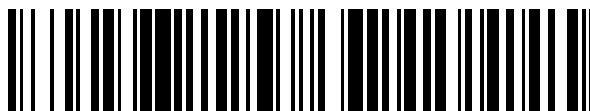


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 653**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

B82Y 35/00 (2011.01)

G01N 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2016** **PCT/EP2016/075587**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017** **WO17068197**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2016** **E 16795241 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3365676**

54 Título: **Perfil nanomecánico de subtipos moleculares de cáncer de mama**

30 Prioridad:

22.10.2015 EP 15191137

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

11.12.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT BASEL (100.0%)
Vizerektorat Forschung, Petersgraben 35
4003 Basel, CH

72 Inventor/es:

PLODINEC, MARIJA;
OBERMANN, ELLEN;
OERTLE, PHILIPP y
RÄZ, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP

ES 2 798 653 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

Perfil nanomecánico de subtipos moleculares de cáncer de mama

5 **Antecedentes**

El cáncer de mama es la neoplasia maligna de aparición más frecuente y la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer en las mujeres de los países desarrollados. No obstante, mientras que los tumores primarios rara vez son letales, las metástasis son responsables de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer. Hay algunos parámetros que sirven como marcadores pronósticos para el desarrollo de metástasis, pero a pesar de los esfuerzos considerables, Todavía no es posible predecir con precisión el riesgo de un individuo. Por lo tanto, la terapia adyuvante se administra con frecuencia a pacientes que podrían haberse curado mediante cirugía y tratamiento anti-hormonal solo. La clasificación actual del cáncer de mama, incluyendo los marcadores pronósticos y predictivos, todavía se basa principalmente en criterios clínicos e histopatológicos, es decir, edad del paciente, tamaño del tumor, implicación de los ganglios linfáticos, tipo histológico del tumor, expresión de receptores de estrógeno y progesterona, HER2/neu y Ki-67 y grado tumoral.

Sin embargo, la estratificación del riesgo basada solo en parámetros patológicos clínicos puede ser engañosa. Especialmente en cáncer de mama HER2/neu negativo temprano (es decir, estadios I, IIA, IIB y IIIA), estos factores clinicopatológicos no son suficientes para la toma de decisiones clínicas, particularmente con respecto a la quimioterapia adyuvante, ya que puede ocurrir un sobretratamiento o subtratamiento sustancial. Desde 2007, las directrices internacionales han recomendado añadir pruebas adicionales a la evaluación de riesgos establecida.

El objeto principal de la investigación sobre el cáncer de mama es, por lo tanto, el desarrollo de marcadores de pronóstico que se evalúen mediante pruebas certificadas de calidad garantizada, que puedan usarse de manera rutinaria y cuyos costes sean aceptables. Estos marcadores deberían ayudar a optimizar el diagnóstico de cáncer, orientar la elección de la terapia y apoyar el seguimiento del paciente.

Sin embargo, todas las pruebas disponibles actualmente tienen ciertos inconvenientes. En general, solo están validados para subgrupos de pacientes bien definidos, por ejemplo, en pacientes con ganglios negativos con tumores moderadamente diferenciados. Además, las pruebas se realizan principalmente en instituciones centrales, que requieren tiempo para la entrega de las muestras tumorales al laboratorio central. Además, no hay control local (de calidad) sobre el procesamiento de la muestra.

Una correlación entre la progresión del cáncer de mama humano y la rigidez del tumor acompañada de un aumento incremental de la deposición de colágeno se ha descrito previamente en la bibliografía (Acerbi et al., Integr. Biol, 7, 1120-1134, 2015). Sin embargo, No se conoce ningún método para clasificar las diferentes etapas tumorales de la técnica anterior.

Basado en este fondo, es por lo tanto el objeto de la presente invención proporcionar un método fiable y sencillo para subtipificar la muestra de cáncer de mama y/o proporcionar información pronóstica y/o predictiva sobre el cáncer de mama.

El objeto se logra mediante el método de la reivindicación 1 dependiente.

45 **Definiciones**

Los términos *rigidez*, *elasticidad* o *rigidez de contacto* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la resistencia de una muestra de tejido o tejido a la deformación por una fuerza aplicada. La rigidez o elasticidad se mide como el módulo elástico de la muestra de tejido en Pascales (Pa). Una muestra de tejido blando se caracteriza por un valor de rigidez bajo y un tejido rígido se caracteriza por un valor de rigidez elevado.

Tal fuerza de deformación puede aplicarse a la muestra de tejido o al tejido por un muestreador o un lápiz (como parte, por ejemplo, de un microscopio de fuerza atómica) que incide en la muestra de tejido o el tejido, en donde el muestreador o la muestra de tejido se mueve en una dirección vertical entre sí. Para medir una pluralidad de puntos en una muestra, el intendente o la muestra pueden moverse adicionalmente en una dirección lateral, en donde una dirección lateral en el sentido de la invención significa una dirección que es ortogonal a la dirección vertical.

El muestreador o el lápiz puede ser un voladizo con una punta afilada o una partícula coloidal unida que actúa como una sonda. Un voladizo en el contexto de la presente memoria descriptiva significa una viga o brazo que está anclado en un solo extremo. Las desviaciones del voladizo causadas por fuerzas repulsivas o atractivas entre la superficie de la muestra y la punta pueden detectarse ópticamente, por ejemplo, mediante un interferómetro o un láser enfocado en la parte posterior del voladizo y reflejado en un fotodiodo dividido, en donde el fotodiodo registra la desviación del voladizo como una diferencia de voltaje, que puede convertirse en nanómetros. Como alternativa, la desviación del voladizo puede detectarse por un sensor piezoeléctrico, en donde la tensión del

voladizo se convierte en una carga eléctrica. También como alternativa, puede usarse un voladizo autodetector como sondas activas de detección piezo-resistivas (PR-SA, por sus siglas en inglés), que son por ejemplo, voladizos de silicio con un puente de piezo-resistencia integrado y un calentador térmico. Ventajosamente, con tales voladizos no es necesario ajustar el láser.

El término *zona* en el contexto de la presente especificación se refiere a un área que está definida por una cuadrícula de puntos (de medición), en donde cada punto corresponde a la huella de indentación del lápiz óptico como se describe anteriormente y cada punto no es más de 100 μm , preferentemente 50 μm , 20 μm , 10 μm o 1 μm de distancia de su siguiente punto. A modo de ejemplo no limitante, un área tiene un tamaño de 25 μm^2 , 50 μm^2 , 100 μm^2 , 200 μm^2 , 300 μm^2 , 400 μm^2 , 500 μm^2 , 600 μm^2 , 750 μm^2 , 1000 μm^2 , 5000 μm^2 o 10.000 μm^2 y los puntos centrales geométricos de dos áreas son de al menos 100 μm , 200 μm , 300 μm , 400 μm , 500 μm o 1 mm de separación.

La fuerza medida y la profundidad de indentación para cualquier muestra dada dependen de la constante del resorte en voladizo y el radio de la punta.

La expresión *resolución espacial* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la distancia mínima entre dos puntos en un tejido o muestra de tejido por la cual los dos puntos pueden ser discriminados con respecto a su rigidez. Una resolución espacial de al menos 1 mm, preferentemente 100 μm , 10 μm o 1 μm significa que la distancia máxima por la cual todavía se pueden discriminar dos puntos es 1 mm, preferentemente 100 μm , 10 μm o 1 μm . Una resolución espacial de al menos 100 μm , preferentemente 10 μm o 1 μm también abarca resoluciones más altas. Una resolución superior a 1 μm significa que aún se pueden discriminar dos puntos que tienen una distancia menor a 1 μm . Algunos ejemplos de resoluciones superiores a 100 μm son 10 μm y 1 μm . Algunos ejemplos de resoluciones superiores a 1 μm son 0,5 μm , 0,1 μm y 10 nm.

La expresión *muestra de tejido* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra de tejido que comprende células contiguas y matriz extracelular. Dicha muestra de tejido puede obtenerse mediante una biopsia o resección.

La expresión *espécimen de resección* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra que representa al menos una parte de un órgano o el cuerpo que se ha retirado del órgano o cuerpo. Un espécimen de resección también puede comprender un órgano completo o una parte del cuerpo.

La expresión *muestra de biopsia de tejido* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra de tejido que se obtiene mediante una biopsia y comprende células contiguas y matriz extracelular.

El término *biopsia* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un método para extraer una parte de tejido o un tejido para su examen. Dicha biopsia puede ser una biopsia por aspiración con aguja, una biopsia por punción, una biopsia central asistida por vacío, una biopsia con aguja gruesa o una biopsia con fórceps. La retirada puede realizarse con la ayuda de herramientas adecuadas, tales como una aguja hueca, un cuchillo redondo afilado o un bisturí. Además, puede obtenerse una muestra de biopsia de tejido mediante endoscopios o métodos endoscópicos.

El procedimiento de biopsia puede guiarse por un método adecuado tales como ultrasonidos o TC (tomografía computarizada por rayos X), en donde puede detectarse o localizarse un tumor o una lesión visible.

La expresión *tejido normal* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un conjunto de células contiguas y matriz extracelular con función idénticamente fisiológica que se caracterizan por una normalidad, crecimiento controlado y función y estructura celular y extracelular normales.

El término *tumor* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una neoplasia o una lesión que está formada por un crecimiento anormal de células neoplásicas. El tumor puede ser benigno, premaligno o maligno. Se prefiere la clasificación de una muestra de biopsia de tejido de un carcinoma mamario humano. El término lesión o tumor *benigno* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que carece de la capacidad metastatizar.

La expresión *tumor primario* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que se origina a partir del mismo tipo de tejido que el órgano o tejido circundante.

Los términos *metástasis*, *las metástasis* o *tumor metastatizado* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que se ha diseminado desde el tumor primario a sitios distantes tales como el tejido adyacente, ganglios linfáticos adyacentes, ganglios linfáticos axilares u órganos diferentes.

Las expresiones *neoplasia maligna* o "un tumor maligno" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la capacidad de un tumor para penetrar en la membrana basal, invadir tejidos vecinos o diseminarse por el cuerpo. Un tumor maligno es sinónimo de una neoplasia maligna o cáncer, en particular con cáncer invasivo.

- La expresión *borde del tumor* en el contexto de la presente memoria descriptiva se define como un borde redondo, uniforme, bien definido (principalmente en tumor benigno) o irregular, mal definido (a menudo el caso en tumores malignos) entre un tumor y el tejido adyacente. Histológicamente se define como la parte más externa del tumor donde pueden encontrarse células tumorales.
- 5
- La expresión *tejido adyacente* en el contexto de la presente memoria descriptiva se define como parte del tejido u órgano distinto del tumor. El tejido adyacente rodea típicamente el tumor primario, pero también puede considerarse como cualquier parte del tejido del órgano sin presencia de tumor.
- 10
- La expresión *ganglio linfático adyacente* o *ganglio linfático adyacente a un tumor primario* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a ganglios linfáticos que drenan un tumor. Dichos ganglios linfáticos adyacentes también se denominan *ganglios linfáticos centinela*.
- 15
- La expresión *ganglio linfático axilar* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un ganglio linfático que drena los vasos linfáticos de los cuadrantes laterales de la mama, los vasos linfáticos superficiales de las paredes del tórax y el abdomen por encima del nivel del ombligo, y los vasos de la extremidad superior. Los ganglios linfáticos axilares también se conocen como ganglios linfáticos de la axila.
- 20
- La expresión *subtipo molecular* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere al perfil o patrón de expresión definido de un cáncer de mama o tumor mamario, o células tumorales del mismo, en donde diferentes subtipos son distinguibles sobre el perfil de expresión o patrón de un cáncer de mama o tumor mamario, o células tumorales del mismo.
- 25
- La expresión *subtipo luminal A* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que comprende células cancerosas, en donde las células cancerosas son positivas para el receptor de estrógenos, al menos el 20 % de las células cancerosas del tumor son positivas para el receptor de progesterona, y menos del 20 % de las células cancerosas son positivas para la proteína Ki-67 (UniProt P46013).
- 30
- La expresión *subtipo luminal B* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que comprende células cancerosas, en donde las células cancerosas son positivas para el receptor de estrógenos y menos del 20 % de las células cancerosas del tumor son positivas para el receptor de progesterona o bien al menos el 20 % de las células cancerosas son positivas para la proteína Ki-67 (UniProt P46013).
- 35
- La expresión *subtipo luminal similar a B (Her 2+)* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que comprende células cancerosas, en donde las células cancerosas son positivas para el receptor de estrógenos y el receptor Her2.
- 40
- La expresión *subtipo basal* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que comprende células cancerosas triple negativas, en donde las células cancerosas son negativas para el receptor de estrógenos, el receptor de progesterona y el receptor Her2.
- 45
- La expresión *distribución de rigidez* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una frecuencia de diferentes valores de rigidez determinados a partir de una muestra de biopsia de tejido individual. Una distribución de rigidez determinada puede ajustarse adicionalmente a una función gaussiana. Una distribución de rigidez unimodal es una distribución de valores de rigidez discretos que tienen un solo máximo, lo que indica una muestra que tiene una rigidez uniforme. Una función de distribución bimodal tiene dos máximos. Tal distribución puede estar provocada por una muestra que tiene dos partes diferentemente rígidas, por ejemplo, un núcleo tumoral blando y una periferia rígida. Una distribución de rigidez trimodal en el sentido de la invención significa una distribución caracterizada por tres máximos locales. Una distribución trimodal puede indicar que el tejido normal, una región del borde caracterizada por un estroma duro y un núcleo tumoral blando han contribuido a los valores que componen la distribución. Una muestra de distribución de rigidez al menos bimodal tiene una función de distribución bimodal, trimodal o n-modal (siendo n un número entero >1).
- 50
- La expresión *distribución de rigidez heterogénea* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una función de distribución n-modal (siendo n un número entero >1).
- 55
- Una pluralidad de valores de rigidez en el contexto de la presente especificación se refiere al menos a 50, 100, 200, 300, 400, 500, 900, 1000, 1600, 2500, 3600, 4900, 6400, 8100, 10000 o 21000 valores de rigidez.
- 60
- Un *marcador pronóstico* proporciona un riesgo de incidencia y/o recurrencia del cáncer o, en otras palabras, da una indicación de la probabilidad de progresión de la enfermedad.
- Un *marcador predictivo* proporciona una indicación de la respuesta del paciente a un tratamiento específico.
- 65
- El término *pico* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un máximo local en la distribución del valor de rigidez y significa el valor de rigidez con la frecuencia más alta dentro de una muestra o dentro de los

valores vecinos inmediatos.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión *frecuencia máxima* cuando se usa con respecto a una distribución de valores de rigidez se refiere a un máximo local o absoluto (global) del gráfico que representa la frecuencia de los valores de rigidez sobre los valores de rigidez, en donde la frecuencia máxima se caracteriza por un valor de frecuencia y un valor de rigidez.

La expresión *condiciones fisiológicas* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a las condiciones necesarias para preservar la integridad estructural y las propiedades mecánicas de la muestra de tejido de biopsia, mantener la viabilidad del tejido mediante cualquier agente químico o físico e incluir en particular que después de la recolección, la muestra se almacena en un tampón fisiológico tales como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o tampón de trasplante tales como el Custodiol, y la determinación de la rigidez se realiza a 20, 25, 30 o 37 °C. La solución de Ringer puede suplementarse además con glucosa y un cóctel de proteasa. Además, la determinación de la rigidez de la muestra de tejido de la biopsia se puede realizar en 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h o 72 h después de la recolección sin cambiar las propiedades mecánicas de la muestra. Las "condiciones fisiológicas" en particular no comprenden tejido congelado o tejido descongelado, ni muestras embebidas en parafina.

El término *radioterapia* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a la aplicación de radiación ionizante a un tejido que comprende o se sospecha que comprende un tumor para controlar o matar células malignas.

El término *quimioterapia* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a la administración de uno o más fármacos anticancerígenos o agentes quimioterapéuticos a un sujeto que los necesite, en donde los agentes quimioterapéuticos pueden ser agentes citotóxicos que pueden reducir la división celular de las células malignas o inducir apoptosis en las células malignas. Algunos ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama incluyen Ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluoruracilo, doxorubicina o un inhibidor de mTOR tales como, por ejemplo, rapamicina (n.º CAS 53123-88-9).

La expresión *terapia hormonal o terapia endocrina* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a la administración de un compuesto que modula la actividad biológica del estrógeno humano, la progesterona humana o sus receptores a un sujeto que lo necesita, tales como antagonistas del receptor o inhibidores del receptor.

Los números de UniProt se refieren a entradas en la UniProt Knowledgebase (UniProtKB).

Descripción de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las muestras de tejido de cáncer de mama pueden clasificarse en subtipos de cáncer de mama según sus propiedades nanomecánicas. De acuerdo con la invención, se proporciona un método para clasificar una muestra de tejido obtenida de un tumor mamario. El método comprende determinar un valor de rigidez para cada uno de una pluralidad de puntos en la muestra de tejido usando un microscopio de fuerza atómica, dando como resultado una distribución de rigidez, dando como resultado una distribución de rigidez y asignando la muestra a uno de los siguientes subtipos moleculares de cáncer de mama basados en la distribución de rigidez determinada:

- subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado,
- subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado,
- subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado,
- subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado,
- subtipo luminal similar a B Her2 + de cáncer de mama metastatizado,
- subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado y
- subtipo basal de cáncer de mama metastatizado.

En determinadas realizaciones,

- una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado o un subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por encima de un umbral, y en donde el umbral equivale a la frecuencia semimáxima del máximo de una frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa,
- una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia por encima de 2 kPa,
- una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia por debajo de 0,25 kPa,
- se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado a

una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,25 kPa y 0,4 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa,

- una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por debajo de un umbral, y en donde el umbral equivale a la frecuencia semi-máxima del máximo de una frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa,
- una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y que se caracteriza además por la ausencia de máximos de frecuencia por encima de 1,3 kPa, y/o
- una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,4 kPa y 2,0 kPa.

En determinadas realizaciones, se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,3 kPa y 0,9 kPa y un máximo de frecuencia entre 2,0 kPa y 2,5 kPa.

En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe máximos de frecuencia a 0,375 kPa, 0,875 kPa y 2,075 kPa.

En determinadas realizaciones, se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia en 0,3 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa.

En determinadas realizaciones, las pluralidades de puntos se determinan con una resolución espacial de al menos 100 μm .

En determinadas realizaciones, la muestra de tejido es una muestra de biopsia de tejido o un espécimen de resección.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos está dispuesta con un área o una línea.

En determinadas realizaciones, se determinan los valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de la misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de las áreas está en el intervalo de 100 μm a 1 mm.

En determinadas realizaciones, la línea se extiende a lo largo del eje longitudinal de la muestra de tejido.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 50 a 210000.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra en un intervalo de tasas de 1000 ciclos de carga por segundo a 0,1 ciclos de carga por segundo.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra con cargas máximas que van desde 200 pN a 3 mN.

En determinadas realizaciones, el método comprende además determinar un marcador sobre o comprendido dentro de la muestra de tejido, en donde el marcador se selecciona del receptor de estrógeno humano, el receptor de progesterona humana, el receptor *HER2/neu* y el antígeno Ki-67.

La invención se refiere además a un sistema para clasificar una muestra de tejido obtenida de carcinoma mamario, que comprende un microscopio de fuerza atómica, para determinar valores de rigidez con un poder de resolución de al menos 1 μm y un circuito integrado programado, en donde el circuito integrado programado está equipado y designado para ejecutar el método de acuerdo con la invención.

Ventajosamente, el método de la invención es más preciso, confiable y más rápido que los métodos del estado de la técnica usados actualmente tales como el perfil de expresión génica o los métodos inmunohistoquímicos.

El valor de rigidez se determina con un microscopio de sonda de exploración siendo un microscopio de fuerza atómica.

El subtipo molecular se selecciona del grupo compuesto por:

- subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado,
- subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado,
- subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado,
- subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado,
- subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado,
- subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado y
- subtipo basal de cáncer de mama metastatizado.

En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado o un subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por encima de un umbral, y en donde el umbral equivale a la frecuencia semimáxima del máximo de una frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa (por ejemplo, si la frecuencia del máximo de frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa es 100, las frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa están por encima de 50).

En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado o un subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia global entre 0,4 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por encima de un umbral, y en donde el umbral equivale a la frecuencia semimáxima del máximo de frecuencia global entre 0,4 kPa y 0,7 kPa (por ejemplo, si la frecuencia del máximo de frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa es 100, las frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa están por encima de 50).

En particular, un subtipo luminal A o luminal B no metastatizado indica un buen pronóstico para el tratamiento, una buena respuesta al tratamiento administrado y ninguna administración de quimioterapia. Adicionalmente, un subtipo luminal A o luminal B de cáncer de mama no metastatizado se caracteriza por un bajo riesgo o probabilidad de recurrencia después de una terapia convencional adecuada.

En particular, un subtipo luminal A no metastatizado puede tratarse con compuestos que modulan la actividad biológica del estrógeno o su receptor, tales como, por ejemplo, tamoxifeno (N.º CAS 10540-29-1), un antagonista del receptor de estrógenos o un inhibidor de la aromatasa tales como letrozol (N.º CAS 112809-51-5) o anastrozol (N.º CAS 120511-73-1), particularmente como terapia adyuvante que acompaña a la cirugía.

En particular, un subtipo luminal B no metastatizado puede tratarse con compuestos que modulan la actividad biológica de la progesterona o su receptor. Entre los ejemplos no limitantes se incluyen progestinas tales como acetato de megestrol (N.º CAS 595-33-5) y acetato de medrohidroprogesterona (N.º CAS 71-59-9), particularmente como terapia adyuvante antes del (neoadyuvante) o acompañante a cirugía.

En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia por encima de 2 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia entre 0,3 kPa y 0,9 kPa y un máximo de frecuencia por encima de 2 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia entre 2,0 kPa y 2,5 kPa. En determinadas realizaciones, se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia entre 0,3 kPa y 0,9 kPa y un máximo de frecuencia entre 2,0 kPa y 2,5 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe máximos de frecuencia entre 0,375 kPa y 0,875 kPa y un máximo de frecuencia por encima de 2 kPa. En determinadas realizaciones, se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe máximos de frecuencia a 0,375 kPa y 0,875 kPa y un máximo de frecuencia entre 2,0 kPa y 2,5 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe máximos de frecuencia entre 0,375 kPa y 0,875 kPa y un máximo de frecuencia en 2,075 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y en 2,075 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia entre 0,3 kPa y 0,9 kPa y un máximo de frecuencia en 2,075 kPa. En particular, dicha muestra de tejido como se describió anteriormente significa un tumor que probablemente se ha diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes o a los ganglios linfáticos axilares.

En particular, un subtipo luminal A metastatizado indica un pronóstico mediocre a pobre y la administración de una quimioterapia, particularmente la administración de compuestos que modulan el efecto del estrógeno como el tamoxifeno (N.º CAS 10540-29-1), un antagonista del receptor de estrógenos o un inhibidor de la aromatasa tales como el letrozol (N.º CAS 112809-51-5) o anastrozol (N.º CAS 120511-73-1), particularmente como terapia adyuvante que acompaña a la cirugía y/o radioterapia. En particular, un subtipo luminal A metastatizado se caracteriza por un alto riesgo o probabilidad de recurrencia después de una terapia convencional adecuada.

En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia por debajo de 0,25 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,1 kPa y 0,25 kPa, particularmente en 0,2 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia por debajo de 0,25 kPa, particularmente entre 0,1 kPa y 0,25 kPa, más particular en 0,2 kPa y una frecuencia máxima entre 1,4 kPa y 1,6 kPa. En particular, dicha muestra de tejido como se describió

anteriormente significa un tumor que probablemente se ha diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes o a los ganglios linfáticos axilares.

5 En particular, un tumor subtipo B luminal metastatizado indica un mal pronóstico y la administración de quimioterapia. En particular, un subtipo luminal B metastatizado se caracteriza por un alto riesgo o probabilidad de recurrencia después de una terapia convencional adecuada. En particular, un subtipo luminal B metastatizado puede tratarse con radioterapia y/o un inhibidor de mTOR, PI3K o IGF-1, particularmente como terapia adyuvante antes de (neoadyuvante) o acompañando radioterapia y/o cirugía.

10 En determinadas realizaciones, se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,25 kPa y 0,4 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa. En determinadas realizaciones, se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia en 0,3 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa. En particular, dicha muestra de tejido como
15 se describió anteriormente significa un tumor que probablemente se ha diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes o a los ganglios linfáticos axilares.

En particular, un tumor subtipo luminal similar a B Her2+ metastatizado indica un mal pronóstico y la administración de una quimioterapia, particularmente la administración de compuestos tales como trastuzumab (también conocido como Herceptina; N.º CAS 180288-69-1). En particular, un subtipo luminal similar a B Her2+ metastatizado se
20 caracteriza por un alto riesgo o probabilidad de recurrencia después de una terapia convencional adecuada. En particular, un subtipo luminal similar a B Her2+ metastatizado puede tratarse con radioterapia, particularmente como terapia adyuvante que acompaña a la cirugía y/o quimioterapia.

25 En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por debajo de un umbral y en donde el umbral equivale a la frecuencia semi-máxima de dicha una frecuencia máxima entre 0,5 kPa y 0,7 kPa (por ejemplo, si la frecuencia de la frecuencia máxima entre 0,5 kPa y 0,7 kPa es 100 las frecuencias en la región entre
30 1,0 kPa y 1,5 kPa está por debajo de 50).

En particular, un subtipo basal no metastatizado indica un mal pronóstico. En particular, un subtipo basal no metastatizado se caracteriza por un bajo riesgo o probabilidad de recurrencia después de una terapia convencional adecuada. En particular, un subtipo basal metastatizado puede tratarse con quimioterapia, particularmente como
35 terapia adyuvante que acompaña a la cirugía o como terapia neoadyuvante antes de la cirugía.

En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y que se caracteriza además por la ausencia de máximos de frecuencia por encima de 1,3 kPa. En determinadas realizaciones, se asigna una alta
40 probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama metastatizado a una muestra que muestra dos frecuencias máximas entre 0,2 kPa y 1,0 kPa y eso se caracteriza además por la ausencia de máximos de frecuencia adicionales por encima de 1,3 kPa. En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia en 0,3 kPa y 0,9 kPa y que se caracteriza además por la ausencia de máximos de frecuencia adicionales por encima de 1,3 kPa. En particular, dicha
45 muestra de tejido como se describió anteriormente significa un tumor que probablemente se ha diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes o a los ganglios linfáticos axilares.

En particular, un subtipo basal metastatizado indica un pronóstico muy pobre. En particular, un subtipo basal metastatizado se caracteriza por un alto riesgo o probabilidad de recurrencia después de una terapia convencional adecuada. En particular, un subtipo basal metastatizado puede tratarse con radioterapia, particularmente como terapia
50 adyuvante que acompaña a la cirugía o quimioterapia. En particular, un subtipo basal metastatizado puede tratarse con quimioterapia, particularmente como terapia neoadyuvante antes de la cirugía.

En determinadas realizaciones, la muestra de tejido es una muestra de biopsia de tejido o un espécimen de resección.

55 En determinadas realizaciones, una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,4 kPa y 2,0 kPa. En particular, dicha muestra de tejido como se describe anteriormente significa un tumor que muy probablemente se ha diseminado al sistema vascular.

60 En determinadas realizaciones, las pluralidades de puntos se determinan con una resolución espacial de al menos 100 µm, 50 µm, 20 µm, 10 µm o 1 µm.

65 En determinadas realizaciones, la muestra de tejido comprende al menos una parte del núcleo del tumor mamario y al menos una parte de la periferia del tumor mamario.

En determinadas realizaciones, la muestra de tejido representa al menos la mitad de la sección transversal del tumor mamario y exhibe una orientación distinta del núcleo a la periferia del tumor mamario.

En determinadas realizaciones, la muestra de biopsia de tejido es una biopsia cilíndrica o prismática.

5

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos está dispuesta dentro de un área o una línea.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se dispone como una cuadrícula de n_1 por n_2 puntos, definiendo la cuadrícula un área, en donde n_1 y n_2 son independientes entre sí números enteros >1 .

10

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos está dispuesta irregularmente dentro de la cuadrícula o dentro del área.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se determina a lo largo de una línea en la superficie de la muestra de tejido, en donde particularmente la línea es paralela al eje longitudinal de la muestra de tejido, particularmente de la muestra de biopsia de tejido, y en donde particularmente los puntos de la pluralidad están distribuidos de manera homogénea o uniforme a lo largo de la línea. En determinadas realizaciones, la línea se extiende por al menos un cuarto, la mitad o tres cuartos del eje longitudinal de la muestra de tejido. En determinadas realizaciones, la línea se extiende sobre el eje longitudinal entero de la muestra de tejido. En determinadas realizaciones, la línea es una línea recta o una línea sinuosa o serpentina. En determinadas realizaciones, la línea tiene un ancho de al menos dos puntos, particularmente 2 a 10 puntos. En determinadas realizaciones, se miden varias líneas de curvas de indentación en toda la muestra (5 mm a 15 mm), que miden entre 5000 y 20'000 curvas de fuerza con una separación de 0,25 μm a 6 μm .

15

20

En determinadas realizaciones, una cuadrícula de 5 por 5 puntos (dando como resultado 25 puntos), 7 por 7 puntos, 10 por 10 puntos, 15 por 15 puntos, 20 por 20 puntos, 50 por 50 puntos o 100 por 100 puntos se miden para un área. En determinadas realizaciones, el área se define de una cuadrícula de 24x24 puntos con un tamaño de 400 μm^2 .

25

En determinadas realizaciones, se determinan los valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de la misma muestra y la distancia entre los centros geométricos de las áreas es de 100 μm a 1 cm. En determinadas realizaciones, la distancia entre los centros geométricos de las áreas es de 1 mm a 5 mm. En algunas realizaciones, la distancia entre los centros geométricos de las áreas es de 5 mm a 10 mm. En algunas realizaciones, la distancia entre los centros geométricos de las áreas es de 10 mm a 100 mm. En algunas realizaciones, la distancia entre los centros geométricos de las áreas es de 100 mm a 500 mm. En determinadas realizaciones, se determinan los valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de la misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de las áreas es de 100 μm a 1 mm.

30

35

En determinadas realizaciones, se determinan los valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de la misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de las áreas un múltiplo de la resolución espacial, siendo dicho múltiplo al menos 10 veces la resolución espacial. En determinadas realizaciones, el múltiplo es 20, 30 o 50.

40

En determinadas realizaciones, las áreas de la muestra de tejido se colocan en la superficie de la muestra a lo largo del eje longitudinal de la muestra en una distancia de 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 15 mm o 20 mm.

45

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 50 a 21000. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 100 a 21000. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 400 a 21000. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 900 a 10000. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 1000 a 8100. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 1600 a 6400. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 2500 a 4900. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 3600 a 4900. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos comprende 50, 100, 400, 900, 1000, 1600, 2500, 3600, 4900, 6400, 8100, 10000 o 21000 valores de rigidez.

50

55

En determinadas realizaciones, la muestra de biopsia de tejido es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 7 μm . En determinadas realizaciones, la muestra de tejido de biopsia es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 0,5 mm.

60

En determinadas realizaciones, los valores de rigidez se determinan en condiciones fisiológicas.

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra en 6 minutos a 6 horas.

65

En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra en un intervalo de tasas de 1000 ciclos de carga por segundo a 0,1 ciclos de carga por segundo. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra en

un intervalo de tasas de 1000 ciclos de carga por segundo a 100 ciclos de carga por segundo. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra en un intervalo de tasas de 100 ciclos de carga por segundo a 10 ciclos de carga por segundo. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra en un intervalo de tasas de 10 ciclos de carga por segundo a 0,1 ciclos de carga por segundo.

5 En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra con cargas máximas que van desde 200 pN a 3 mN, particularmente de 0,2 nN a 20 nN.

10 En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra usando un penetrador o muestreador que varían en rigidez de 2 mN/m a 20 N/m. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra usando un penetrador o muestreador que varían en rigidez de 2 mN/m a 200 mN/m. En determinadas realizaciones, la pluralidad de puntos se registra usando un penetrador o muestreador que varían en rigidez de 200 mN/m a 2 N/m.

15 En determinadas realizaciones, el método de la invención comprende además la determinación, particularmente detección o cuantificación, de un marcador sobre o comprendido dentro de la muestra de tejido, en donde el marcador de superficie se selecciona del grupo comprendido por

- receptor de estrógeno humano (marcador de superficie, UniProt. P03372);
- receptor de progesterona humano (marcador de superficie, UniProt. P06401);
- 20 - receptor *HER2/neu* (marcador de superficie, UniProt. P0426) y
- antígeno Ki-67.

De acuerdo con la invención, se proporciona un sistema para clasificar una muestra de tejido obtenida de carcinoma mamario. El sistema comprende

- 25
- un microscopio de fuerza atómica para determinar los valores de rigidez con un poder de resolución de al menos 1 μm (1 μm o menos) en términos de resolución espacial,
 - un circuito integrado programado,

30 en donde el circuito integrado programado está equipado y designado o configurado para ejecutar el método de la invención.

En determinadas realizaciones, el circuito integrado programado está comprendido dentro o es un microprocesador programado que está equipado y designado o configurado para ejecutar el método de la invención.

35 Otros aspectos de la divulgación

De acuerdo con un aspecto de la divulgación, se proporciona un método para clasificar una muestra de tejido obtenida de un tumor mamario, en donde el método comprende determinar un valor de rigidez para cada uno de una pluralidad de puntos en la muestra de tejido, dando como resultado una distribución de rigidez y asignando la muestra a un subtipo molecular de cáncer de mama basado en la distribución de rigidez determinada, en donde las clases del esquema de clasificación son:

- 45
- subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado,
 - subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado,
 - subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado,
 - subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado,
 - subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado,
 - subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado y/o
 - 50 - subtipo basal de cáncer de mama metastatizado,

en donde

- 55
- una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado o un subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por encima de un umbral, y en donde el umbral equivale a la frecuencia semimáxima del máximo de dicha una frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa,
 - una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia por encima de 2 kPa,
 - 60 - una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia por debajo de 0,25 kPa,
 - se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,25 kPa y 0,4 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa,
 - 65 - una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que

exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde las frecuencias están por debajo de un umbral, y en donde el umbral equivale a la frecuencia semi-máxima de dicho un máximo de frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa,

- una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y que se caracteriza además por la ausencia de máximos de frecuencia por encima de 1,3 kPa, y/o
- una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,4 kPa y 2,0 kPa.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, el valor de rigidez se determina con un nanoindentador.

De acuerdo con otro aspecto de la divulgación, se proporciona un sistema para clasificar una muestra de tejido obtenida de carcinoma mamario. El sistema comprende

- un microscopio de fuerza atómica para determinar valores de rigidez con un poder de resolución de al menos 1 kPa (1 kPa o menos) en términos de valores de rigidez y valores de dureza correspondientes,
- un circuito integrado programado,

en donde el circuito integrado programado está equipado y designado o configurado para ejecutar el método de la invención.

De acuerdo con un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para tratar el cáncer de mama, en donde el método comprende,

- proporcionar una muestra de tejido de un tumor mamario de un sujeto,
- asignar la muestra de tejido a un subtipo de cáncer de mama mediante el método de la invención,
- administrar un tratamiento al sujeto basado en el subtipo determinado.

De esta manera, puede administrarse una terapia hormonal o endocrina al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado o subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado.

Adicionalmente, en el método para tratar el cáncer de mama, un compuesto que modula el efecto del estrógeno o su receptor puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario haya sido clasificado como subtipo luminal A no metastatizado de cáncer de mama, en donde particularmente el compuesto es un antagonista del receptor de estrógeno, tal, como, por ejemplo, tamoxifeno (N.º CAS 10540-29-1) o un inhibidor de aromatasas tales como, por ejemplo, letrozol (N.º CAS 112809-51-5) o anastrozol (N.º CAS 120511-73-1).

En el método para tratar el cáncer de mama, un compuesto que modula el efecto de la progesterona o su receptor puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario haya sido clasificado como subtipo luminal B no metastatizado de cáncer de mama, en donde particularmente el compuesto es progestina tales como, por ejemplo acetato de megestrol (N.º CAS 595-33-5) o acetato de medrohidro-progesterona (N.º CAS 71-59-9).

En el método para tratar el cáncer de mama, puede administrarse quimioterapia al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como cáncer de mama basal metastatizado o no metastatizado, particularmente como terapia adyuvante que acompaña a la cirugía, particularmente antes (neoadyuvante) o después de la cirugía. En particular, dicha quimioterapia es beneficiosa para reducir el riesgo de recurrencia del cáncer de mama en el sujeto.

En el método para tratar el cáncer de mama, quimioterapia, particularmente como terapia adyuvante en combinación con terapia hormonal y/o cirugía, puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado o subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado. En particular, dicha quimioterapia es beneficiosa para reducir el riesgo de recurrencia del cáncer de mama en el sujeto.

En el método para tratar el cáncer de mama, la radioterapia puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado, subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado, subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado o subtipo basal de cáncer de mama metastatizado, particularmente como terapia adyuvante que acompaña a la cirugía, particularmente antes o después de la cirugía. En particular, dicha radioterapia es beneficiosa para reducir el riesgo de recurrencia del cáncer de mama en el sujeto.

En el método para tratar el cáncer de mama, trastuzumab (también conocido como Herceptina; N.º CAS 180288-69-1) la radioterapia puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado, particularmente en combinación con radioterapia y/o cirugía.

En el método para tratar el cáncer de mama, un inhibidor de mTOR (como por ejemplo, rapamicina) o PI3K

(fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 quinasa o IGFR-1 (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1) puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado, particularmente en combinación con radioterapia y/o cirugía.

5 En el método para tratar el cáncer de mama, un inhibidor de mTOR (como por ejemplo, rapamicina) o PI3K (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 quinasa o IGFR-1 (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1) puede administrarse al sujeto en caso de que el tumor mamario se haya clasificado como subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado, particularmente en combinación con radioterapia, terapia hormonal y/o cirugía.

10 Dondequiera que las alternativas para características separables individuales se exponen en el presente documento como "realizaciones", debe entenderse que tales alternativas pueden combinarse libremente para formar realizaciones discretas de la invención desvelada en el presente documento.

15 La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de los cuales pueden extraerse aspectos y ventajas adicionales. Estos ejemplos pretenden ilustrar la divulgación, pero no limitar el alcance de la invención.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de tumores mamarios (muestras de biopsia) de pacientes con NO basal (n = 1) y N+ (n = 2). Los pacientes con NO muestran un pico de cáncer muy distinto a 0,625 kPa, mientras que los pacientes con N+ alcanzan un pico en 0,525 kPa pero con una distribución de rigidez mucho más amplia. Además, los pacientes con NO tienen componentes más rígidos que los pacientes con N+. NO significa pN0 en clasificación TNM, lo que significa que el tumor primario no ha progresado en implicar a los ganglios linfáticos regionales. N+ significa pN1 o superior en clasificación TNM, lo que significa que el tumor primario ha progresado en implicar a los ganglios linfáticos regionales.

30 La Figura 2 muestra histogramas normalizados (misma área) que representan el perfil nanomecánico de tumores mamarios (muestras de biopsia) de NO Luminal A (n = 5) y N+ Luminal A (n = 3). Los pacientes con LumA N+ muestran una distribución de rigidez más heterogénea que los pacientes con Lum NO. Los pacientes con LumA NO muestran picos prominentes de 0,575 kPa y 1,425 kPa donde los pacientes con N+ carecen de estos picos. Por el contrario, los pacientes N+ muestran fuertes señales a 0,375 kPa, 0,875 kPa y 2,075 kPa que no son dominantes en pacientes con NO. En la región del cáncer por debajo de 1 kPa, LumA NO es más homogéneo (1 pico en 0,575 kPa) que LumA N+ (2 picos, 0,375 kPa y 0,875 kPa).

40 La Figura 3 muestra histogramas normalizados (misma área) que representan el perfil nanomecánico de tumores mamarios (muestras de biopsia) de LumB NO (n = 5) y LumB N+ (n = 7). LumB NO muestra una distribución de rigidez más heterogénea que los pacientes con N+, hay una mayor contribución en la parte rígida por encima de 2 kPa. La parte blanda de LumB N+ es significativamente más suave que la parte blanda de LumB NO.

45 La Figura 4 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores mamarios (muestras de biopsia) de NO: Pacientes Luminal A (n = 5), Luminal B (n = 5) y Basal (n = 1).

50 La Figura 5 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores primarios (muestras de biopsia) de pacientes con NO LumA (n = 5) y LumB (n = 5). Los dos histogramas son muy similares, en ambos casos, el área del cáncer alcanza un máximo de 0,575 kPa pero los picos no son muy distintos, la distribución es muy amplia.

La Figura 6 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores mamarios (muestras de biopsia) de N+: Pacientes Basal (n=2), Luminal A (n=3) and Luminal B (n=7).

55 La Figura 7 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores mamarios (muestras de biopsia) de pacientes con N+ LumA (n=3) y LumB (n=7). Dentro de los pacientes con N+, los pacientes con LumA muestran una distribución más heterogénea que los pacientes con LumB. El área del cáncer en pacientes con LumB es mucho más suave que en pacientes con LumA, con un pico amplio alrededor de 0,2 kPa, mientras que la parte LumA es bimodal con picos en 0,375 kPa y 0,875 kPa.

60 La Figura 8 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores mamarios (muestras de biopsia) de N+: pacientes Luminal B (n = 7) y Her2+ similar a Luminal B (n = 2) pacientes. Generalmente, la distribución por debajo de 2 kPa es más rígida en pacientes similares a LumB que en pacientes LumB (Her2-). El área del cáncer en LumB (Her2-) alcanza un máximo en 0,2 kPa, en el caso de similar a LumB (Her2+) tiene un pico ligeramente más rígido alrededor de 0,3 kPa.

La Figura 9 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los ganglios linfáticos invadidos o con cáncer (N+) (muestras de biopsia). Los ganglios linfáticos positivos de células cancerosas (N+) tienen un fuerte, pico blando alrededor de 0,4 kPa.

La figura 10 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores mamarios (muestras de biopsia) de LumB N0; paciente V0 (n = 3) frente a V1 (n = 1). V1: Las características de diagnóstico muestran invasión en el sistema vascular, pero no hay signos de metástasis a distancia presentes (en el momento de la operación). La muestra V1 muestra un pico suave adicional distinto alrededor de 0,3 kPa.

La Figura 11 muestra una visión general de las características de ciertos subtipos moleculares de cáncer de mama.

Ejemplos:

La tecnología ARTIDIS ("*Diagnóstico de tejidos confiable y automatizado*"; documento US 8,756,711 B2, documento US 2,014,338,073 A1, documento WO 2,014,090,971 A1, documento WO 2,015,001,119 A1, documento WO 2015018865 A1) se optimizó para el análisis y la subtipificación de muestras de cáncer de mama humano no fijado (medido en ambiente acuoso fisiológico o tejido congelado) obtenido mediante resecciones tumorales o biopsias. Durando ~ 2 horas, un ensayo ARTIDIS utiliza un lápiz afilado o punta de -10 nm que produce ~ 10.000 minúsculas hendiduras en una superficie de biopsia.

Para este fin, se recogieron muestras de tejido de carcinoma mamario de diversos subtipos y etapas mediante biopsia o resección de 26 pacientes. Normalmente, las muestras de biopsia recogidas tenían una forma cilíndrica de 0,5 cm a 1,5 cm de longitud y de 1 mm a 2 mm de diámetro. 10 a 20 mapas se miden equidistantemente en la muestra, dando lugar a espaciamentos que van desde 250 μm a 1500 μm . El tamaño del mapa varía de 20x20 μm a 40x40 μm y generalmente contiene 1024 puntos de medida. Por lo tanto, se toman 10x1024 a 20x1024 mediciones en un espécimen.

Las resecciones fueron generalmente de 5 x 5 mm de ancho y largo y con 4 x 4 mapas dando lugar a un espacio de 1 mm en promedio.

Las mediciones nanomecánicas de las muestras se realizaron como se describe en el documento US 8.756.711 B2. En resumen, cada muestra se examinó de manera sistemática distribuyendo homogéneamente mapas FV sobre toda la superficie de la muestra para tener en cuenta las posibles heterogeneidades. Se mantuvo una distancia regular de aproximadamente 500 μm entre la exploración usando tornillos micrométricos o sistemas de posicionamiento automatizados. Esto dio como resultado aproximadamente 10 a 15 mapas FV por espécimen dependiendo del tamaño total de la biopsia.

Para el análisis de las muestras por AFM, las biopsias se pegaron en una placa de cultivo usando pegamento epoxi de 2 componentes y 5 minutos de secado rápido. Después de una etapa de secado previo de 2 minutos (para evitar mezclar el epoxi y el tampón de muestra), la muestra se colocó plana sobre el pegamento para optimizar el ángulo de indentación y evitar la influencia de componentes externos (por ejemplo, el soporte en voladizo). Las puntas de pipeta que actúan como "rampas" se colocaron directamente debajo de segmentos desiguales de cada muestra para mantener la consistencia de la altura. El uso de fuerza excesiva (por ejemplo, desgarro o estiramiento) se minimizó en todo momento durante el manejo del espécimen. Todos los pasos preparatorios se realizaron en un ambiente de tampón estéril suplementado con inhibidores de proteasa o tampón de trasplante para evitar la contaminación y asegurar que el espécimen permaneciera en un estado cercano a in vivo. Las muestras montadas se mantuvieron en solución de Ringer helada o Custodiol hasta que se realicen pruebas nanomecánicas, que se realizó a temperatura ambiente o a 37 °C.

Para puntas piramidales afiladas (voladizos de nitruro de silicio de 205 μm de largo, constante de resorte en voladizo nominal $k = 0,06 \text{ N m}^{-1}$, frecuencia de resonancia [aire] = 18 kHz), la constante de resorte exacta k del voladizo se determinó antes de cada experimento con el método de sintonización térmica, mientras que la sensibilidad a la deflexión se determinó en fluido utilizando sustratos de vidrio sólido como material de referencia infinitamente rígido.

Las medidas de rigidez de contacto (módulo elástico, E) de biopsias se obtuvieron de la siguiente manera; las curvas de desplazamiento de carga, también designado como curvas de indentación de fuerza, se registraron en un sitio dado de manera orientada durante la carga y descarga. Se mantuvo una distancia regular de aproximadamente 500 μm entre las regiones de exploración usando tornillos micrométricos o sistemas de posicionamiento automatizados. Un conjunto individual de datos constaba de 1.024 curvas de desplazamiento de carga, a una velocidad de indentación de 16 $\mu\text{m/s}$. Esto dio como resultado aproximadamente 15 a 20 mapas de volumen de fuerza por muestra. Cuando sea posible, los mapas de fuerza-volumen (FV) se realizaron sobre una cuadrícula de puntos de 32x32 con un tamaño de exploración de 20x20 μm a una velocidad de aprox. 1 ciclos de carga y descarga por segundo. Cada curva de carga-desplazamiento consistió en al menos 512 puntos de datos, mientras que la longitud Z se ajustó a 5 μm a 8 μm dependiendo de las propiedades de la región analizada. Cada mapa FV se estableció en 20 x 20 μm^2 para (i) optimizar

el tiempo experimental así como (ii) para proporcionar un área suficientemente grande que incorpore todos los componentes dentro del tejido (por ejemplo, células y matriz extracelular). La fuerza de carga máxima aplicada se ajustó a 1,8 nN y una profundidad de sangría de aproximadamente 150 a 3000 nm. Se obtuvieron mapas adicionales de 72 x 72 FV (5184 curvas de desplazamiento de fuerza por mapa y un tamaño de píxel de 277 nm) para aumentar la resolución espacial sobre áreas clave de interés.

Las curvas de indentación de fuerza se analizaron utilizando un método descrito anteriormente (Loparic, et al., Biophysical Journal, 98(11): p. 2731-40, 2010, Plodinec, et al., Journal of Structural Biology, 174(3): p. 476-484, 2011). En resumen, el software fue desarrollado en LabVIEW (National Instrument, EE.UU.) para el análisis automatizado de los datos de FV. Se determinó el punto de contacto. Se obtuvieron curvas de fuerza que se transformaron del desplazamiento piezoeléctrico a la distancia punta-muestra, que explica la flexión del voladizo y multiplicando la desviación del voladizo d con la constante de resorte k para obtener la carga F . Las curvas de fuerza de descarga se analizaron realizando un ajuste lineal al 50 % superior de la curva de fuerza, que define la rigidez entre la carga máxima $F = 1,8$ nN y una carga de 0,9 nN. Este procedimiento podría evitar efectos extraños en la curva de fuerza tales como la adhesión. La relación de Poisson se estableció en 0,5. El módulo de Young se determinó de acuerdo con el método de Oliver y Pharr (Oliver et al., Journal of Materials Research, 7(6), 1564-1583, 1992). Los valores de rigidez se trazaron espacialmente, analizado y visualizado en ARTIDIS OFFLINE SOFTWARE.

Normalmente, Se midieron curvas de fuerza de 10.000 a 20.000 por muestra, que se distribuyeron en mapas de fuerza de 1000 curvas de fuerza de manera homogénea en toda la muestra.

Los datos presentados en este documento demuestran la aplicabilidad del perfil nanomecánico utilizando ARTIDIS en clínicas para:

- 1) Pronóstico de progresión y recurrencia del cáncer
- 2) Predicción de la respuesta al tratamiento
- 3) Decidir el tratamiento apropiado y el régimen de seguimiento basado en el perfil nanomecánico del tumor mamario.

El método de perfil nanomecánico de la invención es ideal para su uso en la práctica diaria, ya que permite una rápida evaluación *in situ* de la muestra y no sufre de variabilidad entre observadores como, por ejemplo, otros marcadores, tales como Ki-6.

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar una muestra de tejido obtenida de un tumor mamario, comprendiendo dicho método

- 5 - determinar un valor de rigidez para cada uno de una pluralidad de puntos en dicha muestra de tejido usando un microscopio de fuerza atómica, dando como resultado una distribución de rigidez, y
 - asignar dicha muestra a uno de los siguientes subtipos moleculares de cáncer de mama basado en dicha distribución de rigidez:

- 10 • subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado,
 • subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado,
 • subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado,
 • subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado,
 • subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado,
 • subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado y
 • subtipo basal de cáncer de mama metastatizado.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

- 20 - una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama no metastatizado o un subtipo luminal B de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde dichas frecuencias están por encima de un umbral, y en donde dicho umbral equivale a la frecuencia semi-máxima del máximo de dicha una frecuencia entre 0,4 kPa y 0,7 kPa,
 25 - una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia por encima de 2 kPa,
 - una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia por debajo de 0,25 kPa,
 - se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,25 kPa y 0,4 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa,
 30 - una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama no metastatizado se asigna a una muestra que exhibe solo un máximo de frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa en la región debajo de 1 kPa y frecuencias en la región entre 1,0 kPa y 1,5 kPa, en donde dichas frecuencias están por debajo de un umbral, y en donde dicho umbral equivale a la frecuencia semi-máxima del máximo de dicha una frecuencia entre 0,5 kPa y 0,7 kPa,
 35 - una alta probabilidad de ser un subtipo basal de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y que **se caracteriza** además por la ausencia de máximos de frecuencia por encima de 1,3 kPa, y/o
 - una alta probabilidad de ser un subtipo luminal B de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe dos máximos de frecuencia por debajo de 1 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,4 kPa y 2,0 kPa.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia entre 0,3 kPa y 0,9 kPa y un máximo de frecuencia entre 2,0 kPa y 2,5 kPa.

- 45 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una alta probabilidad de ser un subtipo luminal A de cáncer de mama metastatizado se asigna a una muestra que exhibe máximos de frecuencia a 0,375 kPa, 0,875 kPa y 2,075 kPa.

- 50 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se asigna una alta probabilidad de ser un subtipo luminal similar a B Her2+ de cáncer de mama metastatizado a una muestra que exhibe un máximo de frecuencia en 0,3 kPa y un máximo de frecuencia entre 1,7 kPa y 2,0 kPa.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dichas pluralidades de puntos se determinan con una resolución espacial de al menos 100 µm.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha muestra de tejido es una muestra de biopsia de tejido o una muestra de resección.

- 60 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha pluralidad de puntos está dispuesta con un área o una línea.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, por lo que se determinan dichos valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de dicha misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de dichas áreas está en el intervalo de 100 µm a 1 mm.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha línea se extiende a lo largo del eje longitudinal de dicha muestra de tejido.
- 5 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha pluralidad de puntos comprende valores de rigidez en el intervalo de 50 a 210000.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha pluralidad de puntos se registra en un intervalo de tasas de 1000 ciclos de carga por segundo a 0,1 ciclos de carga por segundo.
- 10 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha pluralidad de puntos se registra con cargas máximas que van desde 200 pN a 3 mN.
14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar un marcador en o comprendido dentro de dicha muestra de tejido, en donde dicho marcador se selecciona del receptor de estrógeno humano, el receptor de progesterona humana, el receptor *HER2/neu* y el antígeno Ki-67.
- 15 15. Un sistema para clasificar una muestra de tejido obtenida de carcinoma mamario, que comprende
- 20 - un microscopio de fuerza atómica, para determinar los valores de rigidez con un poder de resolución de al menos 1 μm ,
- un circuito integrado programado,
- en donde
- 25 dicho circuito integrado programado está equipado y designado para ejecutar un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 14.

Fig. 1

Basal: N0 frente a N+

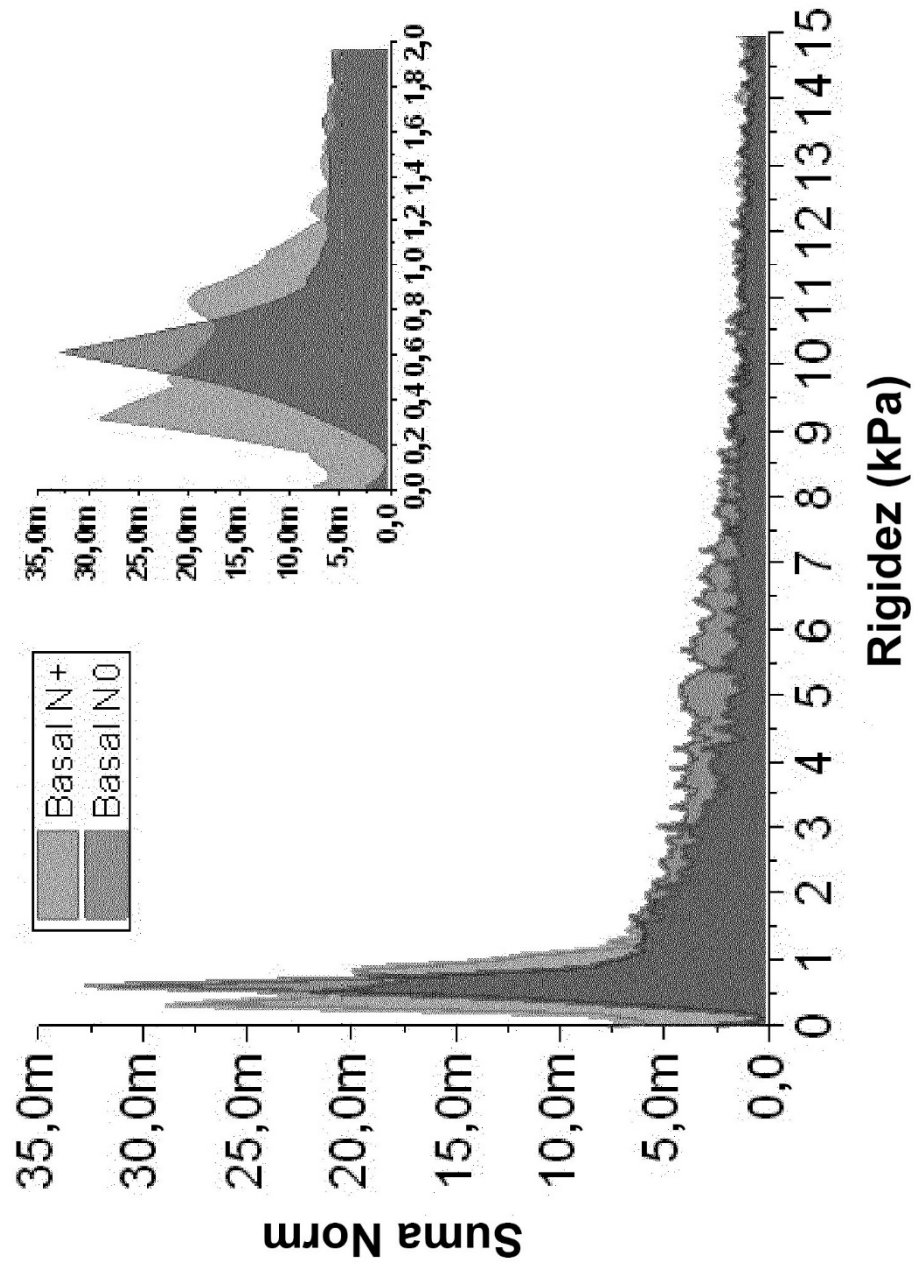


Fig. 2

LumA: N0 frente a N+

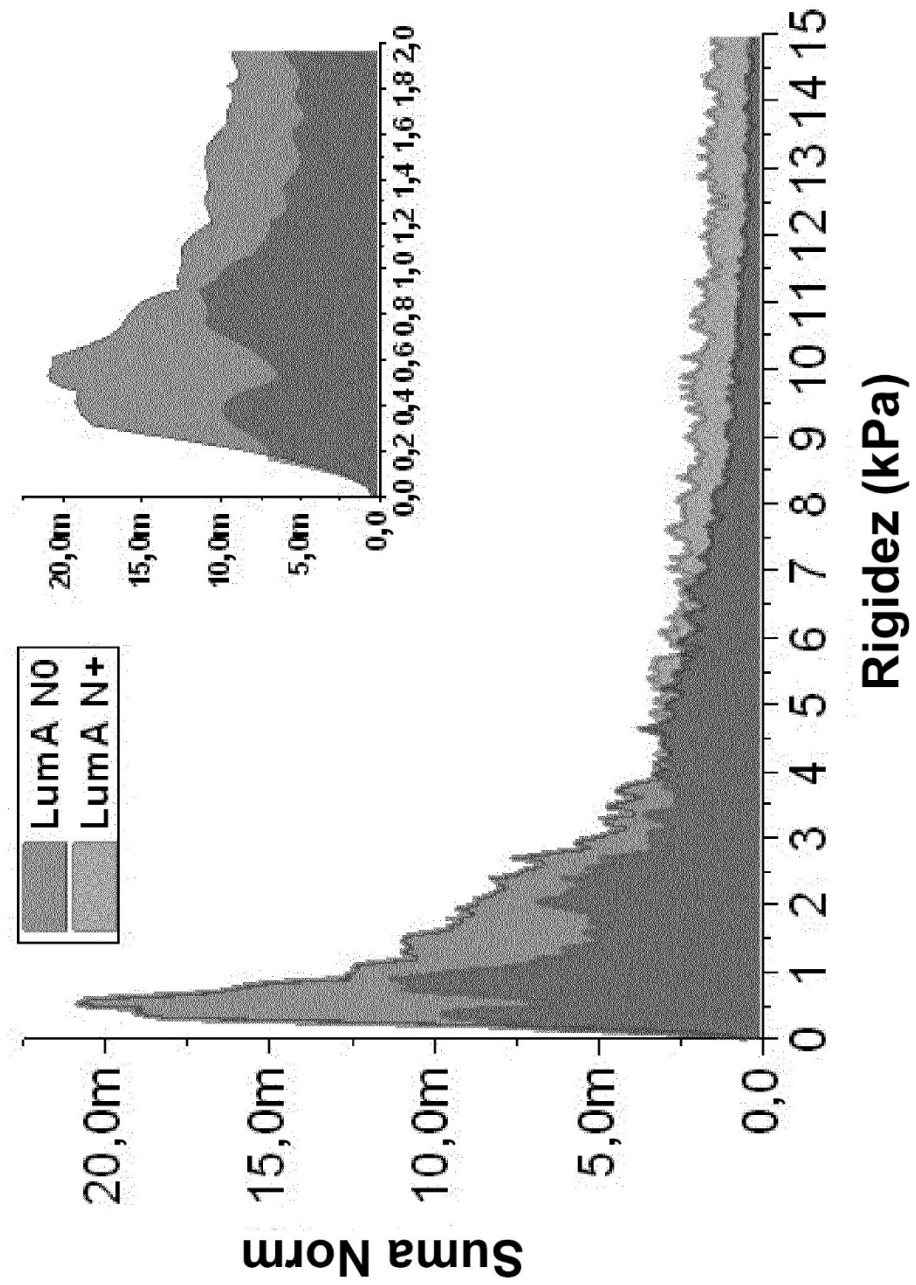


Fig. 3

LumB: N0 frente a N+

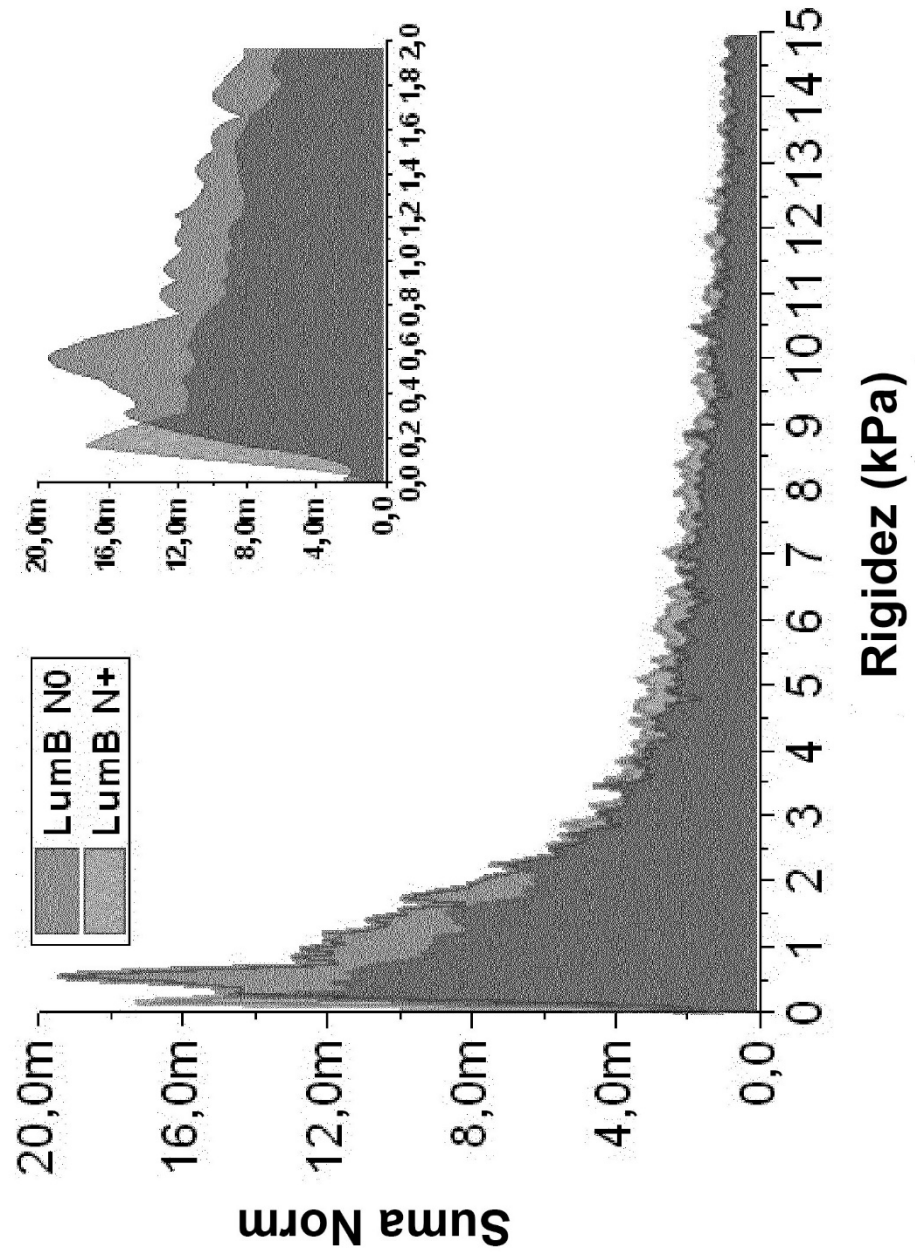


Fig. 4

NO: All

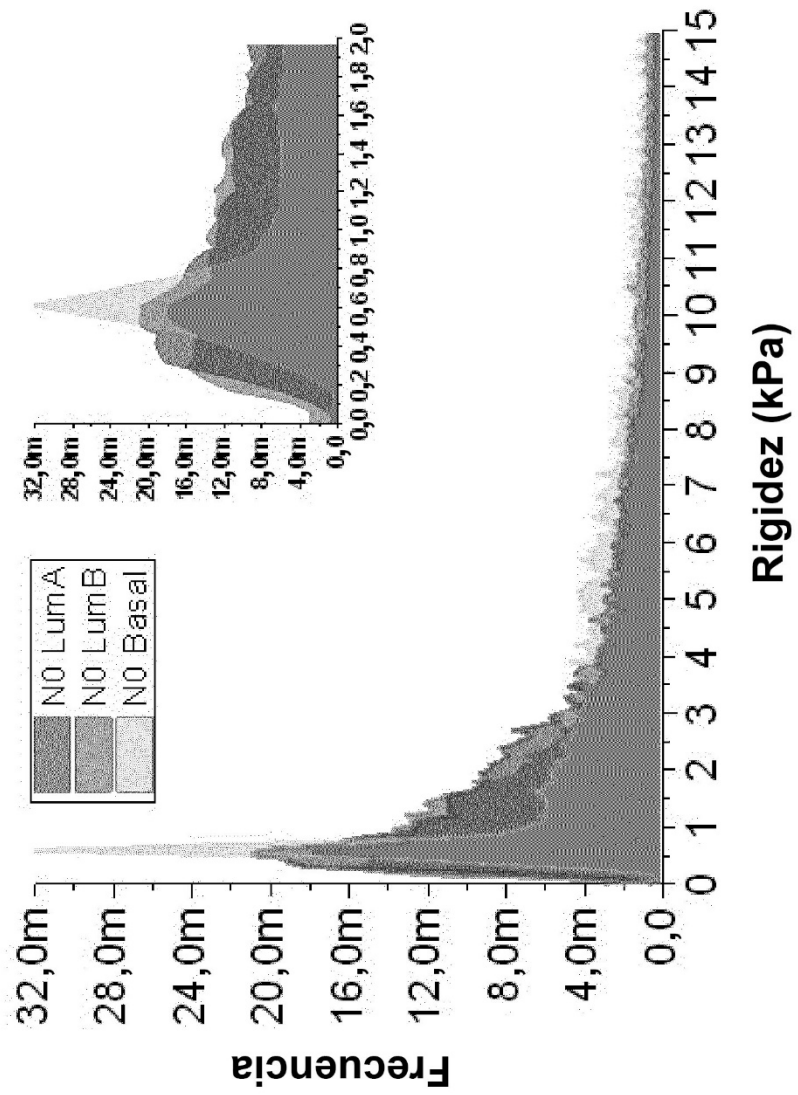


Fig. 5

N0: LumA frente a LumB

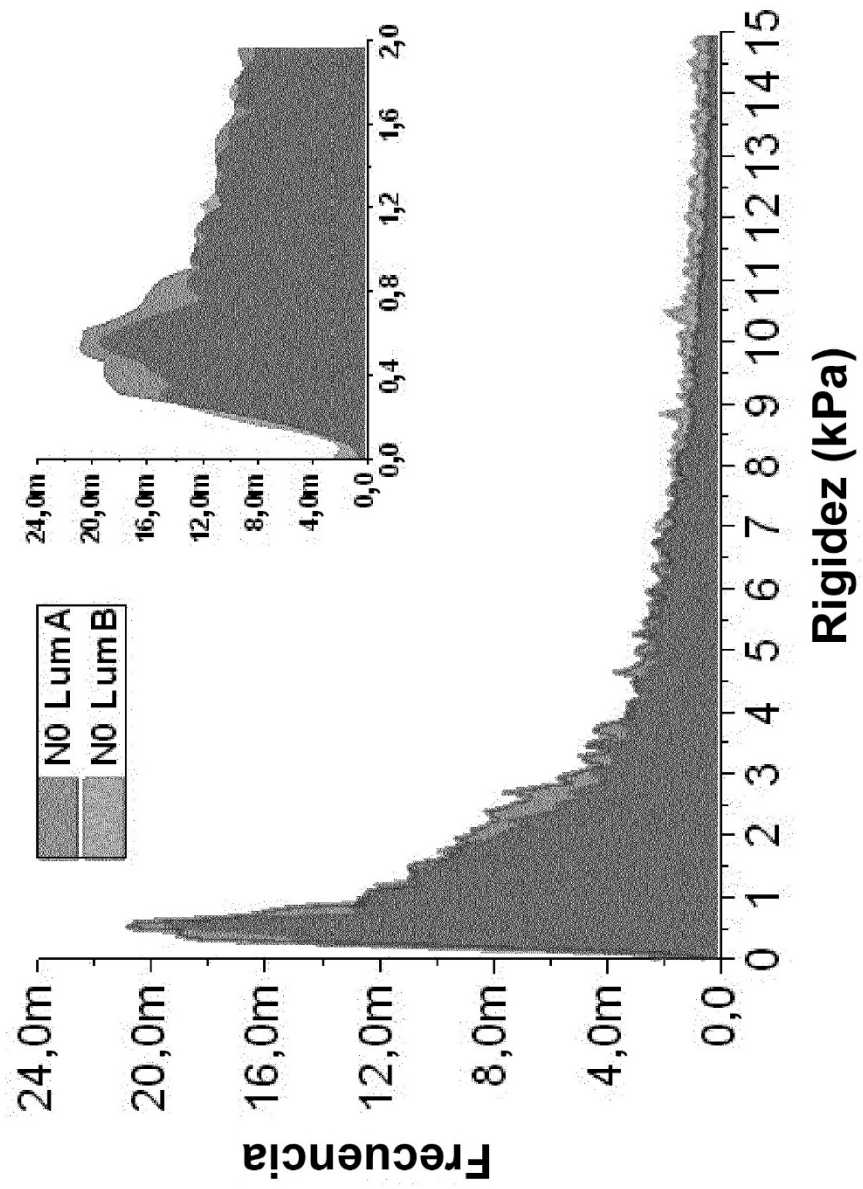


Fig. 6

N+: All

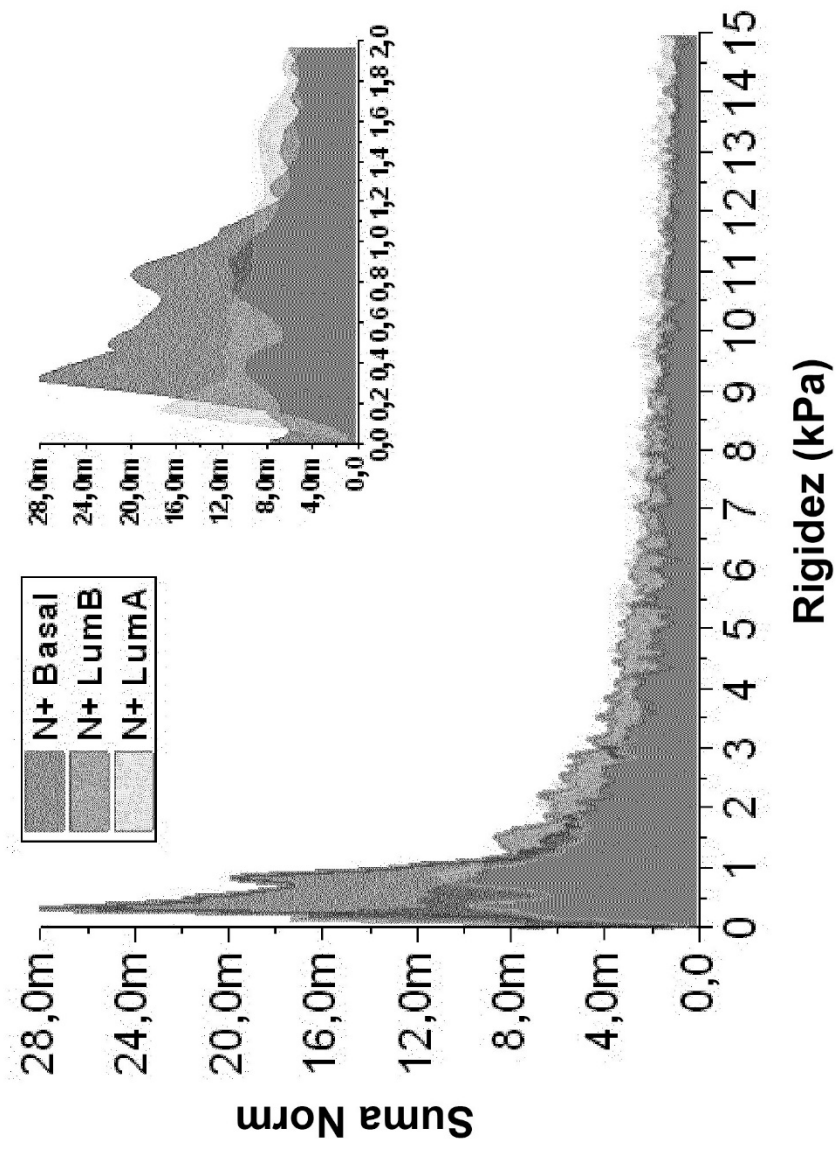


Fig. 7

N+: LumA frente a LumB

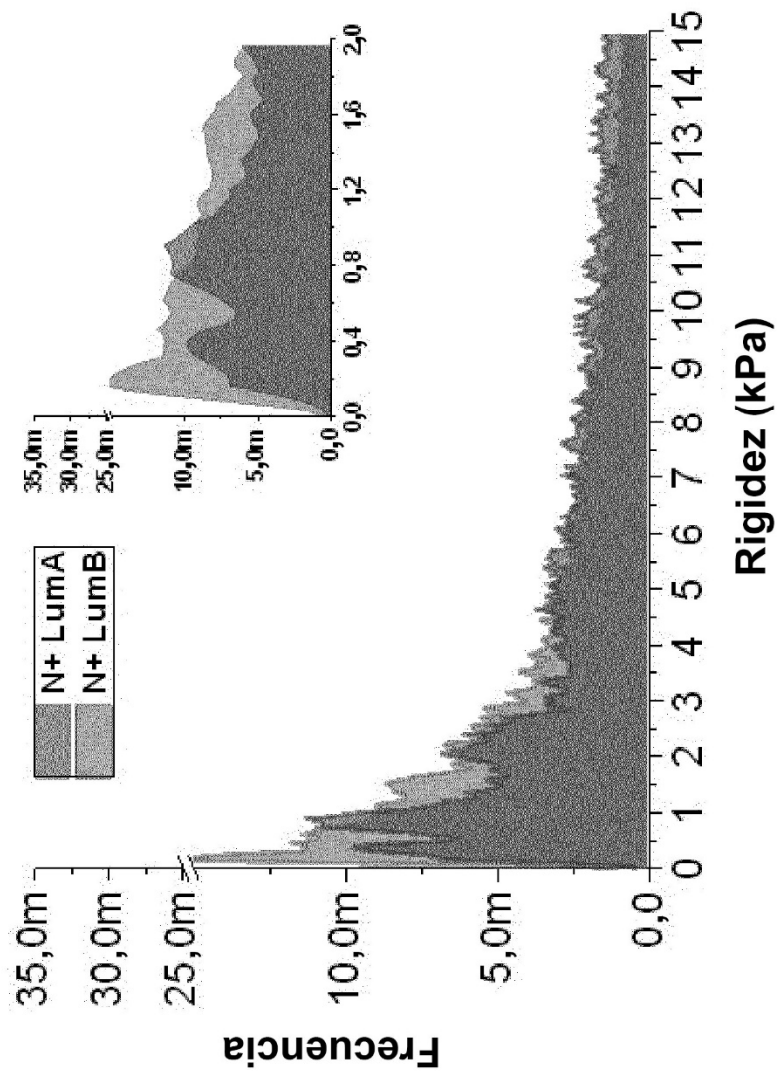


Fig. 8

N+: LumB frente a similar a LumB

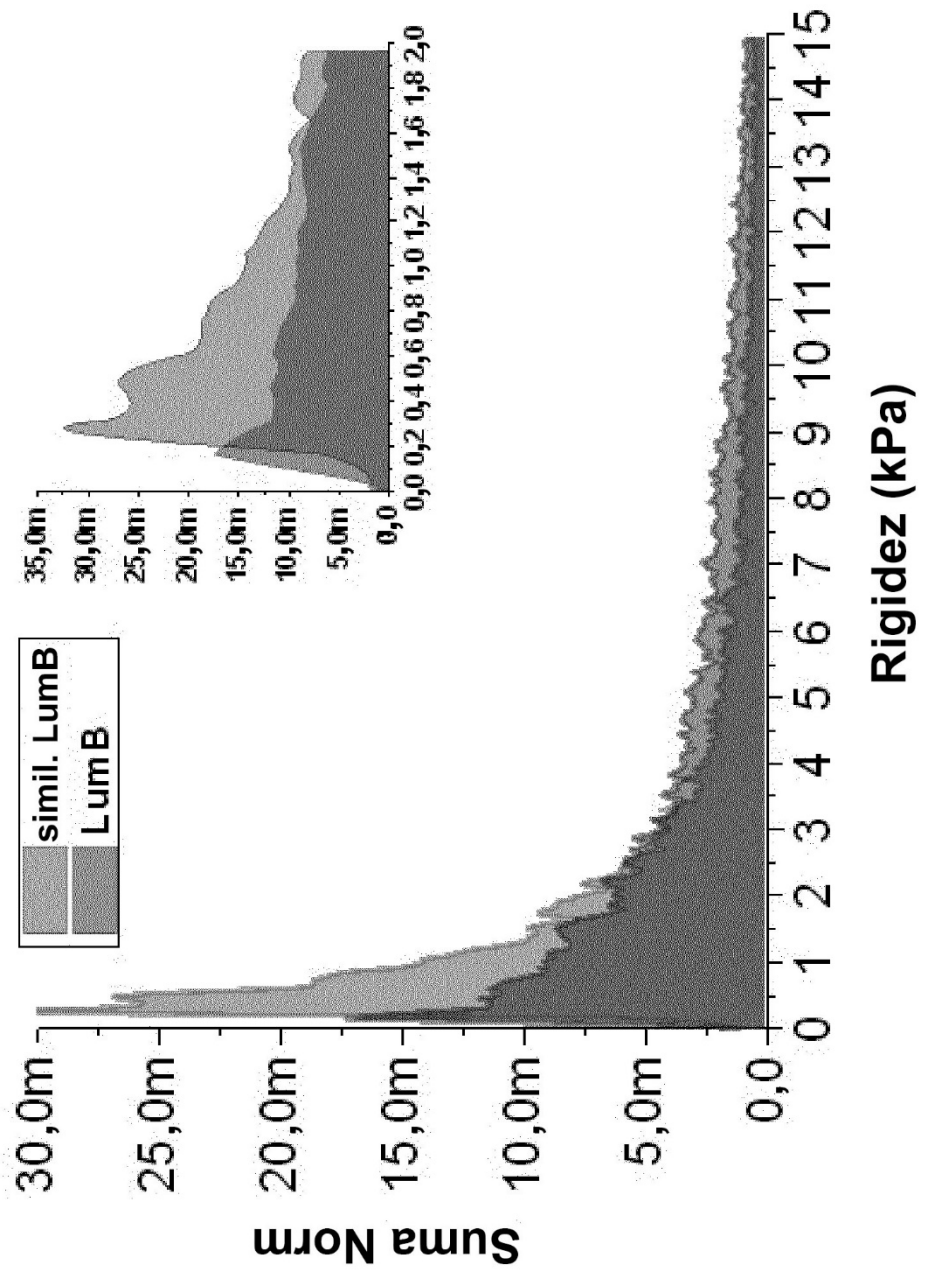


Fig. 9

Ganglio linfático canceroso

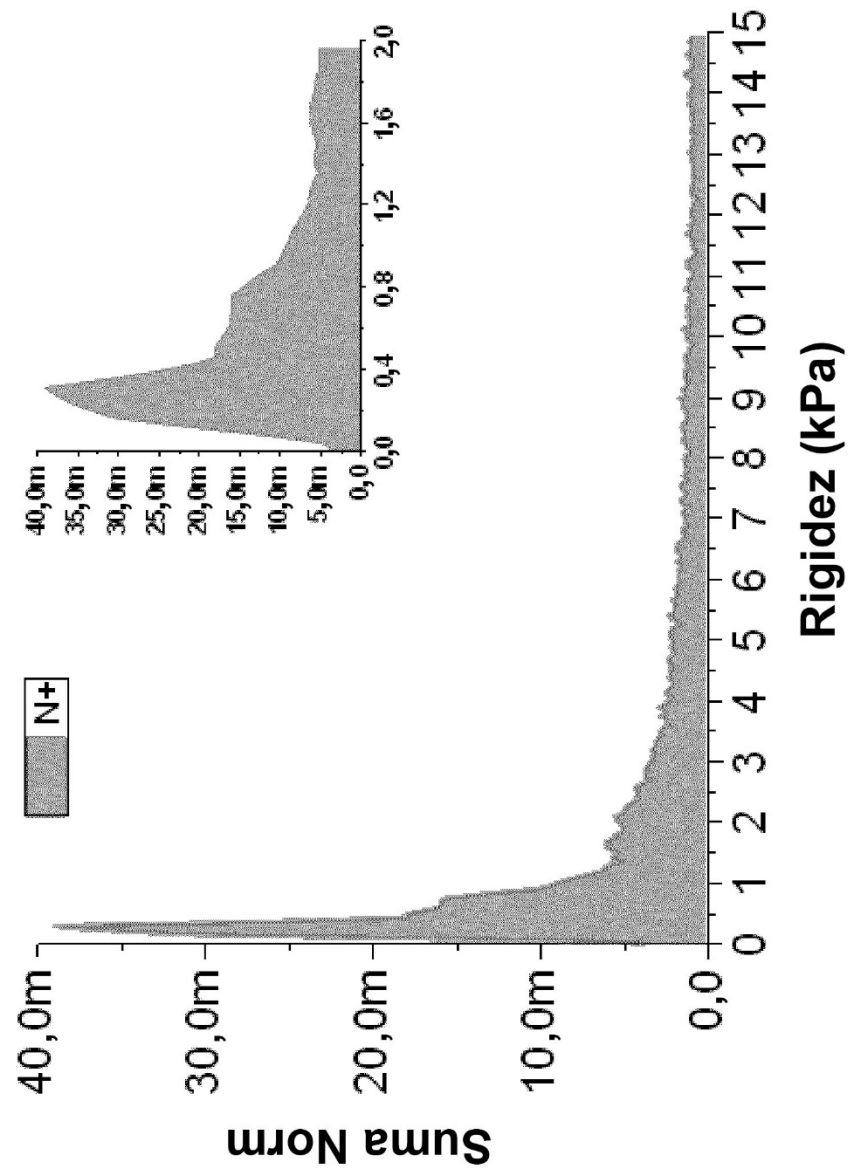


Fig. 10

N0 LumB: V0 frente a V1

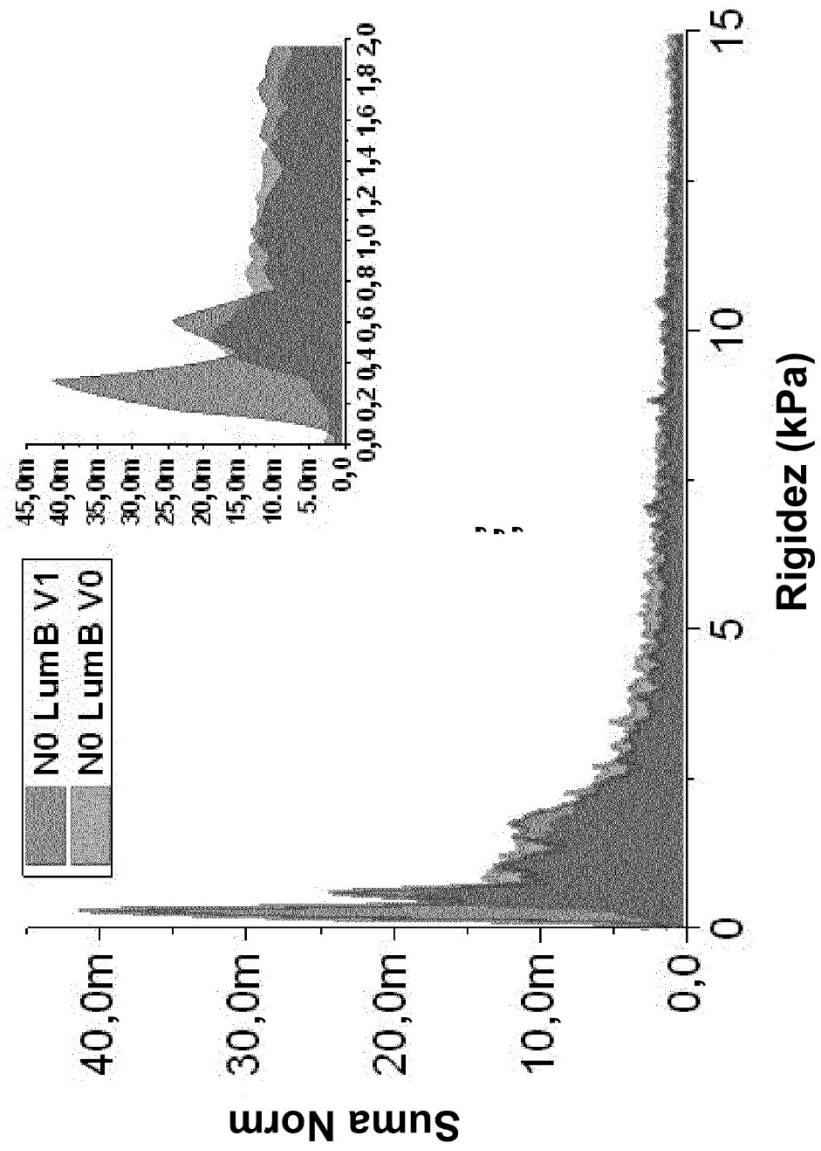


Fig. 11

Diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama

- **Luminal A:** Estrógeno positivo, Progesterona $\geq 20\%$, Ki-67 $< 20\%$
- **Luminal B:** Estrógeno positivo y bien Progesterona $< 20\%$ o Ki-67 $\geq 20\%$
- **Luminal similar a B:** Estrógeno positivo, Her2 positivo
- **Her2:** Estrógeno negativo, Her2 positivo
- **Basal:** Estrógeno, Progesterona y Her2 negativo