

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 869 866**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2015** **PCT/US2015/051899**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016** **WO16049291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2015** **E 15844912 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021** **EP 3198278**

54 Título: **Diagnóstico mediante células tumorales circulantes para la identificación de la resistencia a las terapias selectivas del receptor de andrógenos**

30 Prioridad:

25.09.2014 US 201462055491 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2021

73 Titular/es:

EPIC SCIENCES, INC. (100.0%)
9381 Judicial Drive, Suite 200
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

DITAMORE, RYAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 869 866 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

Diagnóstico mediante células tumorales circulantes para la identificación de la resistencia a las terapias selectivas del receptor de andrógenos

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. de nº de serie 62/055.491, presentada el 25 de septiembre de 2014.

La invención se refiere en general al campo del diagnóstico del cáncer y, de manera más específica, a métodos para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm.

Antecedentes

El cáncer de próstata (CP) sigue siendo el cáncer no cutáneo más habitual en los EE.UU. Solo en 2014, la incidencia prevista de cáncer de próstata es de 233.000 casos, con muertes en 29.480 hombres, lo que hace que la terapia del cáncer de próstata metastásico realmente sea una necesidad médica incumplida. Siegel *et al.*, 2014. CA Cancer J Clin. 2014;64(1):9-29. Los estudios epidemiológicos de Europa muestran datos comparables, con una incidencia estimada de 416.700 casos nuevos en 2012, lo que representa un 22,8% de los diagnósticos de cáncer en hombres. En total, se esperan 92.200 muertes relacionadas con el CP, lo que hace que sea uno de los tres cánceres por los que los hombres tienen una mayor probabilidad de morir, con una tasa de mortalidad del 9,5%

Con el advenimiento del crecimiento exponencial de nuevos agentes ensayados y aprobados para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm) solo en los últimos 5 años, han surgido problemas con respecto a la secuencia o combinación óptimas de estos agentes. Existen varias directrices que ayudan a dirigir a los médicos hacia el mejor enfoque para la secuencia, y la mayoría evaluaría la presencia o ausencia de síntomas, el estado funcional, así como la masa de la enfermedad, para ayudar a determinar la mejor secuencia para estos agentes. Mohler *et al.*, 2014, J Natl Compr Canc Netw. 2013;11(12):1471-1479; Cookson *et al.*, 2013, J Urol. 2013;190(2):429-438. En la actualidad, los tratamientos aprobados consisten en fármacos citotóxicos de la clase de los taxanos y terapias selectivas de andrógenos. El desafío para los médicos es decidir la mejor secuencia para la administración de estas terapias para proporcionar el mayor beneficio a los pacientes. Sin embargo, el fracaso de la terapia sigue siendo un desafío significativo, dadas las respuestas heterogéneas a las terapias en los pacientes y a la vista de la resistencia cruzada de cada agente. Mezynski *et al.*, Ann Oncol. 2012;23(11):2943-2947; Noonan *et al.*, Ann Oncol. 2013;24(7):1802-1807; Pezaro *et al.*, Eur Urol. 2014, 66(3): 459-465. Además, los pacientes pueden perder la ventana terapéutica para obtener un beneficio sustancial de cada fármaco que se ha demostrado que proporciona un aumento de la supervivencia global. Por lo tanto, sigue siendo una meta importante conseguir mejores métodos de identificación de las poblaciones objetivo que tienen la mayor probabilidad de beneficiarse de las terapias selectivas.

Las células tumorales circulantes (CTCs) representan un avance significativo en el diagnóstico del cáncer, aún más atractivo por su medición no invasiva. Cristofanilli *et al.*, N Engl J Med 351:781-91, (2004). Las CTCs liberadas de un tumor primario o de sus sitios metastásicos albergan una información importante sobre la biología del tumor. La cuantificación y la caracterización de las CTCs, en forma de una biopsia líquida, ayuda a los médicos a seleccionar el curso de la terapia y a vigilar y monitorizar cómo evoluciona el cáncer de un paciente. Las CTCs se pueden considerar, por lo tanto, no solamente un sustituto de los biomarcadores para una enfermedad metastásica, sino también una herramienta clave prometedora para rastrear los cambios en el tumor, la respuesta al tratamiento, la recidiva del cáncer o la respuesta del paciente de una manera no invasiva. Históricamente, los niveles extremadamente bajos de CTCs en el torrente sanguíneo, combinados con su fenotipo desconocido, ha impedido significativamente su detección y ha limitado su utilidad clínica. En la actualidad se está desarrollando una diversidad de tecnologías para la detección, el aislamiento y la caracterización de las CTCs para utilizar su información. Bambury *et al.* 2014, Annals of Oncology, vol. 25, suplemento 4, se refiere a la caracterización de la resistencia de novo a las terapias selectivas de andrógenos a través del análisis de la expresión de RA en CTCs de 40 pacientes con cáncer de próstata.

Existe la necesidad de desarrollar métodos exactos y no invasivos para la identificación prospectiva de pacientes con tumores que albergan una resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA para reducir la morbilidad y posibilitar la exploración temprana de enfoques terapéuticos alternativos. La presente invención aborda esta necesidad proporcionando un predictor de biomarcadores multivariante de la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA basándose en una detección robusta de CTCs y una plataforma de caracterización que posibilita la caracterización fenotípica de las CTCs. También se proporcionan ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm.

La descripción proporciona un método para predecir la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA) en un tumor de un paciente con cáncer de próstata que comprende (a) llevar a cabo un análisis directo que comprende la tinción inmunofluorescente y la caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida del paciente para generar datos de las células tumorales circulantes (CTCs), en donde el

análisis comprende determinar una característica medible de un panel de biomarcadores de CTCs tradicionales y no tradicionales de la resistencia de novo a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA), y (c) evaluar los datos de CTCs para determinar la probabilidad de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA en el tumor del paciente con cáncer de próstata. En ciertos aspectos, la tinción inmunofluorescente comprende la tinción de células nucleadas que comprende pancitoqueratina, el cúmulo de diferenciación (CD) 45, diamidino-2-fenilindol (DAPI) y RA. En ciertas realizaciones, los biomarcadores comprenden (1) la heterogeneidad de las CTCs, (2) la frecuencia de CTCs positivas para citoqueratina (CK+), positivas para el extremo N-terminal del RA, con una morfología de nucleolos prominentes, y (3) la frecuencia de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA. El método de la reivindicación 3, en donde la heterogeneidad de las CTCs comprende además biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CTCs tradicionales, agrupamientos de CTCs, CTCs CK-, CTCs pequeñas, CTCs nucleolos+, CTCs con un patrón punteado de CK y los biomarcadores enumerados en la Tabla 1.

La invención proporciona un método para predecir la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA) en un tumor de un paciente con cáncer de próstata que comprende

(a) llevar a cabo un análisis directo que comprende la tinción inmunofluorescente y la caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida del paciente para generar datos de las células tumorales circulantes (CTCs), en donde el análisis comprende determinar una característica medible de un panel de biomarcadores de CTCs tradicionales y no tradicionales de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA),

en donde los biomarcadores comprenden (1) la heterogeneidad de las CTCs, (2) la frecuencia de CTCs positivas para citoqueratina (CK+), positivas para el extremo N-terminal del RA, con una morfología de nucleolos prominentes, y (3) la frecuencia de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA, y

en donde la heterogeneidad de las CTCs comprende biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CTCs tradicionales, agrupamientos de CTCs, CTCs CK-, CTCs pequeñas, CTCs nucleolos+, CTCs con un patrón punteado de CK y

(b) evaluar los datos de CTCs para determinar la probabilidad de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA en el tumor del paciente con cáncer de próstata,

en donde (1) la mayor heterogeneidad de las CTCs, (2) la frecuencia incrementada de CTCs CK+, positivas para el extremo N-terminal del RA con una morfología de nucleolos prominentes, o (3) la frecuencia incrementada de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA, en comparación con los pacientes que responden a la terapia del RA, predice la resistencia *de novo* a la terapia del RA.

En ciertas realizaciones, la tinción inmunofluorescente comprende la tinción de células nucleadas que comprende pancitoqueratina, el cúmulo de diferenciación (CD) 45, diamidino-2-fenilindol (DAPI) y RA.

En ciertas realizaciones, el método comprende una etapa inicial de depósito de las células nucleadas en forma de una monocapa sobre un portaobjetos.

En ciertas realizaciones, el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm).

En ciertas realizaciones, los datos de CTCs se generan mediante microscopía de barrido de fluorescencia. En ciertas realizaciones, la microscopía proporciona un campo de visión que comprende tanto CTCs como al menos 200 glóbulos blancos (GBs) del entorno. En ciertas realizaciones, los datos de CTCs se generan estudiando al menos 4 millones de las células nucleadas.

En ciertas realizaciones, las CTCs comprenden una tinción inmunofluorescente diferente de las células nucleadas del entorno; o en donde las CTCs comprenden características morfológicas diferentes en comparación con las células nucleadas del entorno.

En ciertas realizaciones, las características morfológicas comprenden una o más del grupo que consiste en el tamaño del núcleo, la forma del núcleo, la presencia de orificios en el núcleo, el tamaño de la célula, la forma de la célula y la proporción nuclear/citoplasmática, el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucleolos, la calidad del citoplasma y la cantidad de citoplasma.

En ciertas realizaciones, la identificación de las CTCs comprende adicionalmente comparar la intensidad de la tinción fluorescente de pancitoqueratina con las células nucleadas del entorno.

En ciertas realizaciones, el método comprende además una etapa inicial de obtención de un recuento de glóbulos blancos (GB) para la muestra de sangre; una etapa inicial de lisado de los eritrocitos de la muestra de sangre; y/o una etapa inicial de depósito de las células nucleadas de la muestra de sangre en forma de una monocapa sobre un portaobjetos de vidrio. En ciertas realizaciones, el método comprende depositar entre alrededor de 2 millones y alrededor de 3 millones de células sobre el portaobjetos de vidrio.

En ciertas realizaciones, la generación de los datos de CTCs comprende la enumeración de las CTCs en la muestra de sangre.

En ciertas realizaciones, las características medibles se analizan mediante el uso de un modelo predictivo. En ciertas realizaciones, el modelo es un modelo multivariante.

- 5 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1 muestra los patrones de cambios de PSA tras las terapias dirigidas a la señalización del RA (A, pacientes con respuesta verdadera, N=30; B, pacientes con resistencia adquirida, N=23; C, pacientes con resistencia *de novo*, N=33).

15 Las Figuras 2A y 2B muestran un esquema del proceso e imágenes. La Figura 2A muestra un esquema de recogida de CTCs de Epic y el proceso de detección, que se desarrolla como sigue: (1) Sangre lisada, células nucleadas de la muestra de sangre colocadas sobre portaobjetos; (2) Portaobjetos almacenados en un biorrepositorio a -80 °C; (3) Portaobjetos teñidos con CK, CD45, DAPI y RA; (4) Portaobjetos sometidos a un barrido; (5) Análisis mediante algoritmos de patología digitales multiparamétricos, y (6) Confirmación informática y mediante un lector humano de las CTCs y cuantificación de la expresión de los biomarcadores. La Figura 2B muestra imágenes de CTCs tradicionales (positivas para citoqueratina (rojo), negativas para CD45 (verde), contienen un núcleo positivo para DAPI (azul), morfológicamente diferentes de los leucocitos del entorno) y no tradicionales.

20 Figura 3. Características de las CTCs por la respuesta/resistencia a la terapia del RA. La Figura 3 muestra diagramas de cajas que representan el número de CTCs tradicionales y CTCs no tradicionales por 7,5 mL frente a la respuesta a A o E (izquierda) o Taxano (derecha). El perímetro de la caja define los cuartiles superior e inferior, y el valor mediano es el marcador dentro de la caja. Los bigotes representan 1,5 IQR de los valores observados.

25 La Figura 4 muestra un mapa de calor que enumera los pacientes cribados antes de A o E de 1ª, 2ª o 3ª línea agrupados por la respuesta frente a la abundancia relativa de características específicas de las CTCs. Las características de las CTCs no son mutuamente excluyentes, y pueden no representar eventos únicos. Los valores mostrados se informan en CTCs/mL para cada fenotipo (excepto para RA+ Medio /CTC) y se codifican por colores para reflejar la abundancia relativa (elevada=rojo/gris oscuro con números positivos, media=amarillo/gris claro, baja=verde/gris oscuro con números negativos) en todos los pacientes.

30 La Figura 5 muestra un mapa de calor que enumera los pacientes cribados antes de taxano de 1ª, 2ª o 3ª línea agrupados por la respuesta frente a la abundancia relativa de características específicas de las CTCs. Las características de las CTCs no son mutuamente excluyentes, y pueden no representar eventos únicos. Los valores mostrados se informan en CTCs/mL para cada fenotipo (excepto para RA+ Medio /CTC) y se codifican por colores para reflejar la abundancia relativa (elevada=rojo/gris oscuro con números positivos, media=amarillo/gris claro, baja=verde/gris oscuro con números negativos) en todos los pacientes.

35 Figura 6. Medida de las alteraciones del dominio de unión al ligando del RA. La Figura 6 representa un gráfico de barras que compara los valores de la expresión de RA entre dos pacientes representativos (1 resistente a la terapia del RA en la parte superior, 1 con respuesta a la terapia del RA en la parte inferior), (ambos con >40 CTCs RA+/7,5 mL) que recibieron la terapia del RA. Las CTCs se examinaron con respecto a las alteraciones del dominio de unión al ligando (LBD) del RA utilizando un ensayo de 2 objetivos dirigido a la expresión proteica del extremo N-terminal del RA y la expresión proteica del extremo C-terminal del RA. La expresión de la variante con pérdida del extremo C-terminal del RA se ha asociado con la resistencia a la terapia del RA.

45 Figuras 7A-7C. Predicción de la resistencia *de novo* a la terapia del RA. La Figura 7A muestra una tabla que compara modelos univariantes y multivariantes para la predicción de la respuesta a la terapia del RA mediante el uso de variables moleculares y morfológicas. Las Figuras 7B y 7C muestran gráficos en cascada que representan la relación entre la predicción de la resistencia a la terapia del RA y el % de disminución máx. de PSA para los pacientes tratados con la terapia del RA (Figura 7B) y taxano (Figura 7C).

50 Figura 8. Frecuencia de CTCs en las decisiones de tratamiento de 1ª, 2ª, o 3ª línea. La Figura 8 muestra diagramas de cajas que representan la distribución de los valores de CTCs/7,5 mL en los pacientes antes del tratamiento de 1ª, 2ª y 3ª línea con la terapia del RA o la terapia de taxano. El perímetro de la caja define los cuartiles superior e inferior, y el valor mediano es el marcador dentro de la caja. Los bigotes representan 1,5 IQR de los valores observados.

55 Las Figuras 9A-9C muestran mapas de calor que enumeran los pacientes cribados antes de la terapia de 1ª (Figura 9A), 2ª (Figura 9B) o 3ª (Figura 9C) línea frente a la abundancia relativa de CTCs con características específicas (filas). Las características de las CTCs no son mutuamente excluyentes, y pueden no representar eventos únicos. Los valores mostrados se informan en CTCs/7,5 mL para cada fenotipo (excepto para la Expresión Media de RA) y se codifican por colores para reflejar la abundancia relativa (elevada=rojo/gris oscuro con números positivos, media=amarillo/gris claro, baja=verde/gris oscuro con números negativos) en todos los pacientes.

Figura 10. Heterogeneidad de los fenotipos de CTCs. La Figura 10 muestra un diagrama de puntos que describe el % de los fenotipos de CTCs más habituales representados en los pacientes con más de 1, 10 o 100 CTCs/7,5 mL en las decisiones de tratamiento de 1ª, 2ª y 3ª línea. La tabla de la esquina superior derecha describe la probabilidad de que la heterogeneidad observada en las subpoblaciones de CTCs no sea diferente entre grupos.

5 Figuras 11A y 11B. Heterogeneidad de la localización de RA. La Figura 11A muestra imágenes inmunofluorescentes de CTCs que muestran la tinción del RA nuclear, la tinción del RA nuclear y citoplasmático, y la tinción del RA citoplasmático. La Figura 11B es una tabla que describe la distribución de los pacientes con >5 CTCs positivas para RA con RA localizado en el núcleo, el citoplasma o ambos en la terapia de 1ª, 2ª, 3ª línea.

10 La Figura 12 muestra un gráfico en cascada que describe la heterogeneidad de la respuesta a la terapia de 1ª (salmón/intervalo 1), 2ª (verde/intervalo 3) o 3ª línea (azul/intervalo 2) tal como se mide por el % de disminución máxima en la expresión de PSA.

15 Figura 13. Los distintivos de CTCs de la resistencia a la terapia del RA se incrementan con las terapias sucesivas. La Figura 13 muestra un gráfico de barras que identifica el porcentaje de pacientes que se predice que fracasarán en la terapia del RA (A o E) en las decisiones de tratamiento de 1ª, 2ª, y 3ª línea. El modelo predictivo utiliza la caracterización de CTCs descrito en la presente memoria.

Figura 14. La frecuencia de los fenotipos de CTCs se incrementa con las terapias sucesivas. La Figura 14 muestra un gráfico de barras que identifica el porcentaje de pacientes que afrontan la terapia de 1ª, 2ª y 3ª línea con >50 eventos de CTCs, y las características de las CTCs particulares asociadas (cada grupo de gráficos de barras, de izquierda a derecha, 1ª, 2ª y 3ª decisiones de tratamiento).

20 Figuras 15A y 15B. La Figura 15A muestra la población de estudio para el Ejemplo 1, y la Figura 15B muestra las terapias previas de los pacientes para la población.

Figuras 16A y 16B. La Figura 16A muestra la población de estudio para el Ejemplo 2, y la Figura 16B muestra los puntos de decisión del tratamiento clínico en CPRCm.

Descripción detallada

25 La presente descripción se basa, en parte, en la identificación de un panel de biomarcadores que puede predecir de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente afectado de CPRCm. Tal como se describe en la presente memoria, los pacientes que no responden a las terapias selectivas del RA demuestran una mayor heterogeneidad de subpoblaciones de CTCs en comparación con los pacientes que respondieron a las terapias selectivas del RA. Como se describe adicionalmente en la presente memoria, se puede utilizar la
30 caracterización de CTCs individuales para medir la heterogeneidad de las subpoblaciones de CTCs para predecir la resistencia a las terapias selectivas del RA. También se describe en la presente memoria que se puede utilizar la expresión epitelial, la tinción del extremo N-terminal del receptor de andrógenos y la evaluación morfológica de las CTCs para predecir la respuesta a las terapias selectivas del RA. Además, tal como se describe en la presente memoria, se puede utilizar la detección de la pérdida del extremo C-terminal del RA para predecir la resistencia a las
35 terapias selectivas del RA.

Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan indicadores predictivos para la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA. La identificación de biomarcadores predictivos posibilita oportunidades tempranas y continuas para la intervención terapéutica, y ajustes a lo largo de la progresión clínica del CPRCm. Se llevó a cabo una modelización multivariante discriminante de biomarcadores para identificar un panel de biomarcadores que permitiera
40 que los métodos descritos identifiquen a un paciente con cáncer de próstata con tumores que tengan una resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA. Por lo tanto, la presente descripción incluye un modelo multivariante para identificar a un paciente con cáncer de próstata con tumores que tienen una resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA. Esta descripción, por lo tanto, ha identificado biomarcadores predictivos para identificar a un paciente con cáncer de próstata con tumores que tienen una resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA.

45 En una realización, la descripción proporciona un método para predecir la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA) en un tumor de un paciente con cáncer de próstata que comprende (a) llevar a cabo un análisis directo que comprende la tinción inmunofluorescente y la caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida del paciente para generar datos de las células tumorales circulantes (CTCs), en donde el análisis comprende determinar una característica medible de un panel de biomarcadores de CTCs
50 tradicionales y no tradicionales de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA), y (c) evaluar los datos de CTCs para determinar la probabilidad de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA en el tumor del paciente con cáncer de próstata. En las realizaciones particulares, el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm). En ciertas realizaciones, la tinción inmunofluorescente de las células nucleadas comprende pancitoqueratina, el cúmulo de diferenciación (CD) 45, diamidino-2-fenilindol (DAPI)
55 y RA.

En ciertas realizaciones, los biomarcadores usados en los métodos descritos en la presente memoria comprenden (1) la heterogeneidad de las CTCs, (2) la frecuencia de CTCs positivas para citoqueratina (CK+), positivas para el extremo

N-terminal del RA, con una morfología de nucleolos prominentes, y (3) la frecuencia de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA. En los aspectos adicionales, la heterogeneidad de las CTCs comprende biomarcadores de CTCs seleccionados del grupo que consiste en CTCs tradicionales, agrupamientos de CTCs, CTCs CK-, CTCs pequeñas, CTCs nucleolos⁺ y CTCs con un patrón punteado de CK, y el biomarcador adicional expuesto en la Tabla 1.

La evolución rápida de las terapias farmacológicas en el cáncer de próstata ha mejorado enormemente tras el uso de docetaxel desde su aprobación fundamental por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA) en 2004, y ha iniciado una nueva era en la que se ha avanzado más allá del uso de la terapia de privación de andrógenos (TPA) con la adición de nuevos agentes hormonales, inmunoterapia, quimioterapia de segunda línea, así como compuestos radiofarmacéuticos (véase la Tabla 1). En la actualidad, la elección de la secuenciación se basa en los perfiles de los pacientes, existan o no síntomas de enfermedad metastásica. Los hombres que son asintomáticos o mínimamente sintomáticos pueden beneficiarse del uso temprano de Sipuleucel-T, mientras el tratamiento con docetaxel normalmente se reserva para los pacientes con dolor. Se usa radio de manera predominante para los pacientes con metástasis óseas, especialmente en aquellos que no son candidatos para una quimioterapia agresiva, y se puede administrar acetato de abiraterona por los efectos sobre la paliación del dolor. Se pueden ofrecer agentes tales como cabazitaxel, acetato de abiraterona, enzalutamida o radio tras la progresión con docetaxel. Aunque los resultados de supervivencia indudablemente mejoran con el uso de estas terapias, la enfermedad progresará en última instancia con cada régimen.

Los andrógenos en forma de testosterona o la más potente dihidrotestosterona (DHT) han sido impulsores bien definidos de la progresión del cáncer de próstata y la diferenciación de la glándula prostática. Como tal, la columna vertebral del tratamiento para los cánceres de próstata avanzados se estableció hace décadas, cuando la castración en forma de orquiectomía quirúrgica consiguió una regresión significativa de los tumores de próstata. Desde entonces, se ha empleado la sustitución por la castración química, principalmente debido a las preferencias de los pacientes. La TPA, por lo tanto, se ha convertido en el tratamiento sistémico estándar para el cáncer de próstata localmente avanzado o metastásico. Aunque la TPA casi siempre es eficaz en la mayoría de pacientes, inevitablemente se da la progresión de la enfermedad hasta la resistencia a la castración. En la actualidad se reconoce cada vez más que el receptor de andrógenos (RA) se sigue sobreexpresando a pesar de castrar aparentemente los niveles de testosterona, debido a que los receptores alternativos pueden activar el RA, u otros genes objetivo pueden ayudar a perpetuar el fenotipo resistente a la castración, y por lo tanto la expresión "resistencia a la castración" se ha adoptado de manera generalizada en la bibliografía. La mejor comprensión del papel de estos andrógenos en la estimulación del crecimiento del cáncer de próstata ha conducido al desarrollo y la aprobación de abiraterona y enzalutamida.

Varios factores están asociados a un riesgo incrementado de cáncer de próstata. La genética, la edad creciente, y los factores ambientales y geográficos desempeñan un papel importante. Pero los factores alimentarios, tales como un consumo elevado de grasas - ácidos grasos, ácido alfa-linolénico hallado en la carne roja, etc., la deficiencia de oligoelementos como selenio y los niveles bajos de vitamina D y E también se han implicado con un riesgo incrementado de desarrollo de cáncer de próstata en ciertos individuos.

Se debe indicar que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/una", "uno" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contenido lo dicte claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "un biomarcador" incluye una mezcla de dos o más biomarcadores, y similares.

El término "alrededor de", especialmente en referencia a una cantidad concreta, pretende incluir desviaciones de más o menos un cinco por ciento.

Tal como se usan en esta solicitud, lo que incluye las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "un/una", y "el/la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contenido lo dicte claramente de otra manera, y se usan de manera intercambiable con "al menos un/una" y "uno/una o más".

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene", y cualquier variación de los mismos, pretenden cubrir una inclusión no exclusiva, de forma que un proceso, método, producto por proceso, o composición de materia que comprende, incluye, o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solamente esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes para tal proceso, método, producto por proceso, o composición de materia.

Un "biomarcador" es cualquier molécula, propiedad, característica o aspecto que se puede medir y correlacionar con la probabilidad de un cáncer de próstata, en particular, CPRCm. El término incluye además cualquier propiedad, característica, rasgo o aspecto de una CTC que se puede medir y correlacionar con respecto a la predicción de la respuesta a una terapia del cáncer de próstata, por ejemplo, la terapia selectiva del RA. Para un biomarcador de CTCs, tal característica medible puede incluir, por ejemplo, la presencia, ausencia, o concentración del biomarcador, o un subtipo del mismo, en la muestra biológica, un fenotipo inmunofluorescente y/o morfológico alterado, tal como, por ejemplo, un detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucleolos, la calidad del citoplasma, la cantidad de citoplasma, la intensidad de los patrones de tinción inmunofluorescente en comparación con los sujetos de control adecuados, y/o la presencia o el grado de heterogeneidad de los fenotipos observados para un biomarcador de CTCs. Además de los biomarcadores de CTCs, los biomarcadores pueden incluir además indicios de riesgo que

incluyen, por ejemplo la edad, los antecedentes familiares, la raza y la dieta.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "panel" se refiere a una composición, tal como una matriz o una colección, que comprende uno o más biomarcadores. El término también se puede referir a un perfil o índice de patrones de expresión de uno o más biomarcadores descritos en la presente memoria. El número de biomarcadores útiles para un panel de biomarcadores se basa en el valor de la sensibilidad y la especificidad para la combinación particular de valores de biomarcadores.

El término "paciente", tal como se usa en la presente memoria, se refiere preferiblemente a un ser humano, pero también incluye otros mamíferos. Se observa que, tal como se usan en la presente memoria, los términos "organismo", "individuo", "sujeto", o "paciente" se usan como sinónimos y de manera intercambiable.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula tumoral circulante" o "CTC" pretende incluir cualquier célula poco frecuente que está presente en una muestra biológica y que está relacionada con el cáncer de próstata. Las CTCs, que pueden estar presentes en forma de células individuales o en agrupamientos de CTCs, con frecuencia son células epiteliales desprendidas de tumores sólidos halladas a concentraciones muy bajas en la circulación de los pacientes.

Tal como se usa en la presente memoria, "CTC tradicional" se refiere a una CTC individual que es positiva para citoqueratina, negativa para CD45, contiene un núcleo positivo para DAPI, y es morfológicamente diferente de los glóbulos blancos del entorno.

Tal como se usa en la presente memoria, una "CTC no tradicional" se refiere a una CTC que difiere de una CTC tradicional en al menos una característica. Las CTCs no tradicionales incluyen los cinco subtipos de CTCs mostrados en la Figura 2, Panel B, que incluyen agrupamientos de CTCs, CTCs negativas para CK que son positivas al menos para un biomarcador adicional que permite la clasificación como CTC, CTCs pequeñas, CTCs nucleolos⁺ y CTCs con un patrón punteado de CK. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "agrupamiento de CTCs" significa dos o más CTCs con membranas celulares en contacto.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "heterogeneidad de CTCs" se refiere al número y/o la frecuencia de los subtipos de CTCs observados en una muestra. Los subtipos de CTCs incluyen las CTCs no tradicionales descritas en la presente memoria, así como cualquier CTC caracterizada por fenotipos morfológicos y/o inmunofluorescentes que no están asociados a las CTCs tradicionales. Tal como se describe en la presente memoria, la heterogeneidad es mayor en los pacientes que no responden a las terapias selectivas del RA en comparación con los pacientes que responden a las terapias selectivas del RA. Por lo tanto, se puede asignar una puntuación que corresponde al número de subtipos de CTCs en una muestra. Por ejemplo, a una muestra que incluye cada subtipo de CTC observable se le asignará la máxima puntuación de heterogeneidad, que puede predecir que un paciente no responderá a la terapia selectiva del RA. A la inversa, una ausencia de heterogeneidad corresponde a una baja puntuación de heterogeneidad, que puede predecir que es probable que un paciente responda a la terapia selectiva del RA. Se puede calcular la puntuación de heterogeneidad de un paciente como el número de biomarcadores por 7,5 mL de muestra de sangre (Puntuación de Heterogeneidad (por Paciente) = n° de biomarcadores donde [biomarcador]/7,5 mL > 0). La heterogeneidad de CTCs es un biomarcador útil para la práctica de los métodos de la invención, que incluye múltiples características medibles que colectivamente también sirven como biomarcadores. La Tabla 1 expone una lista de biomarcadores de heterogeneidad útiles para la práctica de los métodos de la invención.

TABLA 1. BIOMARCADORES DE HETEROGENEIDAD	
[Agrupamiento CK+]/7,5 mL	
[Agrupamiento CK-]/7,5 mL	
[Agrupamiento]/7,5 mL	
[CTC RA+]/7,5 mL	
[CTC RA-]/7,5 mL	
[CTC CK+]/7,5 mL	
[CTC CK-]/7,5 mL	
Área Celular Pequeña/7,5 mL	
Área Celular Media/7,5 mL	
Área Celular Grande/7,5 mL	
Área Celular Gigante/7,5 mL	

Área Nuclear Pequeña/7,5 mL
Área Nuclear Media/7,5 mL
Área Nuclear Grande/7,5 mL
Área Nuclear Gigante/7,5 mL
Nucleolos-/7,5 mL
Nucleolos+/7,5 mL
Nucleolos++/7,5 mL
Puntos CK-/7,5 mL
Puntos CK+/7,5 mL
[CK++ RA+ nucleolos++]/7,5 mL
[CK++ RA- nucleolos-]/7,5 mL
[CK++ RA+ nucleolos-]/7,5 mL
[CK++ RA- nucleolos++]/7,5 mL
[CK++ RA+ nucleolos+]/7,5 mL
[CK++ RA- nucleolos+]/7,5 mL
[CK+ RA- nucleolos++]/7,5 mL
[CK+ RA- nucleolos-]/7,5 mL
[CK++ RA++ nucleolos++]/7,5 mL
[CK+ RA+ nucleolos++]/7,5 mL
[CK- RA- nucleolos++]/7,5 mL
[CK- RA- nucleolos-]/7,5 mL
[CK- RA+ nucleolos+]/7,5 mL
[CK- RA+ nucleolos-]/7,5 mL
[CK+ RA+ nucleolos+]/7,5 mL
[CK- RA+ nucleolos++]/7,5 mL
[CK+ RA+ nucleolos-]/7,5 mL
[CK- RA- nucleolos+]/7,5 mL
[CK- RA++ nucleolos-]/7,5 mL
[CK- RA++ nucleolos++]/7,5 mL
[CK- RA++ nucleolos+]/7,5 mL
[CK+ RA++ nucleolos++]/7,5 mL
[CK+ RA++ nucleolos+]/7,5 mL
[CK++ RA++ nucleolos+]/7,5 mL
[CK++ RA++ nucleolos-]/7,5 mL

En ciertas realizaciones, la frecuencia de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA es un biomarcador

útil para la práctica de los métodos de la invención. Tal como se describe en la presente memoria, la disminución en la tinción nuclear del extremo C-terminal del RA en comparación con la tinción nuclear del extremo N-terminal del RA puede predecir que un paciente no responderá a la terapia selectiva del RA.

En su sentido más amplio, una muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga CTCs. Una muestra puede comprender un líquido corporal, tal como sangre; la fracción soluble de una preparación celular, o una alícuota de medios en los que se han cultivado células; un cromosoma, un orgánulo, o membrana aislada o extraída de una célula; ADN genómico, ARN, o cADN en disolución o unido a un sustrato; una célula; un tejido; una impresión tisular; una huella dactilar; células; piel, y similares. Una muestra biológica obtenida de un sujeto puede ser cualquier muestra que contenga células, e incluye cualquier material en el que se pueden detectar CTCs. Una muestra puede ser, por ejemplo, sangre completa, plasma, saliva u otro líquido o tejido corporal que contenga células.

En las realizaciones particulares, la muestra biológica es una muestra de sangre. Como se describe en la presente memoria, una muestra puede ser sangre completa, más preferiblemente sangre periférica o una fracción celular de la sangre periférica. Como apreciarán los expertos en la técnica, una muestra de sangre puede incluir cualquier fracción o componente de la sangre, sin limitación, células T, monocitos, neutrófilos, eritrocitos, plaquetas y microvesículas, tales como exosomas y vesículas similares a exosomas. En el contexto de esta descripción, las células sanguíneas incluidas en una muestra de sangre incluyen cualquier célula nucleada, y no se limitan a los componentes de la sangre completa. Como tales, las células sanguíneas incluyen, por ejemplo, tanto glóbulos blancos (GBs) como células poco frecuentes, que incluyen las CTCs.

Las muestras de esta descripción pueden contener una diversidad de poblaciones celulares y subpoblaciones celulares que son distinguibles mediante métodos muy conocidos en la técnica (p.ej., FACS, inmunohistoquímica). Por ejemplo, una muestra de sangre puede contener poblaciones de células no nucleadas, tales como eritrocitos (p.ej., 4-5 millones/ μ l) o plaquetas (150.000-400.000 células/ μ l), y poblaciones de células nucleadas, tales como GBs (p.ej., 4.500-10.000 células/ μ l), CECs o CTCs (células tumorales circulantes; p.ej., 2-800 células/ μ l). Los GBs pueden contener subpoblaciones celulares, p.ej., de neutrófilos (2.500-8.000 células/ μ l), linfocitos (1.000-4.000 células/ μ l), monocitos (100-700 células/ μ l), eosinófilos (50-500 células/ μ l), basófilos (25-100 células/ μ l) y similares. Las muestras de esta descripción son muestras sin enriquecer, es decir, no están enriquecidas en ninguna población o subpoblación específica de células nucleadas. Por ejemplo, las muestras de sangre sin enriquecer no están enriquecidas en CTCs, GB, células B, células T, células NK, monocitos, o similares.

En ciertas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre obtenida de un sujeto sano o un sujeto que se considera que tiene un riesgo elevado de cáncer de próstata o metástasis de un cáncer de próstata existente, basándose en los criterios clínicamente establecidos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, la edad, la raza, la familia y los antecedentes. En ciertas realizaciones, la muestra de sangre es de un sujeto al que se le ha diagnosticado un cáncer de próstata y/o CPRCm basándose en una biopsia tisular o líquida y/o en criterios quirúrgicos o clínicos. En ciertas realizaciones, la muestra de sangre se obtiene de un sujeto que muestra una manifestación clínica de cáncer de próstata y/o CPRCm muy conocida en la técnica, o que presenta cualquiera de los factores de riesgo conocidos para el cáncer de próstata y/o CPRCm.

Tal como se usa en la presente memoria en el contexto de la generación de los datos de CTCs, la expresión "análisis directo" significa que las CTCs se detectan en el contexto de todas las células nucleadas del entorno presentes en la muestra, en contraposición a después del enriquecimiento de la muestra en CTCs antes de la detección. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden la microscopía, que proporciona un campo de visión que incluye tanto CTCs como al menos 200 glóbulos blancos (GBs) del entorno.

Un aspecto fundamental de la presente descripción es la solidez sin precedentes de los métodos descritos con respecto a la detección de CTCs. La detección de eventos infrecuentes descrita en la presente memoria con respecto a las CTCs se basa en un análisis directo, es decir, sin enriquecimiento, de una población que incluye la identificación de eventos poco frecuentes en el contexto de eventos que no son infrecuentes en el entorno. La identificación de los eventos infrecuentes según los métodos descritos identifica intrínsecamente los eventos del entorno como eventos no infrecuentes. Teniendo en cuenta los eventos no infrecuentes del entorno y determinando las medias para los eventos no infrecuentes, por ejemplo, el tamaño celular medio de los eventos no infrecuentes, se posibilita la calibración del método de detección eliminando el ruido. El resultado es una solidez de los métodos descritos que no se puede conseguir con los métodos que no se basan en el análisis directo, sino que comparan poblaciones enriquecidas con comparaciones contextuales intrínsecamente distorsionadas de eventos infrecuentes. La solidez de los métodos de análisis directos descritos en la presente memoria posibilita la caracterización de CTCs, lo que incluye los subtipos de CTCs descritos en la presente memoria, que tiene en cuenta la identificación de los fenotipos y la heterogeneidad que no se puede conseguir con otros métodos de detección de CTCs y que posibilita el análisis de biomarcadores en el contexto de los métodos reivindicados.

Los métodos de predicción de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA) en un tumor de un paciente con cáncer de próstata puede incluir además los factores de riesgo de pacientes individuales y los datos de imagenología, que incluyen cualquier modalidad de imagenología conocida y usada en la técnica, por ejemplo y sin limitación, tomografía computerizada de rayos X (TC), ecografía, tomografía de emisión de positrones (TEP), tomografía de impedancia eléctrica y resonancia magnética (IRM). Se entiende que un experto en la técnica

puede seleccionar una modalidad de imagenología basándose en una diversidad de criterios conocidos en la técnica. Como se describe en la presente memoria, los métodos pueden incluir uno o más fragmentos de datos de imagenología. En los métodos descritos en la presente memoria, se pueden seleccionar uno o más factores de riesgo individuales del grupo que consiste en la edad, la raza, y los antecedentes familiares. Se entiende que un experto en la técnica puede seleccionar factores de riesgo individuales adicionales basándose en una diversidad de criterios conocidos en la técnica. Como se describe en la presente memoria, los métodos pueden incluir uno o más factores de riesgo individuales. Por lo tanto, los biomarcadores pueden incluir datos de imagenología, factores de riesgo individuales y datos de CTCs. Como se describe en la presente memoria, los biomarcadores también pueden incluir, pero sin limitación, moléculas biológicas que comprenden nucleótidos, ácidos nucleicos, nucleósidos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, esteroides, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, anticuerpos, regiones de interés que sirven como sustitutos para macromoléculas biológicas y combinaciones de los mismos (p.ej., glicoproteínas, ribonucleoproteínas, lipoproteínas), así como porciones o fragmentos de una molécula biológica.

Los datos de CTCs pueden incluir tanto características morfológicas como características inmunofluorescentes. Como entenderán los expertos en la técnica, los biomarcadores pueden incluir una molécula biológica, o un fragmento de una molécula biológica, cuyo cambio y/o detección se puede correlacionar, individualmente o combinado con otras características medibles, con el cáncer de próstata y/o el CPRCm. Las CTCs, que pueden estar presentes en una célula individual o en agrupamientos de CTCs, con frecuencia son células epiteliales desprendidas de tumores sólidos, y están presentes a concentraciones muy bajas en la circulación de los sujetos. Por lo tanto, la detección de las CTCs en una muestra de sangre se puede denominar detección de evento infrecuente. Las CTCs tienen una abundancia de menos de 1:1.000 en una población de células sanguíneas, p.ej., una abundancia de menos de 1:5.000, 1:10.000, 1:30.000, 1:50.000, 1:100.000, 1:300.000, 1:500.000, o 1:1.000.000. En ciertas realizaciones, la CTC tiene una abundancia de 1:50.000 a 1:100.000 en la población celular.

Las muestras de esta descripción se pueden obtener mediante cualquier medio, que incluye, p.ej., por medio de una biopsia de tejido sólido o una biopsia líquida (véase, p.ej., Marrinucci D. *et al.*, 2012, Phys. Biol. 9 016003). Brevemente, en las realizaciones particulares, el proceso puede incluir la lisis y la eliminación de los eritrocitos en una muestra de sangre de 7,5 mL, el depósito de las células nucleadas restantes en un portaobjetos de microscopio especializado, cada uno de los cuales da cabida al equivalente de aproximadamente 0,5 mL de sangre completa. Se puede extraer una muestra de sangre de cualquier fuente que se sepa que incluye células de la sangre o componentes de la misma, tales como sangre venosa, arterial, periférica, tisular, de cordón, y similares. Las muestras se pueden procesar mediante el uso de métodos clínicos muy conocidos y rutinarios (p.ej., procedimientos para extraer y procesar sangre completa). En ciertas realizaciones, se extrae una muestra de sangre en tubos de recogida de sangre (BCT) con anti-coagulante, que puede contener EDTA o Streck Cell-Free DNA™. En otras realizaciones, se extrae una muestra de sangre en tubos CellSave® (Veridex). Además, se puede almacenar una muestra de sangre durante hasta 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, o 60 horas antes del procesamiento posterior.

En ciertas realizaciones, los métodos de esta descripción comprenden una etapa inicial de obtención de un recuento de glóbulos blancos (GB) para la muestra de sangre. En ciertas realizaciones, el recuento de GB se puede obtener usando un dispositivo HemoCue® WBC (Hemocue, Ängelholm, Suecia). En ciertas realizaciones, el recuento de GB se usa para determinar la cantidad de sangre necesaria para colocar en una placa un volumen de carga coherente de células nucleadas por portaobjetos, y para calcular el equivalente de CTCs por volumen de sangre.

En ciertas realizaciones, los métodos de esta descripción comprenden una etapa inicial de lisado de los eritrocitos de la muestra de sangre. En ciertas realizaciones, los eritrocitos se lisan, p.ej., añadiendo una disolución de cloruro amónico a la muestra de sangre. En ciertas realizaciones, una muestra de sangre se somete a centrifugación tras la lisis de los eritrocitos, y las células nucleadas se resuspenden, p.ej., en una disolución de PBS.

En ciertas realizaciones, las células nucleadas de una muestra, tal como una muestra de sangre, se depositan en forma de una monocapa en un soporte plano. El soporte plano puede ser de cualquier material, p.ej. cualquier material claro fluorescente, cualquier material que conduzca a la adhesión celular, cualquier material que conduzca a la eliminación sencilla de los restos celulares, cualquier material que tenga un grosor de < 100 µm. En ciertas realizaciones, el material es una película. En ciertas realizaciones el material es un portaobjetos de vidrio. En ciertas realizaciones, el método incluye una etapa inicial de depósito de las células nucleadas de la muestra de sangre en forma de una monocapa sobre un portaobjetos de vidrio. El portaobjetos de vidrio se puede revestir para permitir una retención máxima de las células vivas (véase, p.ej., Marrinucci D. *et al.*, 2012, Phys. Biol. 9 016003). En ciertas realizaciones, se depositan alrededor de 0,5 millones, 1 millón, 1,5 millones, 2 millones, 2,5 millones, 3 millones, 3,5 millones, 4 millones, 4,5 millones, o 5 millones de células nucleadas sobre el portaobjetos de vidrio. En ciertas realizaciones, los métodos de esta descripción comprenden depositar alrededor de 3 millones de células sobre un portaobjetos de vidrio. En las realizaciones adicionales, los métodos de esta descripción comprenden depositar entre alrededor de 2 millones y alrededor de 3 millones de células sobre el portaobjetos de vidrio. En ciertas realizaciones, el portaobjetos de vidrio y las muestras celulares inmovilizadas están disponibles para el procesamiento o la experimentación posterior después de haber completado los métodos de esta descripción.

En ciertas realizaciones, los métodos de esta descripción comprenden una etapa inicial de identificación de las células nucleadas en la muestra de sangre sin enriquecer. En ciertas realizaciones, las células nucleadas se identifican con

una tinción fluorescente. En ciertas realizaciones, la tinción fluorescente comprende una tinción específica de ácidos nucleicos. En ciertas realizaciones, la tinción fluorescente es diamidino-2-fenilindol (DAPI). En ciertas realizaciones, la tinción inmunofluorescente de las células nucleadas comprende pancitoqueratina (CK), cúmulo de diferenciación (CD) 45 y DAPI. En ciertas realizaciones descritas adicionalmente en la presente memoria, las CTCs comprenden una tinción inmunofluorescente diferente de las células nucleadas del entorno. En ciertas realizaciones, la tinción inmunofluorescente diferente de las CTCs comprende DAPI (+), CK (+) y CD 45 (-). En ciertas realizaciones, la identificación de las CTCs comprende adicionalmente comparar la intensidad de la tinción fluorescente de pancitoqueratina con las células nucleadas del entorno. En ciertas realizaciones, los datos de CTCs se generan mediante microscopía de barrido de fluorescencia para detectar la tinción inmunofluorescente de las células nucleadas en una muestra de sangre. (Marrinucci D. *et al.*, 2012, Phys. Biol. 9 016003).

En las realizaciones particulares, todas las células nucleadas se retienen y se tiñen mediante inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales que seleccionan como objetivo la citoqueratina (CK), un filamento intermedio hallado exclusivamente en las células epiteliales, un anticuerpo específico panleucocitario que selecciona como objetivo el antígeno leucocitario común CD45, y una tinción nuclear, DAPI. Se pueden tomar imágenes de las células sanguíneas nucleadas en múltiples canales fluorescentes para producir imágenes digitales de alta calidad y resolución que conservan los sutiles detalles citológicos del contorno nuclear y la distribución citoplasmática. Aunque los GBs del entorno se pueden identificar con el anticuerpo específico panleucocitario que selecciona como objetivo CD45, las CTCs se pueden identificar como DAPI (+), CK (+) y CD 45 (-). En los métodos descritos en la presente memoria, las CTCs comprenden una tinción inmunofluorescente diferente de las células nucleadas del entorno.

En las realizaciones adicionales, los datos de CTCs incluyen las CTCs tradicionales, también conocidas como CTCs de alta definición (HD-CTCs). Las CTCs tradicionales son positivas para CK, negativas para CD45, contienen un núcleo intacto positivo para DAPI sin cambios apoptóticos identificables ni un aspecto alterado, y son morfológicamente diferentes de los glóbulos blancos (GBs) del entorno. Las intensidades de DAPI (+), CK (+) y CD45 (-) se pueden clasificar como características medibles durante la enumeración de HD-CTCs como se describió previamente (Figura 1). Nieva *et al.*, Phys Biol 9:016004 (2012). El análisis directo, sin enriquecimiento, empleado por los métodos descritos en la presente memoria da como resultado una alta sensibilidad y especificidad, mientras añade una citomorfología de alta definición para posibilitar una caracterización morfológica detallada de una población de CTCs, que se sabe que es heterogénea.

Aunque las CTCs se pueden identificar como células que son DAPI (+), CK (+) y CD 45 (-), los métodos de la invención se pueden poner en práctica con cualquier otro biomarcador que un experto en la técnica selecciona para generar los datos de CTCs y/o identificar las CTCs y los agrupamientos de CTCs. Un experto en la técnica conoce cómo seleccionar una característica morfológica, una molécula biológica, o un fragmento de una molécula biológica, cuyo cambio y/o detección se pueden correlacionar con una CTC. Los biomarcadores moleculares incluyen, pero sin limitación, moléculas biológicas que comprenden nucleótidos, ácidos nucleicos, nucleósidos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, esteroides, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, anticuerpos, regiones de interés que sirven como sustitutos para macromoléculas biológicas y combinaciones de los mismos (p.ej., glicoproteínas, ribonucleoproteínas, lipoproteínas). El término también incluye las porciones o los fragmentos de una molécula biológica, por ejemplo, un fragmento peptídico de una proteína o polipéptido.

Una persona experta en la técnica apreciará que se pueden usar varios métodos para generar los datos de CTCs, que incluyen las aproximaciones basadas en microscopía, que incluye la microscopía de barrido de fluorescencia (véase, p.ej., Marrinucci D. *et al.*, 2012, Phys. Biol. 9 016003), las aproximaciones mediante espectrometría de masas, tales como MS/MS, LC-MS/MS, monitorización de reacciones múltiples (MRM) o SRM y monitorización de iones de productos (PIM), y también incluyen los métodos basados en anticuerpos, tales como inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunoensayos tales como transferencias de Western, ensayo de inmuoadsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, transferencia puntual, y FACS. Los expertos en la técnica conocen en general las técnicas y protocolos de inmunoensayos (Price y Newman, Principles and Practice of Immunoassay, 2ª Edición, Grove's Dictionaries, 1997; y Gosling, Immunoassays: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000). Se puede usar una diversidad de técnicas de inmunoensayos, que incluyen los inmunoensayos competitivos y no competitivos (Self *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65 (1996), véase también John R. Crowther, The ELISA Guidebook, 1ª ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282 y An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, de Chard T, ed., Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198).

Una persona experta en la técnica apreciará además que se puede detectar la presencia o ausencia de biomarcadores mediante el uso de cualquier clase de reactivos de unión específicos de los marcadores conocidos en la técnica, que incluyen, p.ej., anticuerpos, aptámeros, proteínas de fusión, tales como proteínas de fusión que incluyen componentes de receptores proteicos o ligandos proteicos, o moléculas de unión pequeñas específicas de los biomarcadores. En ciertas realizaciones, se determina la presencia o ausencia de CK o CD45 mediante un anticuerpo.

Los anticuerpos de esta descripción se unen de manera específica a un biomarcador. El anticuerpo se puede preparar mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica. Véase, p.ej., Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed. 1986). El anticuerpo puede ser cualquier inmunoglobulina o su derivado, producido de

manera natural o completamente o parcialmente sintética. También se incluyen en el término todos los derivados del mismo que mantienen una capacidad de unión específica. El anticuerpo tiene un dominio de unión que es homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión de una inmunoglobulina, y se puede obtener de fuentes naturales, o se puede producir de manera parcialmente o completamente sintética. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En ciertos aspectos, un anticuerpo es un anticuerpo de cadena simple. Las personas de experiencia habitual en la técnica apreciarán que el anticuerpo se puede proporcionar en cualquiera de una diversidad de formas que incluyen, por ejemplo, en forma humanizada, parcialmente humanizada, quimérica, humanizada quimérica, etc. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo que incluye, pero sin limitación, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, diacuerpo, y Fd. El anticuerpo se puede producir mediante cualquier medio. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir enzimáticamente o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto, y/o se puede producir de manera recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia del anticuerpo parcial. El anticuerpo puede comprender un fragmento de anticuerpo de cadena simple. De manera alternativa o adicional, el anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante uniones disulfuro, y cualquier fragmento funcional obtenido a partir de tales moléculas, en donde tales fragmentos conservan las propiedades de unión específica de la molécula de anticuerpo original. Debido a su menor tamaño como componentes funcionales de la molécula completa, los fragmentos de anticuerpo pueden ofrecer ventajas respecto de los anticuerpos intactos para el uso en ciertas técnicas inmunoquímicas y aplicaciones experimentales.

Se puede usar un marcador detectable en los métodos descritos en la presente memoria para la detección directa o indirecta de los biomarcadores al generar los datos de CTCs en los métodos de la invención. Se puede usar una amplia diversidad de marcadores detectables, y la elección del marcador depende de la sensibilidad necesaria, la facilidad de la conjugación con el anticuerpo, los requisitos de estabilidad, y la instrumentación disponible y las estipulaciones de eliminación. Los expertos en la técnica están familiarizados con la selección de un marcador detectable adecuado basándose en la detección analítica de los biomarcadores de los métodos de la invención. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, colorantes fluorescentes (p.ej. fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon GreenTM, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraarrodimina (TRITC), Cy3, Cy5, Alexa Fluor[®] 647, Alexa Fluor[®] 555, Alexa Fluor[®] 488), marcadores fluorescentes (p.ej. proteína fluorescente verde (GFP), ficoeritrina, etc.), enzimas (p.ej., luciferasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina, metales, y similares.

Para el análisis basado en espectrometría de masas, el marcaje diferencial con reactivos isotópicos, p.ej., marcadores de afinidad codificados por isótopo (ICAT) o la variación más reciente que usa reactivos de marcaje isobárico, iTRAQ (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), seguido de cromatografía líquida (LC) multidimensional y el análisis mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) pueden proporcionar una metodología adicional para poner en práctica los métodos de esta descripción.

Se puede usar un ensayo de quimioluminiscencia que usa un anticuerpo quimioluminiscente para la detección sensible y sin radiactividad de proteínas. También puede ser adecuado un anticuerpo marcado con un fluorocromo. Los ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, y lisamina. Los marcadores indirectos incluyen diversas enzimas muy conocidas en la técnica, tales como peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, ureasa, y similares. Los sistemas de detección que usan sustratos adecuados para la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa son muy conocidos en la técnica.

Se puede analizar una señal del marcador directo o indirecto, por ejemplo, mediante el uso de un microscopio, tal como un microscopio de fluorescencia o un microscopio de barrido de fluorescencia. De manera alternativa, se puede usar un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación, tal como un contador gamma para la detección de ¹²⁵I; o un fluorímetro para detectar la fluorescencia en presencia de una luz de una cierta longitud de onda. Si se desea, los ensayos usados para poner en práctica los métodos de esta descripción se pueden automatizar o llevar a cabo de manera robótica, y se puede detectar simultáneamente la señal de múltiples muestras.

En ciertas realizaciones, los biomarcadores son marcadores inmunofluorescentes. En ciertas realizaciones, los marcadores inmunofluorescentes comprenden un marcador específico de las células epiteliales. En ciertas realizaciones, los marcadores inmunofluorescentes comprenden un marcador específico de glóbulos blancos (GBs). En ciertas realizaciones, uno o más de los marcadores inmunofluorescentes comprenden CD 45 y CK.

En ciertas realizaciones, la presencia o ausencia de los marcadores inmunofluorescentes en las células nucleadas, tales como CTCs o GBs, da como resultado diferentes patrones de tinción inmunofluorescente. Los patrones de tinción inmunofluorescente para CTCs y GBs pueden diferir en base a qué marcadores de células epiteliales o de GB se detectan en las células respectivas. En ciertas realizaciones, la determinación de la presencia o ausencia de uno o más marcadores inmunofluorescentes comprende comparar la diferente tinción inmunofluorescente de las CTCs con la diferente tinción inmunofluorescente de los GBs mediante el uso, por ejemplo, de la tinción inmunofluorescente de CD45, que identifica claramente los GBs. Existen otros marcadores detectables o combinaciones de marcadores detectables que se unen a las diversas subpoblaciones de GBs. Estos se pueden usar en diversas combinaciones, lo que incluye en combinación o como alternativa a la tinción inmunofluorescente de CD45.

En ciertas realizaciones, las CTCs comprenden características morfológicas diferentes en comparación con las células nucleadas del entorno. En ciertas realizaciones, las características morfológicas comprenden el tamaño del núcleo, la forma del núcleo, el tamaño de la célula, la forma de la célula, y/o la proporción nuclear/citoplasmática. En ciertas realizaciones, el método comprende además analizar las células nucleadas por el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucleolos, la calidad del citoplasma, la cantidad de citoplasma, y la intensidad de los patrones de la tinción inmunofluorescente. Una persona de experiencia habitual en la técnica entiende que las características morfológicas de esta descripción pueden incluir cualquier rasgo, propiedad, característica, o aspecto de una célula que se puede determinar y correlacionar con la detección de una CTC.

Los datos de CTCs se pueden generar con cualquier método microscópico conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el método se lleva a cabo mediante microscopía de barrido de fluorescencia. En ciertas realizaciones, el método microscópico proporciona imágenes de alta resolución de las CTCs y los GBs de su entorno (véase, p.ej., Marrinucci D. *et al.*, 2012, *Phys. Biol.* 9 016003)). En ciertas realizaciones, un portaobjetos revestido con una monocapa de células nucleadas de una muestra, tal como una muestra de sangre sin enriquecer, se somete a un barrido mediante un microscopio de barrido de fluorescencia, y se registran las intensidades de fluorescencia de los marcadores inmunofluorescentes y las tinciones nucleares para permitir la determinación de la presencia o ausencia de cada marcador inmunofluorescente y la evaluación de la morfología de las células nucleadas. En ciertas realizaciones, la recogida y el análisis de los datos de microscopía se llevan a cabo de una manera automatizada.

En ciertas realizaciones, un dato de CTC incluye la detección de uno o más biomarcadores, por ejemplo, CK y CD 45. Un biomarcador se considera "presente" en una célula si es detectable por encima del ruido de fondo del método de detección respectivo usado (p.ej. 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el fondo; p.ej., 2σ o 3σ sobre el fondo). En ciertas realizaciones, un biomarcador se considera "ausente" si no es detectable por encima del ruido de fondo del método de detección usado (p.ej., $<1,5$ veces o $<2,0$ veces mayor que la señal de fondo; p.ej., $<1,5\sigma$ o $<2,0\sigma$ sobre el fondo).

En ciertas realizaciones, la presencia o ausencia de marcadores inmunofluorescentes en las células nucleadas se determina seleccionando los tiempos de exposición durante el proceso de barrido de fluorescencia, de forma que todos los marcadores inmunofluorescentes alcanzan un nivel preseleccionado de fluorescencia en los GBs del campo de visión. En estas condiciones, los marcadores inmunofluorescentes específicos de CTCs, incluso aunque estén ausentes en los GBs, son visibles en los GBs como señales de fondo con alturas fijadas. Además, los marcadores inmunofluorescentes específicos de GBs que están ausentes en las CTCs son visibles en las CTCs como señales de fondo con alturas fijadas. Una célula se considera positiva para un marcador inmunofluorescente (es decir, el marcador se considera presente) si su señal fluorescente para el marcador respectivo es significativamente mayor que la señal de fondo fijada (p.ej., 2 veces, 3 veces, 5 veces, o 10 veces mayor que el fondo; p.ej., 2σ o 3σ sobre el fondo). Por ejemplo, una célula nucleada se considera positiva para CD 45 (CD 45⁺) si su señal fluorescente para CD 45 es significativamente mayor que la señal de fondo. Una célula se considera negativa para un marcador inmunofluorescente (es decir, el marcador se considera ausente) si la señal de fluorescencia de la célula para el marcador respectivo no es significativamente mayor que la señal de fondo (p.ej., $<1,5$ veces o $<2,0$ veces mayor que la señal de fondo; p.ej., $<1,5\sigma$ o $<2,0\sigma$ sobre el fondo).

En general, cada campo microscópico contiene tanto CTCs como GBs. En ciertas realizaciones, el campo microscópico muestra al menos 1, 5, 10, 20, 50, o 100 CTCs. En ciertas realizaciones, el campo microscópico muestra al menos 10, 25, 50, 100, 250, 500, o 1.000 veces más GBs que CTCs. En ciertas realizaciones, el campo microscópico comprende una o más CTCs o agrupamientos de CTCs rodeados por al menos 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1.000 o más GBs.

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la generación de los datos de CTCs comprende la enumeración de las CTCs que están presentes en la muestra de sangre. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen la detección de al menos 1,0 CTC/mL de sangre, 1,5 CTCs/mL de sangre, 2,0 CTCs/mL de sangre, 2,5 CTCs/mL de sangre, 3,0 CTCs/mL de sangre, 3,5 CTCs/mL de sangre, 4,0 CTCs/mL de sangre, 4,5 CTCs/mL de sangre, 5,0 CTCs/mL de sangre, 5,5 CTCs/mL de sangre, 6,0 CTCs/mL de sangre, 6,5 CTCs/mL de sangre, 7,0 CTCs/mL de sangre, 7,5 CTCs/mL de sangre, 8,0 CTCs/mL de sangre, 8,5 CTCs/mL de sangre, 9,0 CTCs/mL de sangre, 9,5 CTCs/mL de sangre, 10 CTCs/mL de sangre, o más.

En ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la generación de los datos de CTCs comprende la detección de diferentes subtipos de CTCs, que incluyen las CTCs no tradicionales. En ciertas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria incluyen la detección de al menos 0,1 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,2 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,3 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,4 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,5 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,6 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,7 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,8 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 0,9 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 1 agrupamiento de CTCs/mL de sangre, 2 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 3 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 4 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 5 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 6 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 7 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 8 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 9 agrupamientos de CTCs/mL de sangre, 10 agrupamientos/mL o más. En una realización particular, los métodos descritos en la presente memoria incluyen la detección de al menos 1 agrupamiento de CTCs/mL de sangre.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm incluyen el uso de un modelo predictivo. En las realizaciones adicionales, los métodos descritos para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm incluyen comparar una característica medible con una característica de referencia. Como pueden apreciar los expertos en la técnica, tal comparación puede ser una comparación directa con la característica de referencia o una comparación indirecta, donde se ha incorporado la característica de referencia en el modelo predictivo. En las realizaciones adicionales, el análisis de una característica medible para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm incluye uno o más de un modelo de análisis discriminante lineal, un algoritmo de clasificación de máquinas vectoriales de soporte, un modelo de eliminación de características recursivas, un análisis de predicción de un modelo de micromatrices, un modelo de regresión logística, un algoritmo CART, un algoritmo FlexTree, un algoritmo LART, un algoritmo de bosque aleatorio, un algoritmo MART, un algoritmo de aprendizaje automatizado, un método de regresión penalizada, o una combinación de los mismos. En las realizaciones particulares, el análisis comprende la regresión logística. En las realizaciones adicionales, la identificación de la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm se expresa en forma de una puntuación de riesgo.

Un proceso de clasificación analítica puede usar cualquiera de una diversidad de métodos analíticos estadísticos para manipular los datos cuantitativos y proporcionar la clasificación de la muestra. Los ejemplos de los métodos útiles incluyen el análisis discriminante lineal, la eliminación de características recursivas, un análisis de predicción de micromatrices, una regresión logística, un algoritmo CART, un algoritmo FlexTree, un algoritmo LART, un algoritmo de bosque aleatorio, un algoritmo MART, algoritmos de aprendizaje automatizado y otros métodos conocidos para los expertos en la técnica.

La clasificación se puede hacer según métodos de modelización predictivos que establecen un umbral para determinar la probabilidad de que una muestra pertenezca a una clase concreta. La probabilidad es preferiblemente de al menos un 50%, o al menos un 60%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90%, o más. Las clasificaciones también se pueden hacer determinando si una comparación entre un conjunto de datos obtenido y un conjunto de datos de referencia proporciona una diferencia estadísticamente significativa. En ese caso, la muestra de la que se obtuvo el conjunto de datos se clasifica como no perteneciente a la clase del conjunto de datos de referencia. A la inversa, si en tal comparación no hay una diferencia estadísticamente significativa respecto del conjunto de datos de referencia, la muestra de la que se obtuvo el conjunto de datos se clasifica como perteneciente a la clase del conjunto de datos de referencia.

La capacidad predictiva de un modelo se puede evaluar según su capacidad de proporcionar una métrica de calidad, p.ej. AUROC (área bajo la curva ROC) o exactitud, de un valor particular, o intervalo de valores. Las medidas del área bajo la curva son útiles para comparar la exactitud de un clasificador a lo largo de todo el intervalo de datos. Los clasificadores con una mayor AUC tienen una capacidad mayor de clasificar correctamente incógnitas entre dos grupos de interés. El análisis de ROC se puede usar para seleccionar el umbral óptimo bajo una diversidad de circunstancias clínicas, equilibrando el balance inherente que existe entre especificidad y sensibilidad. En ciertas realizaciones, un umbral de calidad deseado es un modelo predictivo que clasificará una muestra con una exactitud de al menos alrededor de 0,7, al menos alrededor de 0,75, al menos alrededor de 0,8, al menos alrededor de 0,85, al menos alrededor de 0,9, al menos alrededor de 0,95, o más. Como medida alternativa, un umbral de calidad deseado puede referirse a un modelo predictivo que clasificará una muestra con un AUC de al menos alrededor de 0,7, al menos alrededor de 0,75, al menos alrededor de 0,8, al menos alrededor de 0,85, al menos alrededor de 0,9, o más.

Como se conoce en la técnica, la sensibilidad y especificidad relativas de un modelo predictivo se puede ajustar para favorecer la métrica de especificidad o la métrica de sensibilidad, donde las dos métricas tienen una relación inversa. Los límites en un modelo como se describió anteriormente se pueden ajustar para proporcionar un nivel de sensibilidad o especificidad seleccionado, dependiendo de las necesidades particulares del ensayo que se está llevando a cabo. Una o ambas de la sensibilidad y la especificidad pueden ser de al menos alrededor de 0,7, al menos alrededor de 0,75, al menos alrededor de 0,8, al menos alrededor de 0,85, al menos alrededor de 0,9, o más.

Los datos en bruto se pueden analizar inicialmente midiendo los valores para cada característica o biomarcador medible, normalmente por triplicado o en múltiples triplicados. Los datos se pueden manipular, por ejemplo, los datos en bruto se pueden transformar mediante el uso de curvas patrón, y se puede usar la media de las medidas por triplicado para calcular la media y la desviación estándar para cada paciente. Estos valores se pueden transformar antes de usarlos en los modelos, p.ej. transformarlos logarítmicamente, transformarlos mediante el método de Box-Cox (Box y Cox, Royal Stat. Soc., Series B, 26:211-246(1964)). Los datos se introducen después en un modelo predictivo, que clasificará la muestra según el estado. La información resultante se puede comunicar a un paciente o profesional sanitario.

En ciertas realizaciones, el método descrito en la presente memoria para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm tiene una especificidad de >60%, >70%, >80%, >90% o más. En las realizaciones adicionales, el método para identificar de manera prospectiva la resistencia *de novo* a las terapias selectivas del RA en un paciente de CPRCm tiene una especificidad >90% a un umbral de clasificación de 7,5 CTCs/mL de sangre.

Como entenderán los expertos en la técnica, un proceso de clasificación analítica puede usar cualquiera de una diversidad de métodos analíticos estadísticos para manipular los datos cuantitativos y proporcionar la clasificación de la muestra. Los ejemplos de los métodos útiles incluyen, sin limitación, el análisis discriminante lineal, la eliminación de características recursivas, un análisis de predicción de micromatrices, una regresión logística, un algoritmo CART, un algoritmo FlexTree, un algoritmo LART, un algoritmo de bosque aleatorio, un algoritmo MART, y algoritmos de aprendizaje automatizado.

A partir de la descripción anterior, será evidente que se pueden hacer variaciones y modificaciones a la invención descrita en la presente memoria para adaptarla a diversos usos y condiciones.

La enumeración de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente memoria incluye las definiciones de esa variable como cualquier elemento individual o combinación (o subcombinación) de elementos enumerados. La enumeración de una realización en la presente memoria incluye esa realización en forma de cualquier realización individual o en combinación con cualesquiera otras realizaciones o porciones de las mismas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, no de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Características de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva de andrógenos (Tto. del RA) por medio de análisis de las células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm)

Este ejemplo demuestra que los pacientes que no responden a las terapias selectivas del RA demostraron una mayor heterogeneidad de subpoblaciones de CTCs en comparación con los pacientes que respondieron a las terapias selectivas del RA.

Se llevó a cabo la evaluación de las muestras con respecto a las CTCs como se informó previamente mediante el uso de la plataforma de Epic Sciences. Marrinucci *et al.* Phys Biol 9:016003, 2012. La Figura 2 muestra un esquema de recogida de CTCs de Epic y el proceso de detección, que se desarrolla como sigue: (1) Sangre lisada, células nucleadas de la muestra de sangre colocadas sobre portaobjetos; (2) Portaobjetos almacenados en un biorrepositorio a -80 °C; (3) Portaobjetos teñidos con CK, CD45, DAPI y RA; (4) Portaobjetos sometidos a un barrido; (5) Análisis mediante algoritmos de patología digitales multiparamétricos, y (6) Confirmación informática y mediante un lector humano de las CTCs y cuantificación de la expresión de los biomarcadores. Se recogieron 85 muestras de sangre de pacientes de CPRCm inmediatamente antes del tratamiento con Acetato de Abiraterona + Prednisona (A), Enzalutamida (E) o taxano (T), y se examinaron las CTCs totales, las subpoblaciones específicas de CTCs y la expresión proteica de RA de las CTCs. Los resultados se correlacionaron con los patrones de las respuestas a las terapias dirigidas a la señalización del RA medidas mediante los cambios del PSA (Figura 1). Los pacientes de A, E o T se clasificaron según la Figura 1 como: Pacientes con respuesta (n=39) que incluyeron: respuesta verdadera (n=15) resistencia adquirida (n=24). Pacientes sin respuesta (n=46): resistencia *de novo*

Las Figuras 1 a 7 y 15 describen los detalles experimentales adicionales.

Las muestras de sangre se sometieron a hemólisis, centrifugación, resuspensión y colocación sobre portaobjetos, seguido de almacenamiento a -80 °C. Antes del análisis, se descongelaron los portaobjetos, se marcaron mediante inmunofluorescencia (pancitoqueratina, CD45, DAPI y RA) y se obtuvieron imágenes mediante fluoroscopia automatizada y después validación manual mediante un técnico patólogo experto (MSL). Marrinucci *et al.* Phys Biol 9:016003, 2012. Las intensidades de DAPI (+), CK (+) y CD45 (-) se clasificaron como características durante la enumeración de HD-CTCs como se describió previamente.

El estudio descrito en este ejemplo demuestra que no existe una diferencia significativa en el número de CTCs/7,5 mL o CTCs no tradicionales/7,5 mL de sangre de los pacientes entre el resultado de la terapia del RA o la terapia con taxano. Por tanto, la frecuencia de CTCs/7,5 mL o de CTCs no tradicionales/7,5 mL no predice la resistencia a Abiraterona, Enzalutamida o taxano.

El estudio también muestra que la sensibilidad a Abiraterona o Enzalutamida se puede evaluar a partir de la extracción de sangre inicial por medio de la medida de CTCs individuales de:

1. La heterogeneidad de las CTCs
2. La frecuencia de CTCs positivas para citoqueratina, positivas para el extremo N-terminal del RA, con una morfología de nucleolos prominentes
3. Pérdida del extremo C-terminal del RA

El estudio descrito en este ejemplo demuestra que el perfil de CTCs de la sensibilidad a Abiraterona y Enzalutamida de la enfermedad resistente no predice la sensibilidad a la terapia con taxano, lo que confirma que los métodos descritos posibilitan la selección del tratamiento basándose en los distintivos predictivos descritos en la presente memoria.

El estudio también muestra que los pacientes que no responden a las terapias selectivas del RA demostraron una mayor heterogeneidad de subpoblaciones de CTCs en comparación con los pacientes que respondieron a las terapias selectivas del RA.

5 El estudio demuestra además que se puede utilizar la caracterización de CTCs individuales para medir la heterogeneidad de las subpoblaciones de CTCs para predecir la resistencia a las terapias selectivas del RA.

El estudio también demuestra que se puede utilizar la expresión epitelial, la tinción del extremo N-terminal del receptor de andrógenos y la evaluación morfológica de las CTCs para predecir la respuesta a las terapias selectivas del RA.

10 El estudio también muestra que, aunque el distintivo para la resistencia a la terapia del RA no está asociado a la resistencia a taxano, se puede conseguir la optimización de un distintivo para la resistencia a la terapia del RA y la respuesta a taxano.

Ejemplo 2. Caracterización de células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm) en terapias sistémicas de primera, segunda y tercera línea

15 Las terapias dirigidas a la señalización de andrógenos recién aprobadas (Terapia del RA), que incluyen Acetato de Abiraterona más Prednisona (A) y Enzalutamida (E), prolongan la supervivencia de los pacientes de CPRCm. Este ejemplo demuestra que, al usarlas de manera secuencial, la respuesta a E administrada tras A tiene una duración más corta y menos frecuente. La selección de los pacientes con mayor probabilidad de beneficiarse de las nuevas terapias específicas es necesaria para desarrollar tratamientos más eficaces. Este ejemplo muestra además la evolución de los fenotipos de las CTCs junto con la expresión del RA y la localización del RA en pacientes que recibieron la 1ª, 2ª, y 3ª línea de terapia sistémica para el CPRCm.

20 Se llevó a cabo la evaluación de las muestras con respecto a las CTCs como se informó previamente mediante el uso de la plataforma de Epic Sciences. Marrinucci *et al.* Phys Biol 9:016003, 2012. La Figura 2 muestra un esquema de recogida de CTCs de Epic y el proceso de detección, que se desarrolla como sigue: (1) Sangre lisada, células nucleadas de la muestra de sangre colocadas sobre portaobjetos; (2) Portaobjetos almacenados en un biorrepositorio a -80 °C; (3) Portaobjetos teñidos con CK, CD45, DAPI y RA; (4) Portaobjetos sometidos a un barrido; (5) Análisis mediante algoritmos de patología digitales multiparamétricos, y (6) Confirmación informática y mediante un lector humano de las CTCs y cuantificación de la expresión de los biomarcadores. Se extrajeron 117 muestras de sangre de 112 pacientes individuales (58 sin terapia anterior, 33 que fracasaron en 1 terapia anterior y 27 que fracasaron en 2+ terapias anteriores) para el análisis de las CTCs mediante la utilización de la plataforma de Epic Sciences. El análisis de Epic incluyó la identificación de los subtipos de CTCs como se describe a continuación: Además, se determinó la expresión de RA en las CTCs, la localización subcelular del RA y la morfología celular observada (tamaño, nucleolos, puntos de CK). Los datos de CTCs y de los pacientes de todas las muestras de los pacientes se compararon entre los grupos de tratamiento (sin terapia anterior, terapia de 1ª línea fracasada o terapia de 1ª y 2ª línea fracasada) y los subgrupos representativos de regímenes clínicos específicos.

Las Figuras 8 a 14 y 16 describen los detalles experimentales adicionales.

35 El estudio descrito en este ejemplo demuestra que el número total de CTCs tradicionales y no tradicionales se incrementa a medida que se incrementa el número de terapias sistémicas administradas. (Sin terapia anterior, 1ª línea fracasada, o 1ª y 2ª línea fracasada).

40 Los resultados demuestran además que el número de CTCs, los subtipos de las CTCs y los fenotipos de las CTCs es sumamente variable en cada uno de los puntos de decisión de tratamiento estudiados. (Sin terapia anterior, 1ª línea fracasada, o 1ª y 2ª línea fracasada).

Los resultados también muestran que la heterogeneidad de las subpoblaciones de CTCs no tradicionales se incrementa con la 1ª, 2ª o 3ª líneas de terapia sistémica (Sin terapia anterior, 1ª línea fracasada, o 1ª y 2ª línea fracasada).

45 Los resultados también demuestran que se observan más fenotipos de CTCs únicos a medida que se administran las terapias sucesivas: (a) Los fenotipos de CTCs incrementados incluyen: CTCs con nucleolos, agrupamientos de CTCs, CTCs CK-, CTCs con un patrón punteado de CK, CTCs pequeñas, CTCs con RA nuclear, CTCs con RA citoplasmático. El incremento en los fenotipos es coherente con un tumor más heterogéneo. Los resultados también demuestran que el seguimiento de la evolución y la caracterización directa de los fenotipos hace posible que los métodos descritos en la presente memoria proporcionen un manejo más eficaz del tratamiento.

50 Los resultados demuestran además que el porcentaje de pacientes con los fenotipos de CTCs asociados a la resistencia *de novo* se incrementa a medida que se incrementa el número de terapias sistémicas administradas.

Los resultados también muestran que una prevalencia creciente de las CTCs con RA nuclear tras A o E puede identificar a los pacientes con una señalización de andrógenos constitutivamente activa.

La enumeración de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente memoria incluye las

definiciones de esa variable como cualquier elemento individual o combinación (o subcombinación) de elementos enumerados. La enumeración de una realización en la presente memoria incluye esa realización en forma de cualquier realización individual o en combinación con cualesquiera otras realizaciones o porciones de las mismas.

- 5 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria como referencia igual que si se indicase específicamente e individualmente que cada patente y publicación independiente se incorpora como referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA) en un tumor de un paciente con cáncer de próstata que comprende
 - 5 (a) llevar a cabo un análisis directo que comprende la tinción inmunofluorescente y la caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida del paciente para generar datos de las células tumorales circulantes (CTCs), en donde el análisis comprende determinar una característica medible de un panel de biomarcadores de CTCs tradicionales y no tradicionales de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del receptor de andrógenos (RA),
10 en donde los biomarcadores comprenden (1) la heterogeneidad de las CTCs, (2) la frecuencia de CTCs positivas para citoqueratina (CK+), positivas para el extremo N-terminal del RA, con una morfología de nucleolos prominentes, y (3) la frecuencia de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA, y
en donde la heterogeneidad de las CTCs comprende biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CTCs tradicionales, agrupamientos de CTCs, CTCs CK-, CTCs pequeñas, CTCs nucleolos+, CTCs con un patrón punteado de CK y
15 (b) evaluar los datos de CTCs para determinar la probabilidad de la resistencia *de novo* a la terapia selectiva del RA en el tumor del paciente con cáncer de próstata,
en donde (1) la mayor heterogeneidad de las CTCs, (2) la frecuencia incrementada de CTCs CK+, positivas para el extremo N-terminal del RA con una morfología de nucleolos prominentes, o (3) la frecuencia incrementada de CTCs con truncamientos en el extremo C-terminal del RA, en comparación con los pacientes que responden a la terapia del
20 RA, predice la resistencia *de novo* a la terapia del RA.
 2. El método de la reivindicación 1, en donde la tinción inmunofluorescente comprende la tinción de células nucleadas que comprende pancitoqueratina, el cúmulo de diferenciación (CD) 45, diamidino-2-fenilindol (DAPI) y RA.
 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende una etapa inicial de depósito de las células nucleadas en forma de una monocapa sobre un portaobjetos.
 - 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm).
 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los datos de CTCs se generan mediante microscopía de barrido de fluorescencia.
 6. El método de la reivindicación 5, en donde la microscopía proporciona un campo de visión que comprende tanto CTCs como al menos 200 glóbulos blancos (GBs) del entorno.
 - 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde los datos de CTCs se generan estudiando al menos 4 millones de las células nucleadas.
 8. El método de la reivindicación 5, en donde las CTCs comprenden una tinción inmunofluorescente diferente de las células nucleadas del entorno; o en donde las CTCs comprenden características morfológicas diferentes en comparación con las células nucleadas del entorno.
 - 35 9. El método de la reivindicación 8, en donde las características morfológicas comprenden una o más del grupo que consiste en el tamaño del núcleo, la forma del núcleo, la presencia de orificios en el núcleo, el tamaño de la célula, la forma de la célula y la proporción nuclear/citoplasmática, el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucleolos, la calidad del citoplasma y la cantidad de citoplasma.
 - 40 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la identificación de las CTCs comprende además comparar la intensidad de la tinción fluorescente de pancitoqueratina con las células nucleadas del entorno.
 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además:
 - (a) una etapa inicial de obtención de un recuento de glóbulos blancos (GB) para la muestra de sangre;
 - (b) una etapa inicial de lisado de los eritrocitos de la muestra de sangre; y/o
 - 45 (c) una etapa inicial de depósito de las células nucleadas de la muestra de sangre en forma de una monocapa sobre un portaobjetos de vidrio.
 12. El método de la reivindicación 11, que comprende además depositar entre alrededor de 2 millones y alrededor de 3 millones de células sobre el portaobjetos de vidrio.
 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la generación de los datos de CTCs

comprende la enumeración de las CTCs en la muestra de sangre.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde las características medibles se analizan mediante el uso de un modelo predictivo.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el modelo es un modelo multivariante.

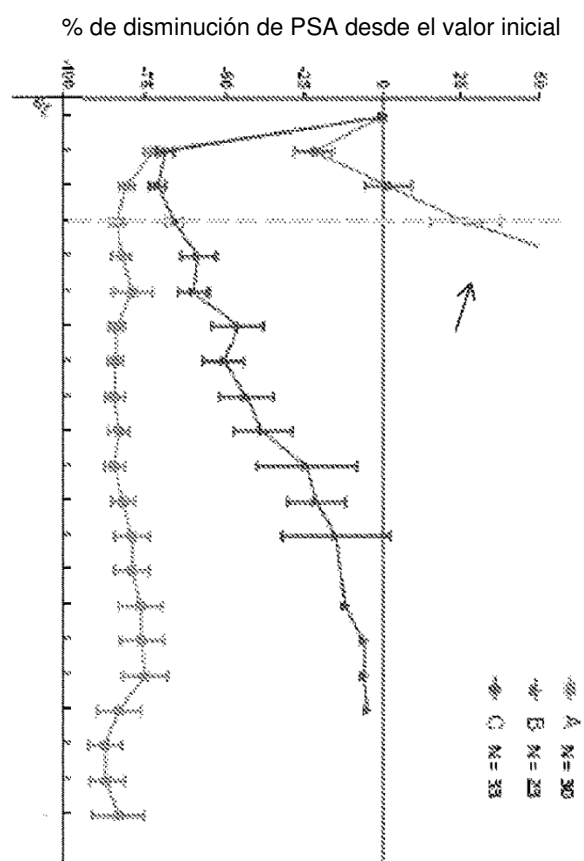
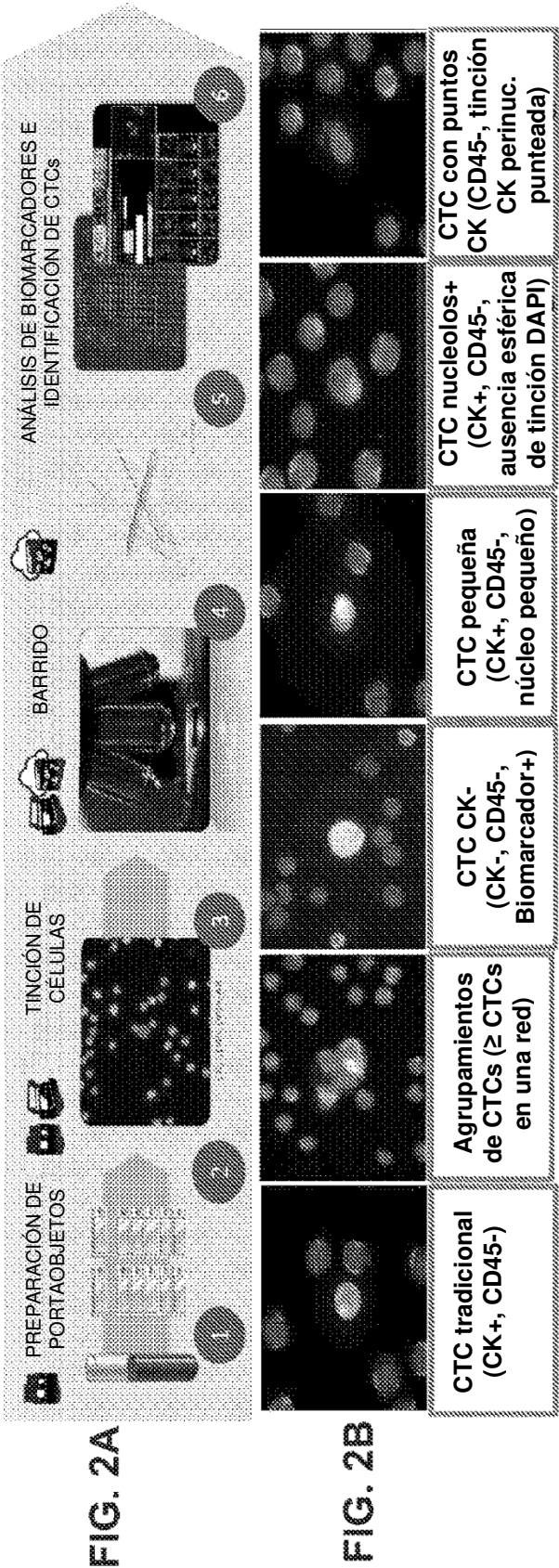


FIG. 1

Enfoque sin enriquecimiento



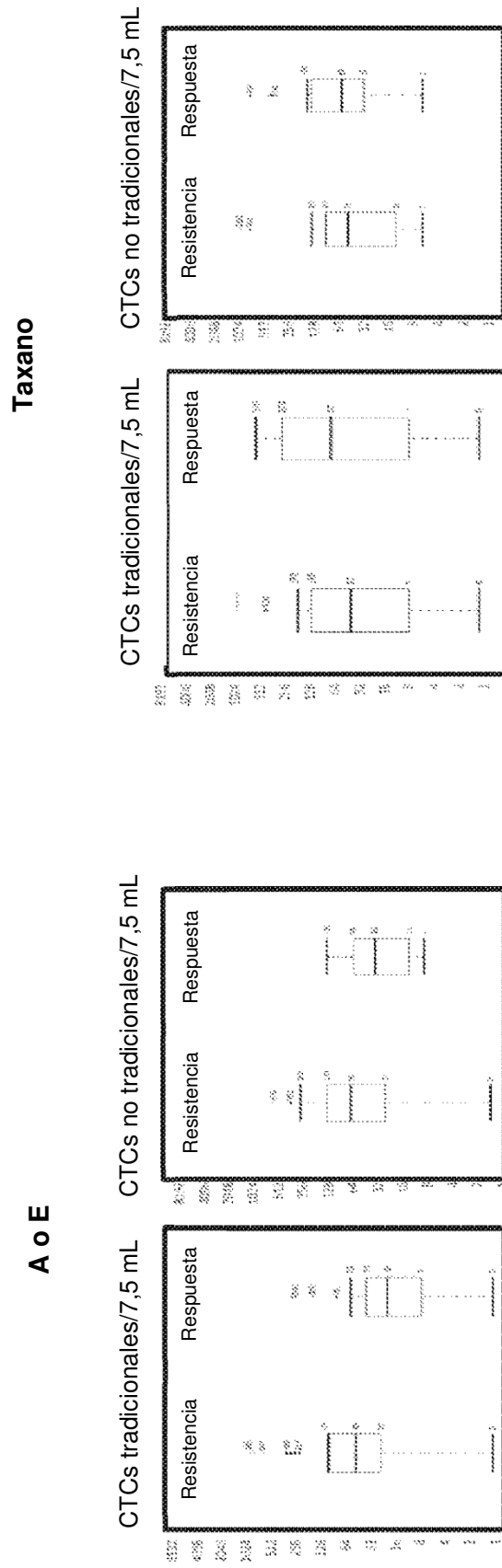


FIG. 3

AYE		Resultado	Tipos de CTCs		Actividad de RA		Características de CTCs				Artefacto morfológico				Elementos predictivos del Tto. del RA					
Clase de respuesta	ID del paciente	Cambio de PSA desde el valor inicial (%)	CTCs total	Subtipos de CTCs	Media (expr. de RA)	CTC RA+/7,5 mL	CTC RA-/7,5 mL	Área celular pequeña/7,5 mL	Área celular media/7,5 mL	Área celular grande/7,5 mL	Área celular gigante/7,5 mL	Nucleolos-/7,5 mL	Nucleolos+/7,5 mL	Nucleolos++/7,5 mL	Punteado CK-/7,5 mL	Punteado CK+/7,5 mL	Puntuación de heterogeneidad de CTCs	Pérdida C-Term. RA (1 = Pérd., 0 = Normal)	[CK++]/[RA+]/nucleolos++/7,5 mL	
Resistencia	CTC-12-0001	77%	29	28	0	3	4,337	27	77	0	0	19	0	0	0	0	18	0	0	
	CTC-12-0002	100%	16	66	0	0	4,337	27	77	0	0	19	0	0	0	0	17	0	0	
	CTC-12-0003	100%	44	38	0	0	5,35	25	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	
	CTC-12-0004	100%	146	64	0	0	6,729	119	27	64	71	0	45	18	73	137	0	25	12	
	CTC-12-0005	100%	375	375	0	0	11,826	169	278	17	308	14	0	68	89	119	847	0	38	12
	CTC-12-0006	100%	125	62	0	0	4,132	102	26	11	53	0	0	22	5	28	54	5	23	1
	CTC-12-0007	487%	87	48	3	35	6,729	87	41	5	81	0	0	15	12	61	97	0	25	1
	CTC-12-0008	487%	66	44	1	25	4,434	55	11	11	15	0	14	7	55	66	0	18	0	
	CTC-12-0009	100%	151	99	3	48	10,389	27	77	107	48	0	0	92	25	38	153	0	31	0
	CTC-12-0010	100%	158	158	5	24	4,534	28	53	19	34	0	0	28	14	58	53	0	21	0
	CTC-12-0011	50%	72	60	0	12	7,585	48	24	0	74	0	0	12	0	80	79	0	18	0
	CTC-12-0012	50%	493	275	63	190	4,764	53	425	25	383	50	0	112	145	159	375	19	27	0
	CTC-12-0013	77%	162	91	12	03	6,607	95	67	67	99	2	7	57	70	89	161	0	34	0
	CTC-12-0014	58%	37	28	0	18	5,686	11	21	11	18	5	5	18	0	21	30	0	20	0
	CTC-12-0015	68%	279	247	0	32	8,235	19	203	130	150	1	0	231	67	8	279	0	22	0
	CTC-12-0016	50%	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0
	CTC-12-0017	42%	164	135	5	16	7,727	24	120	26	181	5	0	43	34	85	179	18	20	0
	CTC-12-0018	48%	82	45	6	18	5,1	6	57	14	23	0	0	45	5	7	57	0	24	0
	CTC-12-0019	41%	12	12	0	0	16	0	4	0	0	0	0	12	0	0	12	0	11	0
	CTC-12-0020	28%	32	18	0	18	4,1	11	11	11	11	0	0	11	0	11	22	0	11	0
Respuesta	CTC-12-0021	20%	192	882	6	73	17,58	294	185	108	204	10	6	219	91	653	907	24	30	0
	CTC-12-0022	2%	10	6	0	5	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0
	CTC-12-0023	4%	360	288	0	47	16,28	242	90	85	294	4	0	61	87	238	345	4	24	0
	CTC-12-0024	10%	84	64	0	18	9,87	22	43	16	43	0	5	28	4	27	60	0	23	0
	CTC-12-0025	14%	37	38	0	18	8,697	47	6	18	38	1	0	65	8	75	56	0	11	0
	CTC-12-0026	15%	16	16	0	7	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	CTC-12-0027	26%	31	38	0	19	3,87	15	28	18	32	0	0	42	15	7	57	0	15	0
	CTC-12-0028	28%	62	45	0	17	4,28	17	45	20	34	0	0	42	15	7	57	0	15	0
	CTC-12-0029	28%	18	18	0	8	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0
	CTC-12-0030	28%	32	18	0	18	4,1	11	11	11	11	0	0	11	0	11	22	0	11	0
	CTC-12-0031	20%	192	882	6	73	17,58	294	185	108	204	10	6	219	91	653	907	24	30	0
	CTC-12-0032	2%	10	6	0	5	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0
	CTC-12-0033	4%	360	288	0	47	16,28	242	90	85	294	4	0	61	87	238	345	4	24	0
	CTC-12-0034	10%	84	64	0	18	9,87	22	43	16	43	0	5	28	4	27	60	0	23	0
	CTC-12-0035	14%	37	38	0	18	8,697	47	6	18	38	1	0	65	8	75	56	0	11	0
	CTC-12-0036	15%	16	16	0	7	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	CTC-12-0037	26%	31	38	0	19	3,87	15	28	18	32	0	0	42	15	7	57	0	15	0
	CTC-12-0038	28%	62	45	0	17	4,28	17	45	20	34	0	0	42	15	7	57	0	15	0
	CTC-12-0039	28%	18	18	0	8	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0
	CTC-12-0040	28%	32	18	0	18	4,1	11	11	11	11	0	0	11	0	11	22	0	11	0
CTC-12-0041	20%	192	882	6	73	17,58	294	185	108	204	10	6	219	91	653	907	24	30	0	
CTC-12-0042	2%	10	6	0	5	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
CTC-12-0043	4%	360	288	0	47	16,28	242	90	85	294	4	0	61	87	238	345	4	24	0	
CTC-12-0044	10%	84	64	0	18	9,87	22	43	16	43	0	5	28	4	27	60	0	23	0	
CTC-12-0045	14%	37	38	0	18	8,697	47	6	18	38	1	0	65	8	75	56	0	11	0	
CTC-12-0046	15%	16	16	0	7	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	
CTC-12-0047	26%	31	38	0	19	3,87	15	28	18	32	0	0	42	15	7	57	0	15	0	
CTC-12-0048	28%	62	45	0	17	4,28	17	45	20	34	0	0	42	15	7	57	0	15	0	
CTC-12-0049	28%	18	18	0	8	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	
CTC-12-0050	28%	32	18	0	18	4,1	11	11	11	11	0	0	11	0	11	22	0	11	0	
CTC-12-0051	20%	192	882	6	73	17,58	294	185	108	204	10	6	219	91	653	907	24	30	0	
CTC-12-0052	2%	10	6	0	5	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
CTC-12-0053	4%	360	288	0	47	16,28	242	90	85	294	4	0	61	87	238	345	4	24	0	
CTC-12-0054	10%	84	64	0	18	9,87	22	43	16	43	0	5	28	4	27	60	0	23	0	
CTC-12-0055	14%	37	38	0	18	8,697	47	6	18	38	1	0	65	8	75	56	0	11	0	
CTC-12-0056	15%	16	16	0	7	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	
CTC-12-0057	26%	31	38	0	19	3,87	15	28	18	32	0	0	42	15	7	57	0	15	0	
CTC-12-0058	28%	62	45	0	17	4,28	17	45	20	34	0	0	42	15	7	57	0	15	0	
CTC-12-0059	28%	18	18	0	8	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	
CTC-12-0060	28%	32	18	0	18	4,1	11	11	11	11	0	0	11	0	11	22	0	11	0	
CTC-12-0061	20%	192	882	6	73	17,58	294	185	108	204	10	6	219	91	653	907	24	30	0	
CTC-12-0062	2%	10	6	0	5	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
CTC-12-0063	4%	360	288	0	47	16,28	242	90	85	294	4	0	61	87	238	345	4	24	0	
CTC-12-0064	10%	84	64	0	18	9,87	22	43	16	43	0	5	28	4	27	60	0	23	0	
CTC-12-0065	14%	37	38	0	18	8,697	47	6	18	38	1	0	65	8	75	56	0	11	0	
CTC-12-0066	15%	16	16	0	7	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	
CTC-12-0067	26%	31	38	0	19	3,87	15	28	18	32	0	0	42	15	7	57	0	15	0	
CTC-12-0068	28%	62	45	0	17	4,28	17	45	20	34	0	0	42	15	7	57	0	15	0	
CTC-12-0069	28%	18	18	0	8	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	
CTC-12-0070	28%	32	18	0	18	4,1	11	11	11	11	0	0	11	0	11	22	0	11	0	
CTC-12-0071	20%	192	882	6	73	17,58	294	185	108	204	10	6	219	91	653	907	24	30	0	
CTC-12-0072	2%	10	6	0	5	8,105	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	
CTC-12-0073	4%	360	288	0	47	16,28	242	90	85	294	4	0	61	87	238	345	4	24	0	

TAXANO		Tipos de CTCs				Características de CTCs										Elementos predictivos																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
Clase de resp.	ID del paciente	Resultado	CTCs totales	Subtipos de CTCs	Media (expresión de RA)	Actividad de RA		Tamaño celular				Artefacto morfológico		Puntuación de heterogeneidad de CTCs	Pérdida C-Term. RA (1 = Pérd., 0 = Normal)	[CK+++][RA+][nucleolos+++]/7,5 mL																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
		Cambio de PSA desde el valor inicial (%)	Nº total de CTCs/7,5 mL	[CTCs trad.]/7,5 mL		[Agrup. de CTCs]/7,5 mL	[CTC CK-]/7,5 mL	[CTC RA+]/7,5 mL	[CTC RA-]/7,5 mL	Área celular pequeña/7,5 mL	Área celular media/7,5 mL	Área celular grande/7,5 mL	Área celular gigante/7,5 mL				Nucleolos-/7,5 mL	Nucleolos+/7,5 mL	Nucleolos++/7,5 mL	Punteado CK-/7,5 mL	Punteado CK+/7,5 mL																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Resistencia																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																</

FIG. 5

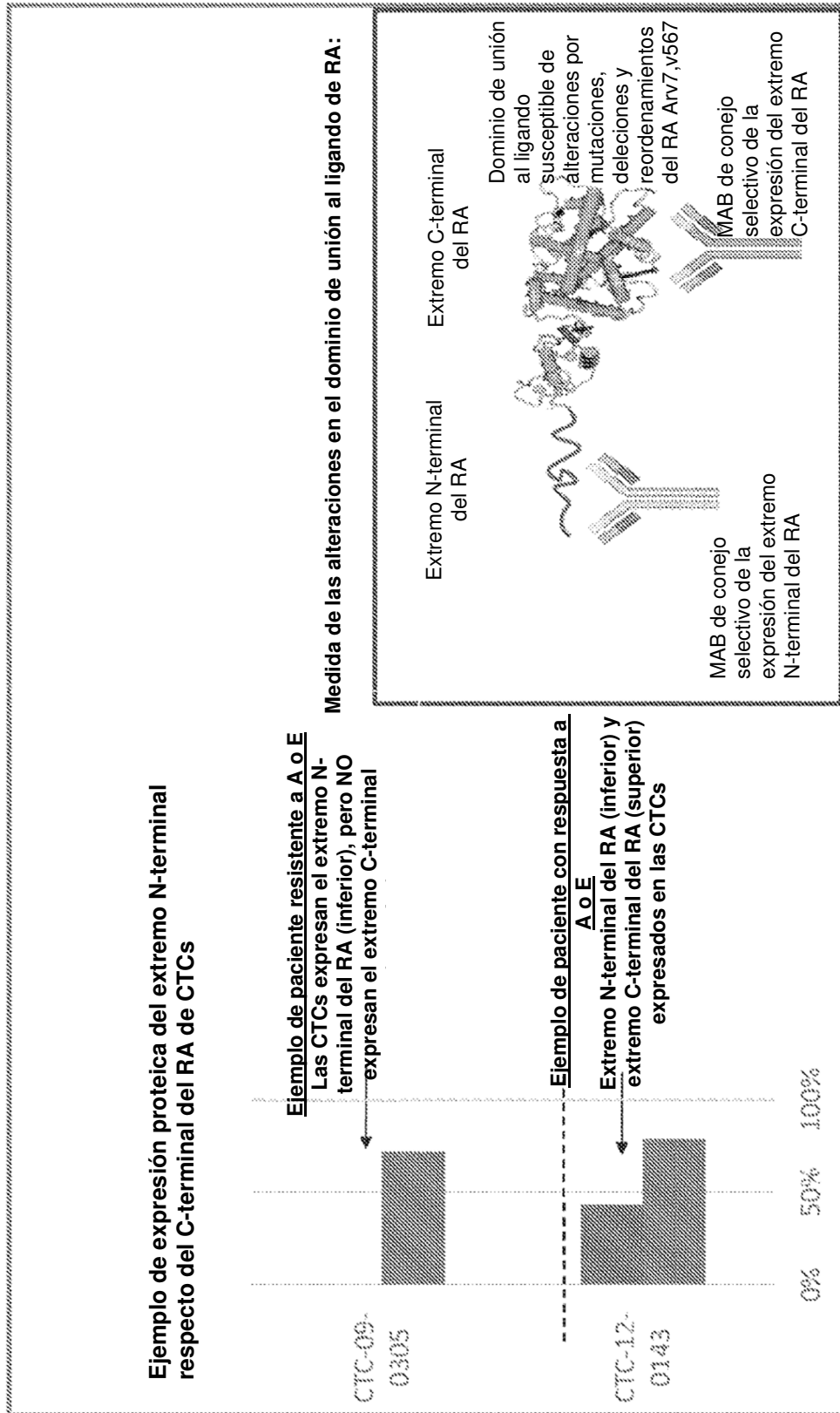


FIG. 6

FIG. 7A

Los biomarcadores de CTCs predicen la enfermedad resistente a A o E con la muestra de sangre inicial			
Biomarcador	Tasa de probabilidad	Valor p	
Heterogeneidad de CTCs	4.2	0.05	
Frecuencia de CTCs CK+/RA+/Nucleolos+	8.531	0.002	
N-term+ del RA con pérdida de C-term del RA	Inf.	0.002	
Biomarcador multivariante	11.9	0.001	

FIG. 7B

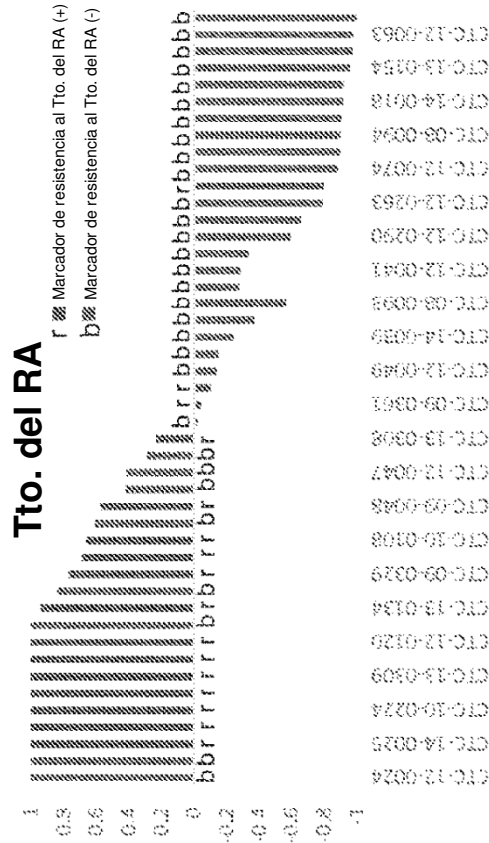
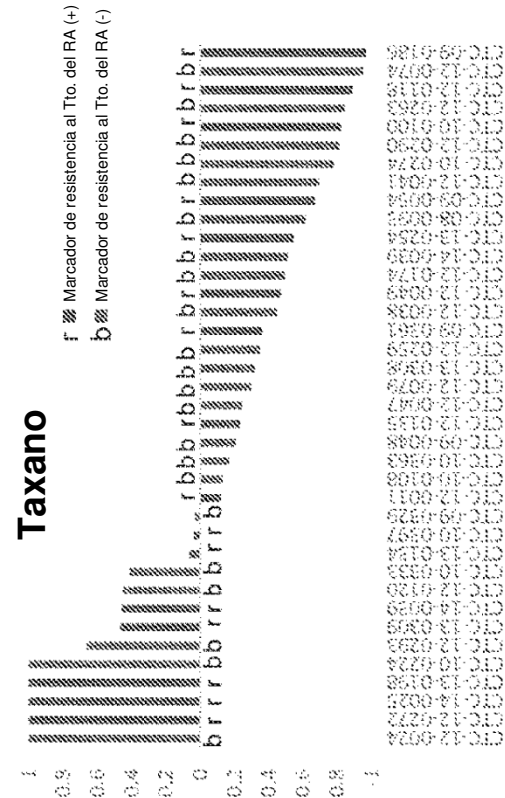


FIG. 7C



CTCs no tradicionales

CTCs tradicionales

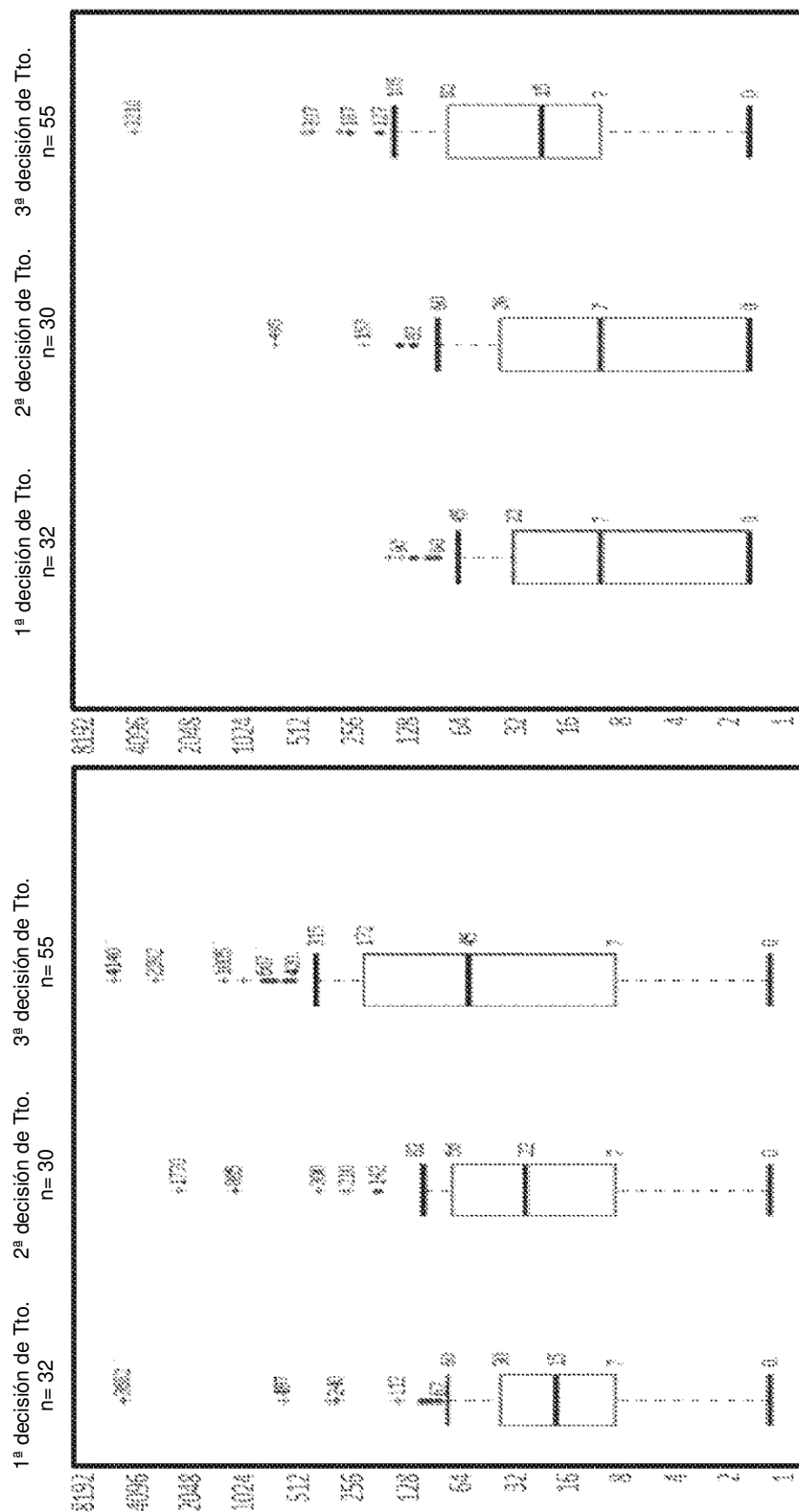


FIG. 8

1ª decisión de Tto.	Resultado	Tipos de CTCs				Características de CTCs										Elementos predictivos					
		CTCs totales	Subtipos de CTCs			Actividad de RA						Tamaño celular						Aterio morfologico			
			[CTCs tradicionales]/7,5 mL	[Agrupamiento]/7,5 mL	[CTC CK-]/7,5 mL	Media (expresión de RA)	[CTC RA+]/7,5 mL	[CTC RA-]/7,5 mL	Área celular pequeña/7,5 mL	Área celular media/7,5 mL	Área celular grande/7,5 mL	Área celular gigante/7,5 mL	Nucleolos-/7,5 mL	Nucleolos+/7,5 mL	Nucleolos++/7,5 mL			Punteado CK-/7,5 mL	Punteado CK+/7,5 mL		
ID del paciente	Disminución máx. de PSA (%)	Nº total de CTCs/7,5 mL																	Puntuación de heterogeneidad de CTCs	[CK++][RA+][nucleolos++]/7,5 mL	
CTC-12-0070	68%	548	448	28	40	5.465	48	826	157	502	5	0	376	28	160	473	0	20	0	17	
CTC-14-0089	60%	22	13	0	9	0	0	20	12	10	5	0	16	0	0	16	0	17	0	2	
CTC-12-0203	100%	128	83	0	83	4.432	100	28	11	89	0	0	32	8	26	27	0	23	16	22	
CTC-10-0108	68%	278	247	0	32	5.028	16	263	120	160	0	0	214	40	6	247	0	26	0	43	
CTC-12-0245	35%	18	18	0	0	0	0	18	0	0	10	5	16	3	0	8	10	15	0	15	
CTC-13-0152	8%	83	83	0	0	3.807	16	68	31	52	0	0	50	16	16	80	0	18	0	1	
CTC-12-0049	18%	22	13	0	11	6.887	17	8	0	6	0	0	6	8	8	8	8	11	0	0	
CTC-14-0039	24%	81	30	0	73	3.987	13	38	19	40	0	0	37	18	6	38	0	18	0	0	
CTC-12-0041	28%	66	46	15	9	0	0	66	5	81	0	0	61	5	0	66	0	15	0	0	
CTC-13-0254	37%	9	0	0	9	0	0	9	0	9	0	0	9	0	0	0	0	1	0	0	
CTC-14-0109	48%	79	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-13-0092	48%	310	280	30	0	5.025	1280	2250	140	1830	0	0	188	310	410	2250	20	28	180	25	
CTC-12-0118	73%	282	217	0	25	8.738	227	35	35	207	10	0	35	16	202	227	0	25	152	0	
CTC-13-0294	81%	80	66	0	60	3.46	6	40	30	68	0	0	41	8	8	46	0	20	0	0	
CTC-12-0074	82%	27	27	0	14	15.67	5	20	0	27	0	0	18	3	8	27	0	15	0	0	
CTC-09-0186	82%	37	23	0	14	6.417	14	28	23	14	0	0	18	0	18	23	0	18	0	0	
CTC-08-0084	82%	70	70	0	32	5.4	15	32	32	54	0	0	35	17	6	25	0	21	0	0	
CTC-14-0018	40%	18	8	0	0	0	0	18	0	18	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	
CTC-10-0365	81%	19	19	0	0	0	0	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-13-0145	83%	32	16	0	0	0	0	23	8	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-13-0154	88%	41	41	0	0	4.846	75	0	13	18	0	0	18	8	6	6	6	16	0	0	
CTC-13-0278	82%	115	113	16	0	4.210	73	112	8	120	0	0	112	0	23	112	22	22	15	0	
CTC-10-0409	82%	13	13	0	0	0	0	13	13	0	0	0	13	0	0	13	0	0	0	0	
CTC-13-0113	82%	283	248	48	57	5.027	17	248	20	284	1	0	186	40	18	248	1	2	0	0	
CTC-09-0253	82%	13	13	0	0	0	0	13	0	13	0	0	11	0	0	11	0	0	0	0	
CTC-12-0063	83%	20	4	0	16	4.885	16	4	0	16	0	0	16	4	0	4	0	15	0	0	
CTC-12-0214-2	87%	32	32	0	0	0	0	32	0	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CTC-14-0088	84%	21	21	0	0	0	0	21	19	12	0	0	24	8	0	21	0	1	0	0	
CTC-10-0399-2	82%	208	55	80	51	0	0	108	25	178	5	0	150	37	12	74	43	20	0	0	
CTC-14-0023	100%	16	16	0	0	0	0	16	0	16	0	0	0	0	0	16	0	14	0	0	
CTC-14-0054	130%	18	18	0	0	1.5	18	8	0	18	0	0	0	0	18	18	0	2	0	0	
CTC-13-0147	100%	13	13	0	0	0	0	13	12	0	0	0	13	0	0	13	0	0	0	0	

FIG. 9A

Valor más alto

Valor más bajo

2ª decisión de Tto.	Resultado	Tipos de CTCs				Características de CTCs										Elementos predictivos				
		CTCs totales	Subtipos de CTCs			Actividad de RA							Tamaño celular				Artefacto morfológico			
			[CTCs tradicionales]/7,5 mL	[Agrupamiento]/7,5 mL	[CTC CK-]/7,5 mL	Media (expresión de RA)	[CTC RA+]/7,5 mL	[CTC RA-]/7,5 mL	Área celular pequeña/7,5 mL	Área celular media/7,5 mL	Área celular grande/7,5 mL	Área celular gigante/7,5 mL	Nucleolos-/7,5 mL	Nucleolos+/7,5 mL	Nucleolos++/7,5 mL		Punteado CK-/7,5 mL	Punteado CK+/7,5 mL		
ID del paciente	Disminución máx. de PSA (%)	Nº total de CTCs/7,5 mL																		
CTC-12-0150	70%	2143	1333	15	287		6.612	164	1038	7085	1010	6	0	396	748	1305	1805	0	14	375
CTC-12-0064	70%	29	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-13-0039	40%	57	45	3	55	0	6.775	47	47	8	51	6	0	15	12	51	52	0	23	12
CTC-14-0039	70%	56	44	0	22	0	6.194	55	17	11	15	6	0	18	0	55	44	0	14	9
CTC-13-0134	50%	73	60	0	12	0	7.496	49	24	6	73	6	0	2	0	60	60	0	13	24
CTC-12-011	60%	28	21	4	10	0	8.066	17	27	11	16	5	0	18	0	21	21	0	15	5
CTC-10-051	60%	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-09-0166	40%	11	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-12-0135	40%	42	45	0	17	0	4.1	16	16	14	27	0	0	45	0	17	45	0	18	0
CTC-12-0079	70%	29	17	0	12	0	17.53	728	163	103	702	50	0	218	81	675	547	0	20	273
CTC-13-008	50%	293	520	6	73	0	8.196	17	17	36	36	0	0	0	0	11	5	0	0	0
CTC-12-059	70%	11	8	0	0	0	4.547	52	17	28	36	0	0	0	17	36	17	0	0	0
CTC-13-0148	40%	70	17	0	50	0	7.527	256	90	65	779	4	0	51	47	259	256	4	13	43
CTC-09-067	40%	216	250	0	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-12-0174	15%	26	25	0	7	0	0	0	0	14	22	0	0	22	0	14	25	0	12	0
CTC-12-026	20%	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-07-0160	24%	66	20	20	59	0	0	0	0	0	0	0	0	59	0	59	59	0	18	0
CTC-12-0128	25%	14	14	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	14	14	0	0	0
CTC-10-0274	34%	51	24	0	0	0	0	0	0	6	34	0	0	14	0	17	34	0	15	0
CTC-09-010	44%	37	9	11	48	0	8.288	49	13	11	45	0	0	22	51	22	11	0	18	0
CTC-13-0033	49%	95	59	0	48	0	8.68	6	85	51	27	0	0	55	9	14	82	0	16	0
CTC-09-0155	41%	271	141	27	54	0	8.877	70	201	12	174	20	0	154	33	20	121	20	18	0
CTC-09-003	47%	16	14	0	0	0	0	0	14	7	7	0	0	14	0	0	14	0	1	0
CTC-12-051	50%	11	13	0	0	0	22.28	11	0	0	31	0	0	18	0	0	11	0	0	0
CTC-14-0052	61%	26	15	0	0	0	8.68	12	12	0	28	0	0	0	0	26	12	0	0	0
CTC-10-047	50%	97	78	0	12	0	11.510	10	57	42	39	0	0	76	26	59	79	0	16	13
CTC-09-025	44%	203	125	0	29	0	3.477	22	243	160	147	1	0	146	50	29	239	0	0	0
CTC-07-0139	100%	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTC-09-003	100%	25	25	0	0	0	0	0	0	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0

FIG. 9B

3ª decisión de Tto.	Resultado	Tipos de CTCs				Características de CTCs										Elementos predictivos		
		CTCs totales	Subtipos de CTCs			Actividad de RA	Tamaño celular	Artefacto morfológico										
			Nº total de CTCs/7,5 mL	[CTCs tradicionales]/7,5 mL	[Agrupamiento]/7,5 mL			[CTC CK-]/7,5 mL	Área celular pequeña/7,5 mL	Área celular media/7,5 mL	Área celular grande/7,5 mL	Área celular gigante/7,5 mL	Nucleolos-/7,5 mL	Nucleolos+/7,5 mL	Nucleolos++/7,5 mL		Punteado CK-/7,5 mL	Punteado CK+/7,5 mL
ID del paciente	Disminución máx. de PSA (%)					Media (expresión de RA)	[CTC RA+]/7,5 mL	[CTC RA-]/7,5 mL										Puntuación de heterogeneidad de CTCs [CK++][RA+][nucleolos++]/7,5 mL
CTC-130006	17,1%	63	47	3	3	5,645	7	86	1,3	38	0	0	3	36	3	10	0	16
CTC-140062	10,0%	100	100	0	0	4,592	150	99	544	494	13	0	768	108	156	954	0	23
CTC-140064	1,7%	33	18	0	0	8,515	190	0	0	10	0	0	0	0	16	10	0	3
CTC-140217	1,0%	55	46	0	9	4,907	27	27	9	46	0	0	18	0	37	46	0	12
CTC-140026	1,0%	44	36	0	0	4,395	36	0	0	26	0	0	0	0	14	26	0	11
CTC-140075	1,0%	33	31	0	24	11,200	100	273	17	303	54	0	68	48	118	240	0	32
CTC-140096	1,0%	140	84	0	56	5,228	118	20	84	13	0	0	48	18	73	84	0	12
CTC-140120	0,0%	153	89	0	64	10,888	17	77	107	46	0	0	67	23	28	99	0	28
CTC-080130	0,0%	42	36	0	6	4,136	24	19	0	39	0	0	26	8	8	39	0	16
CTC-140130	0,0%	58	29	0	24	4,214	63	625	25	313	50	0	113	14	10	29	0	16
CTC-040120	0,0%	169	21	16	130	5,867	96	67	67	32	0	0	52	39	63	91	0	31
CTC-140072	0,0%	32	32	0	0	7,086	30	0	0	32	0	0	30	32	0	32	0	6
CTC-040048	0,0%	154	135	0	14	7,727	34	103	29	101	5	0	43	34	63	115	14	32
CTC-070093	0,0%	244	184	0	60	8,964	137	113	63	181	0	0	108	41	93	150	4	24
CTC-140091	0,0%	130	100	0	30	10,44	95	25	20	95	0	0	20	10	85	100	0	20
CTC-040206	0,0%	83	66	0	17	7,899	8	81	8	54	0	0	54	8	8	61	0	16
CTC-140047	0,0%	32	32	0	0	7,21	0	32	0	0	0	0	18	0	0	12	0	4
CTC-140041	0,0%	70	47	0	23	7,21	0	0	23	39	0	0	47	16	0	39	0	13
CTC-140090	0,0%	188	158	0	30	5,6	7	0	0	7	0	0	0	0	0	7	0	0
CTC-140072	0,0%	722	537	0	185	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140111	0,0%	8	8	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140063	0,0%	113	106	0	7	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140070	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140071	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140072	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140073	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140074	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140075	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140076	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140077	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140078	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140079	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140080	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140081	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140082	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140083	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140084	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140085	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140086	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140087	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140088	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140089	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140090	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140091	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140092	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140093	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140094	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140095	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140096	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140097	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140098	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140099	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140100	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140101	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140102	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140103	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140104	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140105	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140106	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140107	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140108	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140109	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140110	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140111	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140112	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140113	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140114	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140115	0,0%	0	0	0	0	12,035	189	127	117	373	26	0	73	806	320	320	11	29
CTC-140116	0																	

Nº de CTCs/fenotipo

% de fenotipos de CTCs representados (n=56)					
1º	2º	3º	1º	2º	3º
% de fenotipos de CTCs >1 CTC/7,5 mL			% de fenotipos de CTCs >10 CTC/7,5 mL		
% de fenotipos de CTCs >1 CTC/mL			% de fenotipos de CTCs >100 CTC/7,5 mL		
1 vs 2			1º		
2 vs 3			2º		
1 vs 3			3º		
>1 CTC/mL			1 vs 2		
>10 CTC/mL			2 vs 3		
>100 CTC/mL			1 vs 3		
0.07			0.07		
0.33			0.33		
0.37			0.37		
0.80			0.80		
0.42			0.42		
0.06			0.06		
0.01			0.01		

FIG. 10

FIG. 11A

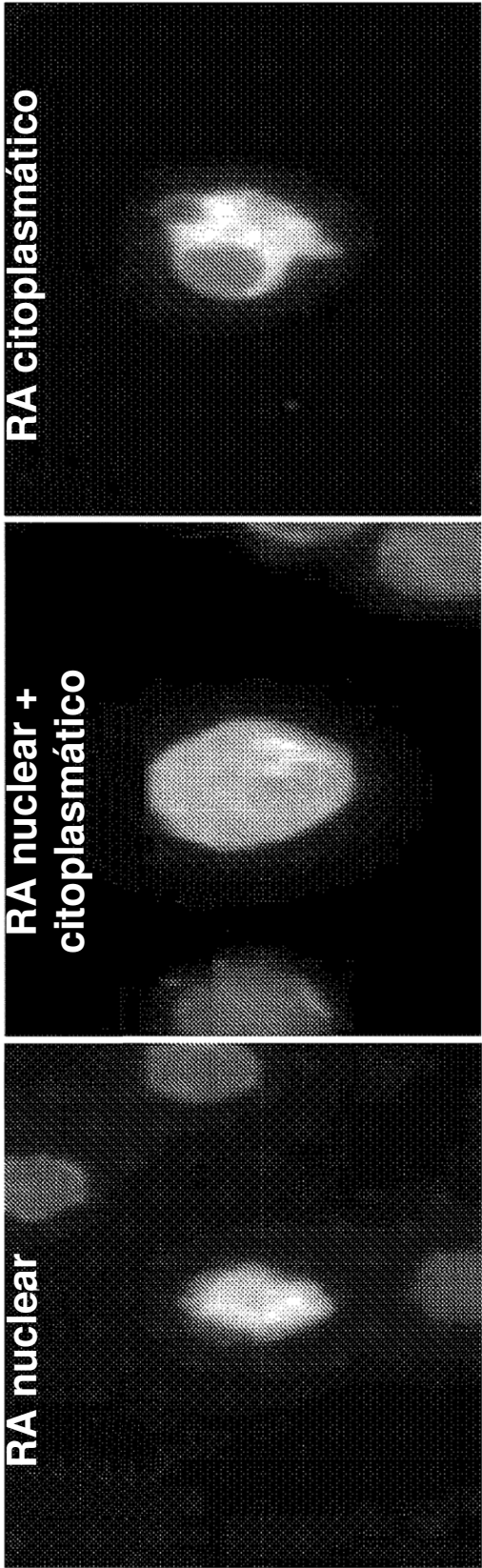


FIG. 11B

Nº de pacientes con:	1º	2º	3º
> 5 CTC RA nuclear / 7,5 mL	33%	42%	70%
> 5 CTC RA citoplasmático / 7,5 mL	56%	67%	30%
> 5 CTC RA nuclear y citoplasmático / 7,5 mL	22%	58%	41%

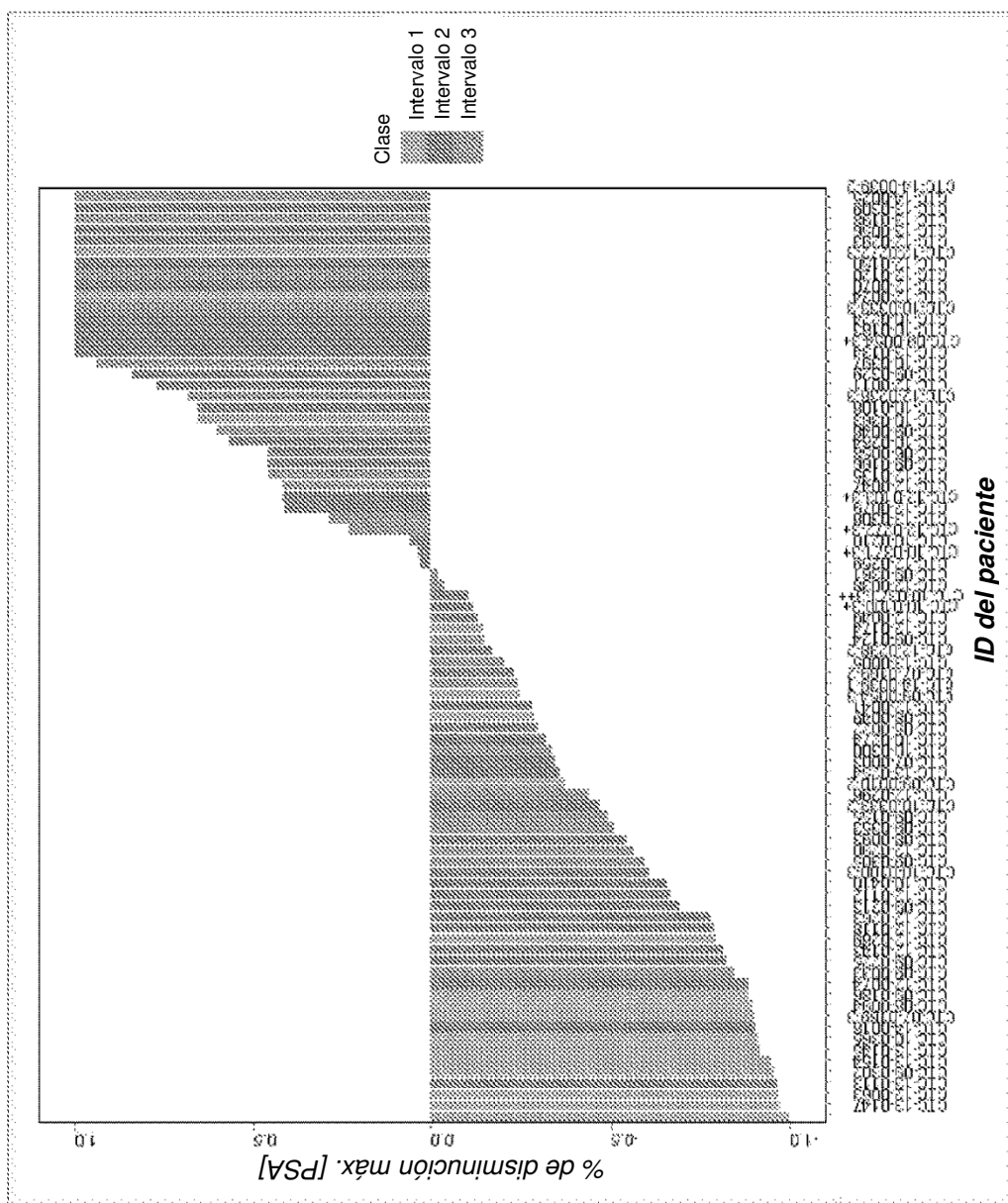


FIG. 12

**% de pacientes con distintivos predictivos de CTCs
de resistencia *de novo* al Tto. del RA
(véase el póster 237P para el modelo predictivo)**

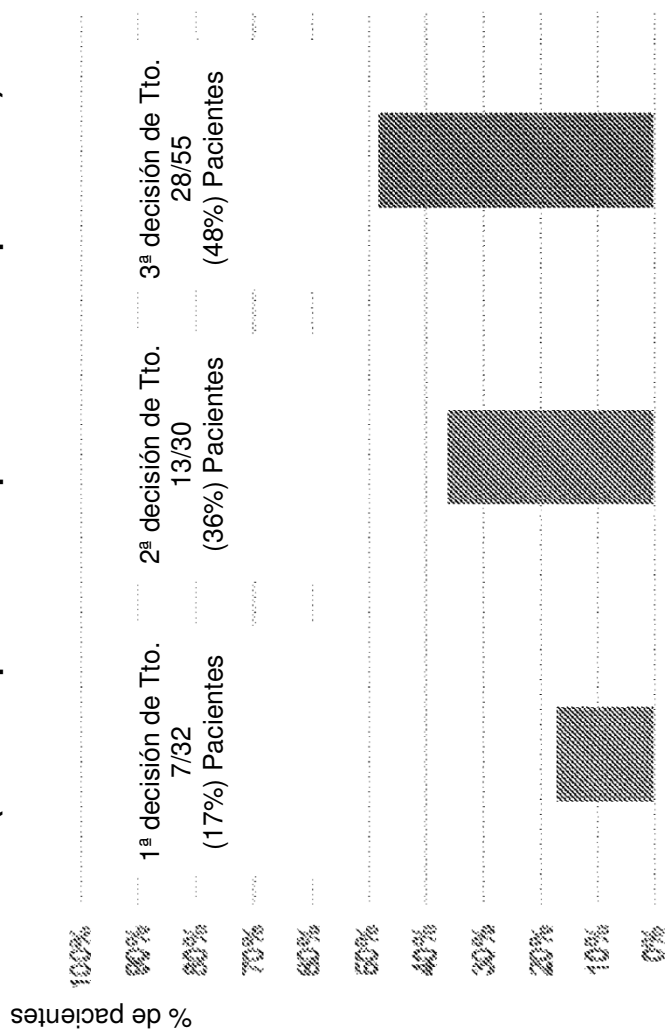


FIG. 13

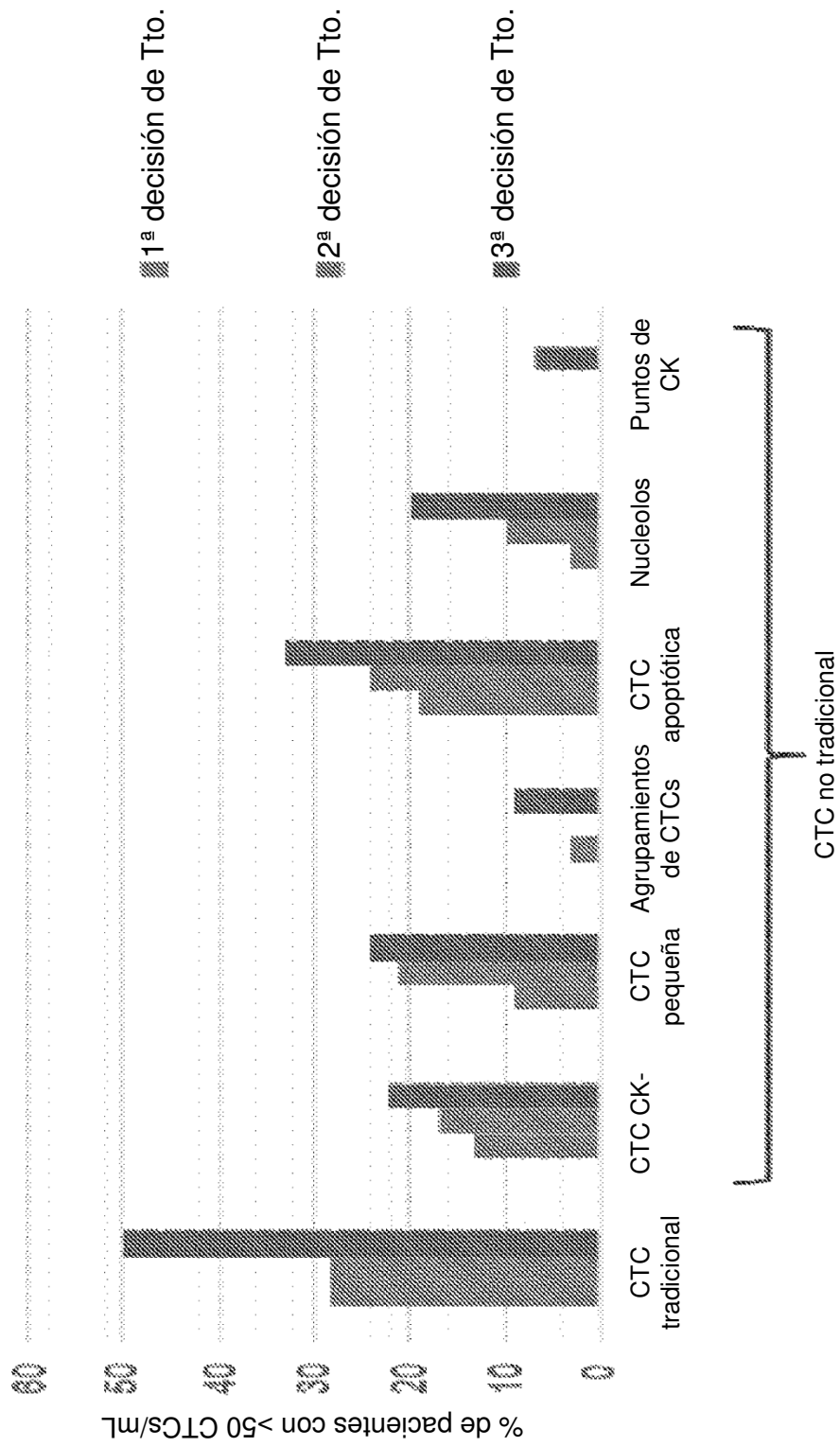


FIG. 14

Característica	Nº (%) o mediana (intervalo)			
	Todos los pacientes	Pacientes con respuesta		Resistencia de novo
		Respuesta verdadera	Resistencia adquirida	
Número de pacientes	85	15	24	46
Edad, años	70 (48-91)	67 (48-82)	72 (52-91)	69 (48-86)
Tratamiento primario				
Prostatectomía	35 (46%)	9 (82%)	11 (52%)	15 (34%)
Radiación	21 (28%)	1 (9%)	4 (19%)	16 (36%)
Ninguno	20 (26%)	1 (9%)	6 (29%)	13 (30%)
Enfermedad metastásica				
Hueso	70 (92%)	9 (82%)	21 (100%)	39 (89%)
Ganglio linfático	48 (63%)	6 (56%)	11 (52%)	31 (70%)
Hígado	5 (7%)	1 (9%)	0 (0%)	4 (9%)
Pulmón	6 (8%)	1 (9%)	3 (14%)	2 (5%)
Otro tejido blando	3 (4%)	1 (9%)	0 (0%)	2 (5%)
Medidas de laboratorio				
PSA, ng/mL	53.32 (0.71-2599.9)	22.82 (0.77-1322.85)	28.59 (0.71-1774.49)	85.14 (7.94-2599.9)
Hgb, (g/dl)	11.6 (7.2-15.0)	12.0 (10.6-13.4)	12.0 (8.4-15.0)	11.0 (7.2-14.4)
ALK, (unit/L)	108 (42-952)	82 (42-190)	109 (51-857)	142 (49-952)
LDH, (unit/L)	237 (142-976)	215 (156-398)	236 (142-479)	242 (163-976)
ALB, (g/dl)	4.2 (3.4-9)	4.3 (4.1-4.9)	4.2 (3.6-4.9)	4.1 (3.3-4.7)
CTC (células/7.5 mL)	6 (0 - >200)	4 (0-160)	1 (0 - >200)	14 (0 - >200)

FIG. 15A

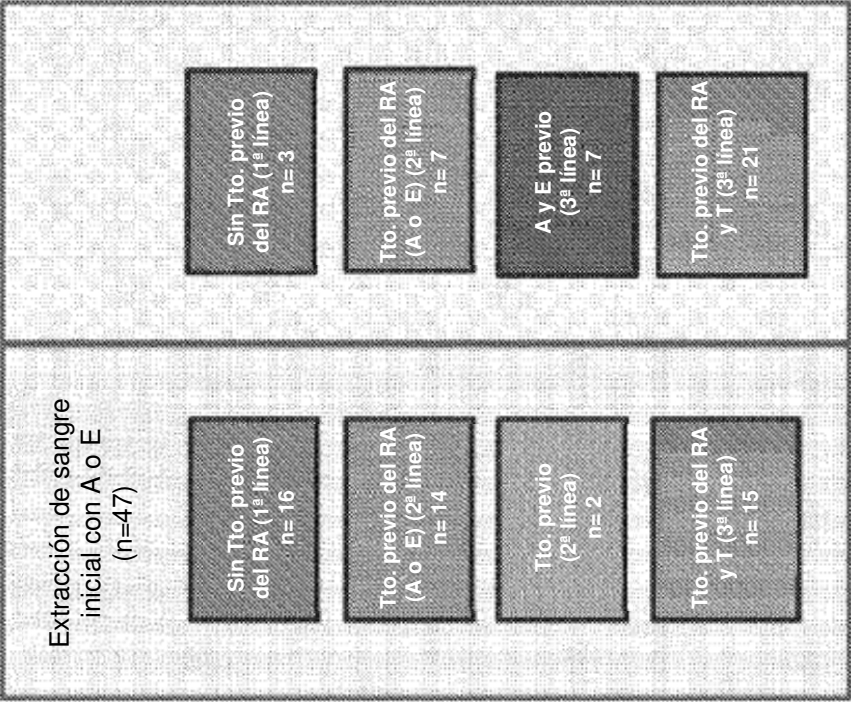


FIG. 15B

FIG. 16A

Característica	Todos los pacientes	Nº (%) o mediana (intervalo)		
		1ª decisión de tratamiento	2ª decisión de tratamiento	3ª decisión de tratamiento
Número de pacientes	117	32	30	55
Edad, años	70 (48-91)	70 (48-86)	73 (53-86)	68 (48-91)
Tratamiento primario				
Prostatectomía	53 (45%)	14 (44%)	15 (50%)	24 (44%)
Radiación	31 (26%)	9 (28%)	7 (23%)	15 (27%)
Ninguno	33 (28%)	9 (28%)	8 (27%)	16 (29%)
Enfermedad metastásica				
Hueso	106 (91%)	28 (88%)	25 (83%)	53 (96%)
Ganglio linfático	74 (63%)	20 (63%)	17 (57%)	37 (67%)
Hígado	11 (9%)	3 (9%)	0 (0%)	8 (15%)
Pulmón	11 (9%)	1 (3%)	2 (7%)	8 (15%)
Otro tejido blando	4 (3%)	2 (6%)	1 (3%)	1 (2%)
Medidas de laboratorio				
PSA, ng/mL	45.80 (0.51-2539.9)	17.47 (0.51-1479.88)	26.40 (2.89-1516.11)	154.77 (1.91-2589.9)
Hgb, (g/dl)	11.8 (7.0-15.0)	13 (10.2-14.4)	12.4 (7.2-15.0)	11.1 (7.0-14.5)
ALK, (unit/L)	108 (42-1816)	86 (42-456)	107 (54-1096)	119 (49-1816)
LDH, (unit/L)	238 (139-976)	214 (139-398)	238 (142-976)	264 (168-964)
ALB, (g/dl)	4.2 (3.1-4.9)	4.3 (3.8-4.6)	4.2 (3.3-4.9)	4.2 (3.1-4.9)
CTC (células/7.5 mL)	3 (0 - >200)	2 (0 - >200)	3 (0 - >200)	8 (0 - >200)

FIG. 16B

