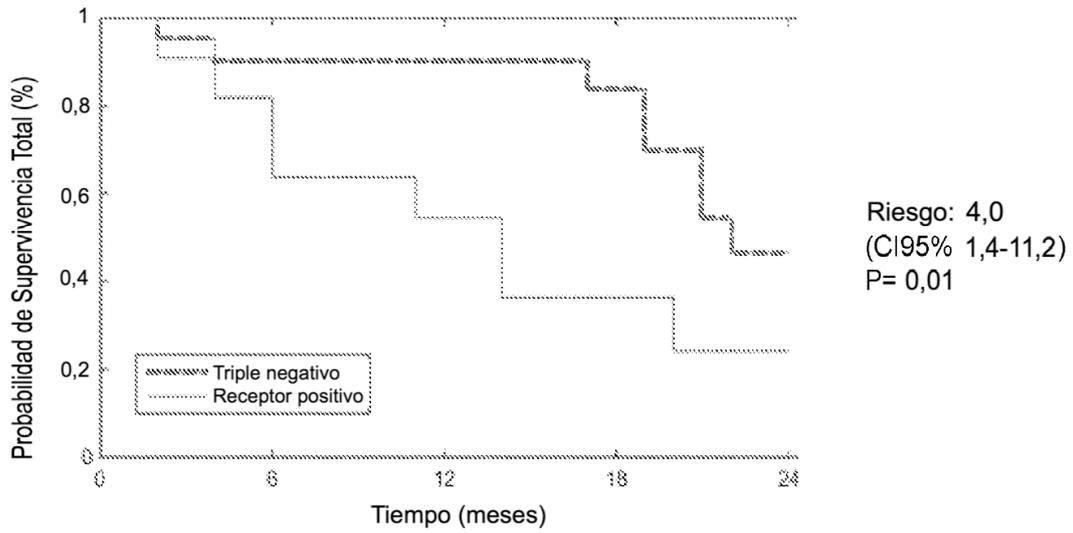


B.



Figuras 3A-3B

A.



B.

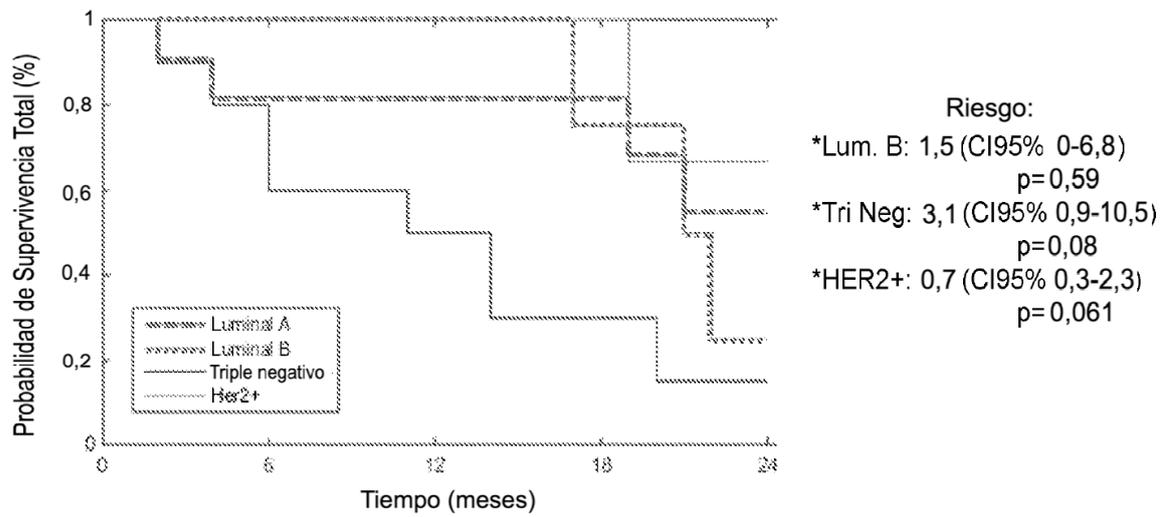


Figura 4

