

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 886 640**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2018 PCT/EP2018/055016**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2018 WO18184768**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2018 E 18711029 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021 EP 3607086**

(54) Título: **Método para analizar la expresión de una o más moléculas de ARN biomarcadores**

(30) Prioridad:

03.04.2017 EP 17164667
04.04.2017 EP 17164820

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2021

(73) Titular/es:

QIAGEN GMBH (100.0%)
QIAGEN Straße 1
40724 Hilden, DE

(72) Inventor/es:

HAUCH, SIEGFRIED y
SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 886 640 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

Método para analizar la expresión de una o más moléculas de ARN biomarcadores

CAMPO DE INVENCION

La presente invención da a conocer un método para analizar la expresión de una o más moléculas marcadoras. El presente método es particularmente idóneo para su uso en el campo médico del diagnóstico y del pronóstico, y puede usarse para apoyar la estratificación de los tratamientos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se sabe que los cánceres sólidos arrojan materiales biológicos a la circulación sistémica. Estos incluyen células (células tumorales circulantes, también denominadas CTC) y vesículas extracelulares (también denominadas EV), tales como exosomas y otros tipos de vesículas membranosas subcelulares. También se sabe que los ácidos nucleicos circulantes libres contienen información relacionada con el cáncer, p. ej., sobre mutaciones.

Estos materiales biológicos existen en los líquidos corporales de fácil acceso, tales como sangre periférica total, derrames peritoneales o pleurales, y transportan información molecular, que incluye proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. La información molecular proporcionada por estos materiales biológicos circulantes puede correlacionarse, por ejemplo, con el pronóstico, la respuesta al tratamiento, la recidiva o los mecanismos de resistencia al tratamiento. Existe un gran interés en la técnica anterior por estos materiales biológicos circulantes para desarrollar pruebas mínimamente invasivas. Presentan ventajas significativas para eludir los desafíos de las biopsias y pueden obtenerse fácil y repetidamente para proporcionar un reflejo mínimamente invasivo de la información molecular del tumor. Se acepta en la técnica que los ácidos nucleicos circulantes libres, las vesículas extracelulares o las células tumorales circulantes pueden proporcionar información valiosa de diagnóstico, pronóstico, predicción y seguimiento. Esta información se puede utilizar, p. ej., analizando los biomarcadores que incluyen. Un biomarcador es una molécula biológica que se puede medir en la muestra biológica que hay que analizar y que, sola o en combinación con otros biomarcadores, puede ser un indicador de alguna afección clínicamente significativa. Los biomarcadores pueden ser, p. ej., diagnósticos, sustitutos, pronósticos y/o predictivos. Un biomarcador puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ADN o ARN), una proteína, un lípido, un glucido o un metabolito.

A pesar del potencial clínico bien reconocido, su uso sigue siendo un desafío. Los métodos existentes que se basan en el análisis de biomarcadores moleculares comprendidos en los ácidos nucleicos circulantes libres, en las vesículas extracelulares o en las células tumorales circulantes para obtener información relacionada con el cáncer a menudo tienen inconvenientes con respecto a la sensibilidad y/o robustez. En concreto, se necesitan métodos mejorados para analizar los biomarcadores moleculares que ayuden al diagnóstico, el pronóstico o a elegir el tratamiento más apropiado para los pacientes con cáncer.

Speicher y Pantel (*Nature Biotechnology* 2014, 32 (5):441) dan a conocer una revisión de los métodos aplicados, en concreto, para analizar los genomas de tumores sólidos en busca de alteraciones genómicas (por ejemplo, mutaciones) en las muestras de sangre. La revisión analiza, y en la figura 1 las compara, unas estrategias mínimamente invasivas diferentes y alternativas para seguir la evolución del genoma tumoral.

Es un objeto de la presente invención superar al menos un inconveniente de la técnica anterior. Además, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un método mejorado que proporcione una alta sensibilidad y robustez al análisis de la información molecular circulante, en concreto de los biomarcadores moleculares. Además, el objeto de la presente invención es dar a conocer un método mejorado para el análisis de los biomarcadores moleculares como ayuda diagnóstica, pronóstica y/o predictiva en el tratamiento de los pacientes con cáncer. Además, es un objetivo dar a conocer métodos mejorados que permitan un diagnóstico más precoz del cáncer y/o una predicción fiable de la resistencia o capacidad de respuesta al tratamiento para aumentar la probabilidad de un tratamiento exitoso.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Según un primer aspecto, se da a conocer un método para analizar la expresión de las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores, que comprende

(A) aislar el ARN de las células tumorales circulantes obtenidas de un sujeto, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado, y proporcionar un perfil de expresión basado en los resultados;

(B) aislar el ARN de las vesículas extracelulares obtenidas del sujeto, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado, y proporcionar un perfil de expresión basado en los resultados; y

(C) utilizar los perfiles de expresión determinados en (A) y determinados en (B) para un análisis combinado de los resultados.

El presente método considera el perfil de expresión obtenido para las células tumorales circulantes y el perfil de expresión obtenido para las vesículas extracelulares para un análisis combinado y la evaluación de los resultados. Este análisis combinado puede proporcionar información complementaria y de apoyo que aumenta la significación de los resultados obtenidos.

- Para tal análisis combinado, un perfil de expresión combinado puede darse a conocer, p. ej., basándose en el perfil de expresión de las CTC y en el perfil de expresión de las EV. Tal y como se demuestra en los ejemplos, un análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV mejora el valor pronóstico y predictivo de los resultados obtenidos y puede proporcionar información valiosa de diagnóstico, pronóstico y/o predictiva. El presente método *in vitro* puede, así pues, utilizarse como una ayuda mejorada de diagnóstico, pronóstico y/o predicción en el tratamiento de los pacientes con cáncer. Se puede utilizar para respaldar el diagnóstico, el pronóstico, o para elegir el tratamiento más adecuado para los pacientes con cáncer. Por lo tanto, el presente método da a conocer un método mejorado para el análisis de los biomarcadores de ARN y hace una importante contribución a la técnica.

Según un segundo aspecto, se da a conocer un método para determinar la eficacia de un tratamiento en un sujeto o para predecir o controlar la respuesta al tratamiento en un paciente, que comprende determinar el nivel de expresión de AURKA en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes. Como se demuestra en los ejemplos y se explica en la presente memoria, la detección de la expresión de AURKA proporciona una información valiosa. Se encontrará más información en la descripción correspondiente.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones adjuntas.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En las figuras 1A a 1D se muestra la relación de la expresión de las TK (HER2, HER3, cMet o cKit) con la respuesta al tratamiento en las pacientes con CMM (ejemplo 2). En los gráficos se representa la frecuencia de muestras que expresan el biomarcador (pos) y que no expresan el biomarcador (neg) dentro de los grupos de pacientes que responden y pacientes que no responden. En la figura 1A se muestran los resultados de la expresión de HER2 en las CTC. En la figura 1B se muestran los resultados de la expresión de HER2 o HER3 en las CTC. En la figura 1C se muestran los resultados para la expresión de al menos una de las TK en las CTC. En la figura 1D se muestran los resultados para la expresión de al menos una de las TK en las CTC o en las EV.

En las figuras 2A y 2B se muestra la relación de la expresión de AURKA con la capacidad de respuesta al tratamiento con denosumab en las pacientes con CMM (ejemplo 3). En los gráficos se representa la frecuencia de las muestras procedentes de las pacientes que habían sido tratadas con el denosumab (con denosu) o sin tratamiento con el denosumab (sin denosu) dentro de los grupos de pacientes que responden y pacientes que no responden. En la figura 2A se muestran los resultados de las muestras positivas para AURKA en las EV. En la figura 2B se muestran los resultados de las muestras negativas para AURKA en las EV.

En las figuras 3A y 3B se muestra la relación de la expresión de mTOR con la respuesta al tratamiento en las pacientes con CMM (ejemplo 4). En los gráficos se representa la frecuencia de muestras positivas para mTOR (pos) y negativas para mTOR (neg) dentro de los grupos de pacientes que responden totalmente, pacientes que no responden totalmente, pacientes que responden tarde y pacientes que no responden tarde. En la figura 3A se muestran los resultados de la expresión de mTOR en las CTC. En la figura 3B se muestran los resultados de la expresión de mTOR en las EV.

En la figura 4 se muestra la relación de la expresión de ERCC1 en respuesta al tratamiento en las pacientes con CMM (ejemplo 5). En el gráfico se muestra la frecuencia de las muestras positivas (pos) o negativas (neg) para ERCC1 en las EV dentro de los grupos de pacientes que responden totalmente y pacientes que no responden totalmente.

En la figura 5 se muestra la tabla I.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- 45 Según un primer aspecto, se da a conocer un método para analizar la expresión de las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores, que comprende

(A) aislar el ARN de las células tumorales circulantes obtenidas de un sujeto, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado y dar a conocer un perfil de expresión basado en los resultados;

- 50 (B) aislar el ARN de las vesículas extracelulares obtenidas del sujeto, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado y dar a conocer un perfil de expresión basado en los resultados; y

(C) utilizar los perfiles de expresión determinados en (A) y determinados en (B) para un análisis combinado de los resultados.

Cada una de las etapas del método, así como las realizaciones idóneas y preferidas del presente método, se describen a continuación en detalle.

ETAPA (A)

En la etapa (A), se aísla el ARN de las células tumorales circulantes (CTC) obtenidas de un sujeto y se determina la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado y se da a conocer un perfil de expresión basado en los resultados. De ese modo, se da a conocer un perfil de expresión de las CTC que comprende los resultados de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador.

Tal y como se analiza también en detalle a continuación, se prefiere determinar la expresión de moléculas de ARN de múltiples biomarcadores, p. ej., un panel de biomarcadores, en paralelo para aumentar el valor informativo del perfil de expresión de las CTC. En consecuencia, en las realizaciones, la etapa (A) comprende determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 17 o al menos 20 biomarcadores. Por consiguiente, el perfil de expresión de las CTC dado a conocer en la etapa (A) puede comprender los resultados de expresión de moléculas de ARN de al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 17 o al menos 20 biomarcadores. A continuación, también se describen otras realizaciones. Tal y como se analiza en la presente memoria, se puede determinar en la etapa (A) y en la etapa (B) la expresión de las moléculas de ARN de los mismos biomarcadores. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente descripción que en la etapa (A) y en la etapa (B) se analizan moléculas de ARN de diferentes biomarcadores. Los detalles con respecto a las realizaciones ejemplares idóneas y preferidas para las moléculas de ARN del biomarcador y los paneles de los ARN de biomarcadores se describen a continuación y se hace referencia a la descripción correspondiente.

A continuación, se describen las realizaciones ejemplares idóneas y preferidas para aislar el ARN de las células tumorales circulantes y determinar la expresión del ARN del biomarcador y se hace referencia a la descripción correspondiente.

ETAPA (B)

En la etapa (B), se aísla el ARN de las vesículas extracelulares (EV) obtenidas de un sujeto y se determina la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN vesicular aislado y se da a conocer un perfil de expresión basado en los resultados. De ese modo, se da a conocer un perfil de expresión de las EV que comprende los resultados de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador.

Tal y como se analiza también en detalle a continuación, se prefiere determinar la expresión de las moléculas de ARN de múltiples biomarcadores, p. ej., un panel de biomarcadores, en paralelo para incrementar el valor informativo del perfil de expresión de las EV. En consecuencia, en las realizaciones, la etapa (B) comprende determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 17 o al menos 20 biomarcadores. Por consiguiente, el perfil de expresión de las EV dado a conocer en la etapa (B) puede comprender los resultados de expresión de las moléculas de ARN de al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 17 o al menos 20 biomarcadores. A continuación, también se describen otras realizaciones. Tal y como se analiza en la presente memoria, se puede determinar en la etapa (B) y en la etapa (A) la expresión de las moléculas de ARN de los mismos biomarcadores. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente descripción que en la etapa (B) y en la etapa (A) se analicen las moléculas de ARN de diferentes biomarcadores. Los detalles con respecto a las realizaciones ejemplares idóneas y preferidas para las moléculas de ARN del biomarcador y los paneles de ARN de biomarcadores se describen a continuación y se hace referencia a la descripción correspondiente.

A continuación, se describen realizaciones ejemplares idóneas y preferidas para aislar el ARN de las vesículas extracelulares y determinar la expresión del ARN del biomarcador y se hace referencia a la descripción correspondiente.

ETAPA (C)

La etapa (C) comprende el uso de los perfiles de expresión determinados en (A) y determinados en (B) para un análisis combinado de los resultados. Tal y como se analiza en la presente memoria y se demuestra en los ejemplos, dicho análisis combinado, que considera los resultados del perfil de expresión de las CTC y los resultados del perfil de expresión de las EV, mejora la significación y, por tanto, el valor de la información obtenida de diagnóstico, pronóstico y/o predicción. Permite tener en cuenta la información complementaria y aditiva que proporcionan los perfiles de expresión de las CTC y de las EV. Por lo tanto, los resultados que se dan a conocer basándose en dicho análisis combinado como se enseña en la presente invención están significativamente mejorados en comparación con un análisis que considera los resultados del perfil de expresión de las CTC o bien los resultados del perfil de expresión de las EV. A continuación, se describen los ejemplos de usos idóneos y preferidos del análisis combinado.

Según una realización, el análisis combinado comprende proporcionar un perfil de expresión combinado usando el perfil de expresión determinado en (A) y el perfil de expresión determinado en (B). En consecuencia, en dicho análisis combinado, el perfil de expresión de las CTC que se da a conocer en la etapa (A) y el perfil de expresión de las EV

que se da a conocer en (B) se utilizan para dar a conocer un perfil de expresión combinado que comprende los resultados de expresión del perfil de expresión de las CTC y del perfil de expresión de las EV. El perfil de expresión combinado dado a conocer se puede utilizar ventajosamente como ayuda de diagnóstico, pronóstico y/o predicción en el tratamiento de los pacientes con cáncer. Se puede utilizar para respaldar el diagnóstico, el pronóstico, o para elegir el tratamiento más adecuado para los pacientes con cáncer. A continuación, se describen realizaciones ejemplares idóneas y preferidas para crear tal perfil de expresión combinado, y usos ejemplares idóneos y preferidos del mismo.

REALIZACIONES DE LAS ETAPAS (A) Y (B)

Para proporcionar células tumorales circulantes y vesículas extracelulares para el análisis, se pueden recoger del sujeto una muestra biológica que comprende células tumorales circulantes y muestras extracelulares, como p. ej. sangre. Al recoger una muestra biológica acorde, se garantiza que las células tumorales circulantes y las vesículas extracelulares se obtienen del sujeto en el mismo momento. A continuación, se describen ejemplos de realizaciones idóneas y preferidas:

Según una realización, el presente método comprende

- proporcionar una muestra biológica líquida obtenida del sujeto;
- extraer las células de la muestra biológica líquida, con lo que se proporciona así una muestra biológica sin células;
- aislar las células tumorales circulantes a partir de las células extraídas;
- en donde la etapa (A) comprende aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas;
- en donde la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células.

En esta realización, las células se extraen de la muestra biológica líquida (por ejemplo, sangre), lo que proporciona así una muestra biológica sin células (por ejemplo, plasma en el caso de la sangre). A continuación, se aíslan las células tumorales circulantes a partir de la fracción de las células retiradas. También se describen a continuación métodos ejemplares de aislamiento de CTC idóneos y preferidos. En la etapa (A), se obtiene entonces el ARN de las CTC aisladas y, por tanto, enriquecidas. En la etapa (B), el ARN vesicular se aísla de la muestra biológica sin células. Ventajosamente, esta realización permite aislar el ARN de las CTC y el ARN vesicular de la misma muestra biológica obtenida. Permite utilizar todo el volumen recogido para el aislamiento de las CTC y para el aislamiento del ARN vesicular. Esto es ventajoso si se tiene en cuenta que las CTC son a menudo raras, por lo que será deseable procesar volúmenes de muestras más grandes.

Según una realización, el método comprende

- proporcionar una muestra biológica líquida obtenida del sujeto;
- aislar las células tumorales circulantes de la muestra biológica líquida;
- retirar las células restantes de la muestra biológica líquida de la que se aislaron las células tumorales circulantes, con lo que se proporciona así una muestra biológica sin células;
- en donde la etapa (A) comprende aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas;
- en donde la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células.

En esta realización preferida, las CTC se eliminan de la muestra biológica líquida (por ejemplo, sangre), con lo que se proporciona así una muestra biológica de la que retiraron todas las CTC. A continuación, se extraen las células restantes para proporcionar una muestra biológica sin células (por ejemplo, plasma en el caso de la sangre). En la etapa (A), el ARN se aísla luego de las CTC aisladas y, por tanto, enriquecidas. En la etapa (B), el ARN vesicular se aísla de la muestra biológica sin células. Además, esta realización permite el aislamiento del ARN de las CTC y el ARN vesicular a partir de la misma muestra biológica obtenida. Además, como las CTC es lo primero que se aísla de la muestra biológica, se reduce el tiempo total de manipulación de las CTC, lo que es ventajoso para evitar los daños en estas células raras y, por tanto, muy valiosas.

Según otra realización, el método comprende

- proporcionar al menos dos muestras biológicas líquidas del mismo tipo obtenidas del mismo sujeto;
- aislar las células tumorales circulantes de al menos una de las muestras biológicas líquidas, en donde la etapa (A) comprende aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas;

- obtener una muestra sin células de al menos una de las muestras biológicas líquidas, en donde la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células.

En esta realización se proporcionan al menos dos muestras biológicas líquidas del mismo tipo (por ejemplo, sangre) que se obtuvieron del mismo sujeto al mismo tiempo. P. ej., las al menos dos muestras biológicas del mismo tipo

5 pueden obtenerse con la toma de alícuotas de una (única) muestra biológica que se haya recogido del sujeto. P. ej., una muestra de sangre recogida se puede dividir en dos alícuotas, en las que se procesa una alícuota y se usa para aislar el ARN de las CTC, y se procesa la otra alícuota y se usa para aislar el ARN vesicular. Según una realización adicional, las al menos dos muestras biológicas del mismo tipo se obtuvieron del mismo sujeto al mismo tiempo, p. ej., con la extracción de al menos dos muestras de sangre recogidas al mismo tiempo, en donde se procesa una muestra

10 y se usa para aislar el ARN de las CTC, y se procesa la otra muestra y se usa para aislar el ARN vesicular.

De acuerdo con una realización, que se aplica a las tres realizaciones debatidas anteriormente, el método comprende aislar las vesículas extracelulares de la muestra sin células y la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares aisladas. Esta realización es ventajosa porque aumenta la especificidad por las vesículas extracelulares.

15 Sin embargo, también está dentro del alcance de la etapa (B) aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células directamente de la muestra biológica sin células sin ningún aislamiento previo y, por lo tanto, Enriquecida en vesículas extracelulares. Esta realización también es factible porque se supone que la mayor parte del ARN comprendido en la muestra biológica sin células y, por tanto, aislado de la misma, se origina a partir de las vesículas extracelulares, tales como los exosomas. Preferiblemente, las vesículas extracelulares se aíslan directamente a partir de la muestra biológica sin células (por ejemplo, plasma o suero de la

20 sangre) y luego se aísla el ARN vesicular en la etapa (B) a partir de las vesículas extracelulares aisladas y, por lo tanto, Enriquecidas. También se describen a continuación los métodos ejemplares idóneos y preferidos para aislar las vesículas extracelulares, tales como los exosomas.

CTC y aislamiento de las CTC

Las células tumorales circulantes (CTC) se conocen bien en la técnica. Por lo general, las CTC son las células que se han liberado a los vasos sanguíneos o linfáticos desde un tumor primario y se transportan por todo el cuerpo en el torrente circulatorio. Las CTC se pueden liberar de forma activa o inactiva. Pueden circular por la sangre y por el sistema linfático como células sueltas o como agregados, los llamados microémbolos tumorales circulantes. Por tanto,

25 las CTC se originan en el tumor primario y pueden constituir semillas vivas para el crecimiento posterior de otros tumores (metástasis) en órganos vitales alejados. Por lo tanto, las CTC pueden desencadenar un mecanismo responsable de la gran mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer. Las CTC también pueden originarse a partir de las metástasis. Se han identificado CTC en muchos cánceres diferentes y está ampliamente aceptado que

30 las CTC que se encuentran en la sangre periférica se originan a partir de los tumores sólidos y están implicadas en la migración metastásica hematogena de los tumores sólidos a sitios distantes. El término CTC, tal y como se usa en la presente memoria en concreto, incluye las células circulantes procedentes de todos los tipos de tumores, sobre todo de tumores sólidos, en concreto de tumores sólidos metastatizantes. El término CTC, tal y como se usa en la presente memoria, incluye, entre otras pero sin limitación, las CTC que son células cancerosas confirmadas con un núcleo

35 viable e intacto que expresan citoqueratinas o moléculas marcadoras epiteliales como EpCam y carecen de CD45; CTC que no expresan citoqueratinas (CK-) que son células madre cancerosas o células que experimentan la transición de epitelio a mesénquima (EMT) que pueden carecer de expresión de citoqueratinas o de marcadores epiteliales,

40 como EpCam y CD45; CTC apoptóticas que son CTC tradicionales que están sufriendo apoptosis (muerte celular); CTC pequeñas que suelen expresar citoqueratinas y no expresan el CD45, pero con tamaños y formas similares a los glóbulos blancos, CTC inactivas, así como cúmulos de CTC de dos o más CTC sueltas, p. ej., de cualquiera de los tipos de CTC antes mencionados, o se unen entre sí una mezcla de dichos tipos de CTC. El cúmulo de CTC puede contener, p. ej., CTC pequeñas, tradicionales y/o CK-.

45 Las CTC son por lo general células muy raras dentro de un líquido corporal. Por ejemplo, las CTC se pueden encontrar en frecuencias del orden de 1-10 CTC por 5 ml de sangre total en los pacientes con un cáncer primario, pero a veces se pueden encontrar en cantidades más altas, hasta 1000/5 ml de sangre en el cáncer metastásico. Para proporcionar información sobre las CTC, se requiere aislar y, por lo tanto, Enriquecer, las células tumorales o eliminar otras células nucleadas de la sangre. Se puede usar cualquier método junto con el presente método que sea idóneo para aislar, y

50 así pues Enriquecer, las células tumorales circulantes de una muestra (por ejemplo, la muestra biológica o las células retiradas de la muestra biológica, véase más arriba). El término «aislar» se usa en la presente memoria en un sentido amplio y abarca, p. ej., cualquier forma de Enriquecimiento o purificación de las células tumorales circulantes de una muestra. Debido a que las CTC son a menudo raras, en el procedimiento habitual de aislamiento de las CTC se suelen

55 coaislar otros tipos de células junto con las CTC deseadas, de modo que las CTC aisladas comprenden hasta cierto punto como ruido de fondo una serie de células normales. No obstante, estos métodos Enriquecen y, así pues, aíslan las CTC y, por tanto, son métodos para aislar las CTC. Los métodos para aislar las células tumorales circulantes a partir de diversas muestras biológicas se conocen bien en la técnica y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria. A continuación, se describen brevemente los métodos idóneos ejemplares.

Las CTC pueden Enriquecerse y, por tanto, aislarse con varios métodos físicos y/o basados en la captura por afinidad.

60 Las CTC pueden aislarse mediante los métodos que incluyen una selección positiva de las CTC, p. ej., mediante un método dirigido directamente a las CTC, o los métodos que incluyan una selección negativa, p. ej., por eliminación de

las células que no sean CTC (por ejemplo, leucocitos en el caso de la sangre). También son factibles los métodos que enriquecen y, por lo tanto, aíslan las CTC por tamaño mediante el uso de, p. ej., los métodos basados en la filtración, deformabilidad o densidad, u otros métodos físicos. Además, se puede utilizar una combinación de los métodos que se acaban de mencionar.

- 5 Según una realización preferida, las células tumorales circulantes se aíslan mediante la captura por afinidad. Dichos métodos de captura basados en la afinidad fijan específicamente las CTC a una superficie (por ejemplo, una perla, membrana u otra superficie). La especificidad por las CTC se logra mediante el uso de uno o más agentes de fijación (por ejemplo, anticuerpos) que se fijan a las estructuras, por ejemplo, epítopos o antígenos, presentes en las CTC. En las realizaciones, dichos uno o más agentes de fijación se fijan a los marcadores asociados a tumores presentes en las CTC. P. ej., las CTC pueden aislarse con una fase sólida recubierta de anticuerpos (por ejemplo, perlas magnéticas) que puede capturar las CTC. Para la captura de las CTC, se puede usar una combinación de dos o más anticuerpos que se fijen con elevadas especificidad y afinidad a epítopos o antígenos de las CTC deseadas. Los agentes de fijación también pueden seleccionarse para que actúen sobre epítopos o antígenos presentes en las CTC dependiendo del tipo de tumor. P. ej., diferentes estructuras, p. ej. epítopos o antígenos, pueden estar presentes en las CTC que pueden ser la diana del agente de fijación (por ejemplo, anticuerpo) en función del tipo de tumor primario, teniendo también en cuenta los posibles cambios del fenotipo de células madre tumorales o de la EMT. El uso de una plataforma de captura basada en un agente de fijación acorde (por ejemplo, un anticuerpo) es ventajoso ya que también puede enriquecer las CTC que han sufrido cambios de fenotipo en el transcurso de, por ejemplo, la transición de epitelio a mesénquima (EMT) o muestran capacidad de ser célula madre del tumor. Según una realización preferida, los epítopos sobre los que actúa el agente de fijación son antígenos asociados al epitelio y/o al tumor, tales como, p. ej., EpCAM, EGFR y HER2. Un sistema disponible comercialmente para aislar las células tumorales circulantes es el AdnaTest (QIAGEN).

Otro método que se basa en la selección positiva y, por lo tanto, representa un método de aislamiento de CTC idóneo para obtener las CTC, se basa en el recuento de las células epiteliales que se separan de la sangre mediante conjugados de anticuerpos a nanopartículas magnéticas que se dirigen a los marcadores de la superficie de las células epiteliales, EpCAM, y la posterior identificación de las CTC con anticuerpos marcados con fluorescencia contra las citoqueratinas (CK 8, 18, 19) y una tinción nuclear fluorescente. Se usa un método acorde en el sistema disponible comercialmente de CellSearch (Menarini/Veridex LLC). Otros métodos conocidos para el enriquecimiento en CTC y, por lo tanto, el aislamiento de las CTC incluyen, entre otros, el método de ciencias Epic, la prueba ISET, el uso de un clasificador microfluídico de células (μ FCS que emplea una barrera física de estilo represa modificada para separar y capturar las CTC, p. ej., a partir de la sangre total sin procesar según su diferencia de tamaño), ScreenCell (un dispositivo basado en la filtración que permite el aislamiento sensible y específico de las CTC, por ejemplo, a partir de sangre completa humana), Clearbridge, Parsortix e IsoFlux.

A continuación, se puede aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas. En la presente memoria se describen métodos ejemplares y preferidos para el aislamiento de ARN.

Vesículas extracelulares y aislamiento de las vesículas extracelulares

El término vesícula extracelular (EV) tal y como se usa en la presente memoria en concreto se refiere a cualquier tipo de vesícula secretada de origen celular. Las vesículas extracelulares (EV) pueden clasificarse en líneas generales en exosomas, microvesículas (MV) y cuerpos apoptóticos. Las vesículas extracelulares, tales como los exosomas y las microvesículas, son pequeñas vesículas secretadas por las células. Se ha descubierto que las EV circulan por muchos líquidos corporales diferentes, incluida la sangre y la orina, lo que las hace fácilmente accesibles. Debido a la semejanza de la composición de las EV con la célula parental, las EV circulantes son una fuente valiosa de biomarcadores. Es probable que las EV circulantes estén compuestas por una mezcla de exosomas y MV.

45 Contienen ácidos nucleicos estables (por ejemplo, ARNm, miARN, otros ARN pequeños), ADN y proteínas, protegidos de la degradación por una bicapa lipídica. En consecuencia, el contenido está empaquetado específicamente y representa mecanismos de comunicación celular locales y distantes. Pueden transportar ARN entre las células. Las EV, tales como los exosomas, son una fuente abundante y diversa de biomarcadores circulantes. La célula de origen puede ser una célula sana o una célula cancerosa. Las EV, tales como los exosomas, a menudo los secretan activamente las células cancerosas, sobre todo las células cancerosas en división. Como parte del microambiente tumoral, las EV tales como los exosomas parecen desempeñar una función importante en el crecimiento de los fibroblastos, las reacciones desmoplásicas, pero también en el inicio de la transición de epitelio a mesénquima (EMT) y SC, así como en la construcción de resistencia al tratamiento y el inicio de la metástasis y la resistencia al tratamiento. Los exosomas son más pequeños que las CTC y comprenden un número menor de copias por biomarcador. A diferencia de las CTC, las EV son más accesibles porque están presentes en cantidades muy grandes en los líquidos corporales como, por ejemplo, aproximadamente de 10^9 a 10^{12} vesículas por mililitro de plasma sanguíneo.

Tal y como se explicó anteriormente, el presente método comprende en una realización el aislamiento de vesículas extracelulares antes del aislamiento del ARN. Junto al presente método se puede usar cualquier método que sea idóneo para aislar y así enriquecer las vesículas extracelulares de una muestra. La muestra es tal y como se describió más arriba, preferiblemente una muestra biológica sin células (por ejemplo, plasma). El término «aislamiento» se usa de nuevo en un sentido amplio y cubre el enriquecimiento o la purificación de vesículas extracelulares. Las vesículas

extracelulares se pueden aislar de prácticamente cualquier biofluído después de eliminar los componentes celulares. Los métodos idóneos para aislar vesículas extracelulares, tales como los exosomas, se conocen en la técnica y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria. En la presente memoria se describen brevemente métodos idóneos ejemplares para el aislamiento de las vesículas extracelulares.

5 Las vesículas extracelulares, incluidos los exosomas, se pueden aislar de los líquidos corporales sin células, como por ejemplo plasma sanguíneo o suero. P. ej., las vesículas extracelulares pueden aislarse mediante ultracentrifugación, ultrafiltración, gradientes y captura por afinidad, o una combinación de los métodos correspondientes. Están disponibles numerosos protocolos y productos comerciales para el aislamiento de vesículas extracelulares/exosomas, y son conocidos por los expertos. A continuación, se describen ejemplos no limitantes de métodos de aislamiento.

10 Se pueden aislar vesículas extracelulares y, en particular, los exosomas, p. ej., por métodos que implican ultracentrifugación. Un método ejemplar de aislamiento por ultracentrifugación está descrito por Thery y col. (Aislamiento y caracterización de exosomas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares y líquidos biológicos. Unidad 3.22, «Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles», en *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons Inc., 2006). Por tanto, según una realización, las vesículas extracelulares se aíslan mediante ultracentrifugación.

15 Para aumentar la pureza de las vesículas extracelulares aisladas, pueden eliminarse las células y los fragmentos celulares, y opcionalmente los cuerpos apoptóticos si se desea, antes de aislar las vesículas extracelulares, p. ej. por centrifugación o filtración. P. ej., se pueden utilizar métodos de filtración que excluyan las partículas mayores de 0,8 µm, 0,7 µm o 0,6 µm.

20 Según una realización, las vesículas extracelulares se aíslan mediante captura por afinidad a una fase sólida. Según una realización, las vesículas extracelulares, tales como los exosomas, se aíslan mediante captura inmunomagnética con el uso de perlas magnéticas recubiertas con anticuerpos dirigidos contra las proteínas expuestas en las vesículas extracelulares, p. ej., en la membrana de los exosomas.

25 Según una realización, las vesículas extracelulares se capturan al hacer pasar la muestra sin células a través de un material de captura de vesículas. Las vesículas extracelulares fijadas se pueden lavar y eluir posteriormente. Los sistemas comerciales que se basan en la captura por afinidad, como el kit exoEasy (QIAGEN), están disponibles para la purificación de vesículas extracelulares y pueden usarse junto con la presente invención.

30 También se han descrito métodos basados en el uso de polímeros que excluyen volumen, como el PEG, para el aislamiento de las EV. En ellos, los polímeros actúan sujetando las moléculas de agua y expulsando de la solución los componentes menos solubles, como las vesículas extracelulares, lo que permite que se recojan mediante una centrifugación corta a baja velocidad. Los productos comerciales que hacen uso de este principio son ExoQuick (System Biosciences, Mountain View, EE. UU.) y Total Exosome Isolation Reagent (Life Technologies, Carlsbad, EE. UU.). Por tanto, según una realización, las vesículas extracelulares se aíslan mediante precipitación con un polímero que excluye el volumen. Además, las vesículas extracelulares, tales como los exosomas, pueden aislarse en función de su densidad, p. ej., al colocar la muestra en capas sobre gradientes discontinuos de sacarosa o yodixanol y someterla a centrifugación a alta velocidad. Por tanto, según una realización, las vesículas extracelulares, tales como los exosomas, se aíslan mediante centrifugación en gradiente de densidad.

35 40 Según una realización, las vesículas extracelulares comprenden o consisten predominantemente en exosomas y/o microvesículas. Según una realización, las vesículas extracelulares comprenden o consisten predominantemente en exosomas.

A continuación, se puede aislar el ARN de las vesículas extracelulares aisladas, tal como en concreto de los exosomas aislados. En la presente memoria se describen métodos ejemplares y preferidos para el aislamiento de ARN.

Aislamiento de ARN en la etapa (A) y/o en la etapa (B)

45 El presente método comprende el aislamiento de ARN de las células tumorales circulantes en la etapa (A) y el aislamiento de ARN de las vesículas extracelulares en la etapa (B). Tal y como se explicó más arriba, las células tumorales circulantes y las vesículas extracelulares pueden aislarse de una muestra biológica obtenida de un sujeto antes del aislamiento del ARN. El término «aislamiento» se usa de nuevo en un sentido amplio y abarca, p. ej., el enriquecimiento o la purificación del ARN. Los métodos de aislamiento de ARN idóneos que se pueden usar en la etapa (A) y/o en la etapa (B) son conocidos por el experto y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria. No obstante, más adelante se ilustran realizaciones ejemplares.

50 55 Pueden usarse métodos, p. ej. los basados en el uso de fenol y/o sales caótropas, para el aislamiento del ARN. Los ejemplos de métodos idóneos incluyen, entre otros, extracción, extracción en fase sólida, purificación basada en ácido polisilílico, purificación basada en partículas magnéticas, extracción con fenol-cloroformo, cromatografía de intercambio aniónico (con el uso de superficies de intercambio aniónico), electroforesis, precipitación y combinaciones de los mismos. Los métodos correspondientes son bien conocidos en la técnica. En caso de que el ADN se aísle junto con el ARN, se puede eliminar, p. ej., por digestión con ADNasa. También se conocen en la técnica métodos que

aíslan específicamente el ARN, esencialmente libre de contaminaciones de ADN. Tal y como está explicado, el ADN restante se puede eliminar además mediante digestión con ADNasa y/o el posible uso de cebadores que abarcan intrones en caso de que la expresión de la molécula de ARN de biomarcador se detecte mediante amplificación.

5 Un ejemplo de un método de extracción orgánica que se basa en el fenol/cloroformo para el aislamiento del ARN es el método de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987: «Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction». *Anal. Biochem.* (162): 156-159) y variaciones del mismo. De acuerdo con dicho método, el ARN se concentra durante la extracción con fenol/cloroformo en la fase acuosa y entonces se aísla posteriormente de ella, p. ej., por la adición de alcohol a la fase acuosa y la fijación del ARN a una fase sólida que con afinidad por los ácidos nucleicos. Un ejemplo de un producto comercial basado en el fenol/cloroformo es el kit 10 miRNeasy Mini (QIAGEN). Proporciona alta calidad y altos rendimientos de ARN total, incluidos los ARN pequeños de varias muestras biológicas diferentes.

Según una realización, el aislamiento de ARN en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende la fijación del ARN a una 15 fase sólida y la elución del ARN desde la fase sólida. El ARN se puede lavar antes de la elución. Las fases sólidas idóneas y las químicas compatibles para lograr la fijación del ARN a la fase sólida son conocidas por los expertos e incluyen, pero no se limitan a ellas, fases sólidas de sílice y fases sólidas con componentes de intercambio aniónico.

Según una realización, el aislamiento del ARN en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende la unión del ARN a una 20 fase sólida, tal como en particular una fase sólida de sílice, en donde se utilizan al menos un caótropo y/o al menos un alcohol para la unión del ARN. Tal y como se sabe, las sales caótropas incluyen, pero no se limitan a ellas, sales de guanidinio, tales como hidrocloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio (o isotiocianato de guanidinio (GTC)) o sales caótropas que comprenden tiocianato, yoduro, perclorato, tricloroacetato o trifluoroacetato, y similares. También 25 se pueden usar mezclas de sales caótropas. Dichas sales caótropas se pueden proporcionar, p. ej., como sales de sodio o de potasio. Los alcoholes que se usan con frecuencia para el aislamiento del ARN incluyen alcoholes alifáticos ramificados o no ramificados con 1 a 5 átomos de carbono y pueden seleccionarse entre metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol, y mezclas de los mismos. Las concentraciones idóneas de los caótropos y de los alcoholes las 30 conoce el experto en la técnica y no requieren una descripción detallada en la presente memoria. El ARN unido se puede lavar opcionalmente. Ya sea antes o después de la etapa de lavado opcional, se puede realizar una digestión con ADNasa. Tal digestión con ADNasa se puede realizar, p. ej., mientras el ARN está unido a la fase sólida fijadora de ácidos nucleicos. Las realizaciones idóneas para llevar a cabo la digestión correspondiente con la ADNasa se conocen en la técnica anterior. La elución se puede lograr, por ejemplo, con soluciones de elución clásicas, tales como agua, tampones de elución, en concreto tampones de elución bajos en sales. Los tampones de elución pueden comprender un tampón biológico, tal como Tris, MOPS, HEPES, MES, BIS-TRIS propano y otros. Preferiblemente, se utilizan soluciones de elución que no interfieran con las aplicaciones posteriores previstas.

Según una realización, el aislamiento del ARN en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende unir el ARN a una fase 35 sólida con grupos funcionales de intercambio aniónico y eluir el ARN desde la fase sólida. En concreto, se pueden utilizar métodos de aislamiento que se basan en el principio de cambio de carga. Los ejemplos de fases sólidas idóneas con grupos de intercambio aniónico comprenden, pero no se limitan a ellos, materiales, tales como materiales particulados o columnas, que están funcionalizados con grupos de intercambio aniónico. Los ejemplos de grupos de 40 intercambio aniónico son monoaminas, diaminas, poliaminas y grupos heterocíclicos aromáticos o alifáticos que contienen nitrógeno. El ARN se une a la fase sólida en las condiciones de fijación que permiten la unión del ARN a los grupos de intercambio aniónico. Con ese fin, se pueden usar las condiciones idóneas de pH y/o sal, tal y como conoce el experto en la técnica. El ARN unido se puede lavar opcionalmente. Puede usarse cualquier método de elución idóneo y los expertos en la técnica conocen las realizaciones idóneas. La elución puede, por ejemplo, implicar el cambio del valor de pH. Por tanto, la elución puede, p. ej., ocurrir a un pH de elución que es más alto que el pH de unión. Asimismo, la fuerza iónica se puede utilizar para ayudar o efectuar la elución. La elución también se puede 45 ayudar con calentamiento y/o agitación.

Para el aislamiento del ARN, las CTC aisladas en la etapa (A) y/o las vesículas extracelulares aisladas en la etapa (B) se pueden lisar para liberar el ARN desde las células o desde las vesículas extracelulares. Según una realización, el aislamiento del ARN comprende la lisis de las CTC aisladas en la etapa (A) para liberar el ARN de las células. Según 50 una realización, el aislamiento del ARN comprende la lisis o digestión de las vesículas extracelulares aisladas en la etapa (B) para liberar el ARN de las vesículas, tales como los exosomas.

El experto en la técnica conoce los métodos de lisis idóneos y, por tanto, no necesita una descripción detallada en la 55 presente memoria. Pueden usarse diferentes métodos para la lisis, y los métodos de lisis idóneos se conocen bien en la técnica anterior. Las CTC y/o las vesículas extracelulares pueden ponerse en contacto para la rotura, o sea, la lisis, con uno o más agentes de lisis. Estos pueden estar contenidos en un reactivo de disruptión, tal como un tampón de lisis. El ARN debe protegerse de la degradación por las nucleasas durante la lisis. Por lo general, el procedimiento de lisis puede incluir, pero no se limita a ello, acciones mecánicas, químicas, físicas y/o enzimáticas sobre la muestra. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a ello, la homogeneización, la aplicación de ultrasonidos, el calentamiento, la adición de uno o más detergentes y/o la adición de uno o más compuestos que degradan proteínas, tales como, por ejemplo, enzimas o sales que degradan proteínas. Además, se pueden añadir reductores, tales como β-mercaptopetanol o DTT, para la lisis para ayudar a la desnaturización de, p. ej., las nucleasas. Según una realización, 60 se usa al menos un caótropo, tal como preferiblemente al menos una sal caótropa, para la lisis y, por lo tanto, la rotura.

Los agentes caótropos idóneos y, en concreto, las sales caótropas idóneas, los conoce bien el experto en la técnica y también se describen en la presente memoria.

Según una realización, el ARN total se aísla del lisado de CTC. De acuerdo con una realización, el ARNm se aísla luego a partir del ARN procedente de las CTC totales, p. ej., por captura con oligo d(T) u otros métodos idóneos.

- 5 Según una realización, el ARN total se aísla del lisado/digestión de las vesículas extracelulares. Según una realización, el ARNm se aísla entonces a partir del ARN vesicular total, p. ej., mediante la captura con oligo d(T) u otros métodos idóneos.

Según una realización, el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende o consiste en ARNm. Por tanto, el método abarca la purificación del ARN que comprende el ARNm (entre otros tipos de ARN) así como la purificación 10 selectiva del ARNm. Se puede obtener el ARNm esencialmente puro, p. ej., mediante el uso de métodos de aislamiento de ARN que aislan selectivamente el ARNm (pero no otros tipos de ARN) de la muestra digerida. El ARNm purificado también se puede aislar secuencialmente, p. ej., aislando primero el ARN total, seguido del aislamiento selectivo del ARNm a partir del ARN total aislado. El experto en la técnica conoce los métodos idóneos para aislar selectivamente 15 el ARNm y, por lo tanto, no necesitan la descripción detallada. Un método bien consolidado se basa en la captura con los oligo(dT) pegados a una fase sólida (por ejemplo, una columna o perlas magnéticas), lo que permite aislar específicamente el ARNm a través de su cola de polí(A).

Según una realización, el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende miARN o consiste esencialmente 20 en ARN pequeños de hasta 350 nt de longitud, hasta 250 nt de longitud o hasta 200 nt de longitud, lo que incluye los miARN. Por lo tanto, el método abarca la purificación del ARN que comprende los miARN (entre otros tipos de ARN), así como la purificación específica de pequeñas moléculas de ARN que comprenden los miARN, pero de las que se eliminaron las moléculas de ARN grandes (por ejemplo, que tienen una longitud de 400 nt o más). Los métodos idóneos para enriquecer las moléculas de ARN específicamente pequeñas por separado de las moléculas de ARN grandes se conocen bien en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan describirse en la presente memoria.

Determinación de la expresión de moléculas de ARN de al menos un biomarcador

25 Tal y como se explicó más arriba, en la etapa (A) y en la etapa (B) se determina la expresión de las moléculas de ARN del uno o más biomarcadores analizados. Por lo tanto, se puede, por ejemplo, determinar si la molécula de ARN del biomarcador se expresa diferencialmente en las CTC y/o en las EV del sujeto. Una expresión diferencial puede ser, por ejemplo, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del biomarcador correspondiente en comparación con la expresión de dicha molécula de ARN del biomarcador en un control (por ejemplo, un sujeto sano). En una realización, 30 la sobreexpresión comprende la expresión *de novo* de las moléculas de ARN de un biomarcador en el sujeto. También se puede ver la expresión diferencial en ausencia o disminución de la expresión de las moléculas de ARN de un biomarcador acorde de modo que no se exprese o se exprese en menor grado en las CTC y/o en las EV en comparación con una muestra de referencia o de control. Por lo tanto, es ventajoso determinar el nivel de expresión de las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores en la etapa (A) y en la etapa (B).

35 En el presente método se puede utilizar cualquier método idóneo para determinar la expresión de las moléculas de ARN de un biomarcador. Los métodos correspondientes los conoce bien el experto en la técnica y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria. A continuación, se describen brevemente los métodos ejemplares idóneos y preferidos.

40 Según una realización, determinar la expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende la transcripción inversa para obtener ADNc. El ARN aislado se puede retrotranscribir a ADNc con el uso de una polimerasa de tipo retrotranscriptasa. La preparación de ADNc es ventajoso porque el ADNc es más estable que el ARN y puede usarse fácilmente, p. ej., en reacciones de amplificación. Los métodos idóneos para la transcripción inversa se conocen bien en la técnica y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria.

45 Según una realización, la determinación de la expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende al menos una etapa de amplificación, p. ej., la amplificación del ADNc. El experto en la técnica conoce bien los métodos de amplificación idóneos y, por tanto, no se necesita una descripción detallada en la presente memoria. Se prefiere realizar una reacción en cadena de la polimerasa como una reacción de amplificación. La amplificación proporciona amplícones que corresponden a las moléculas de ARN del uno o más biomarcadores analizados. El experto en la técnica puede determinar los cebadores idóneos para la amplificación. Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN de dos o más biomarcadores se determina en paralelo mediante la realización de una PCR múltiple con el uso del ADNc obtenido como molde. El experto en la técnica puede determinar los cebadores idóneos para la amplificación.

55 Además, la etapa de transcripción inversa se puede combinar con una etapa de amplificación mediante la realización de, p. ej., una reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcripción inversa. Las realizaciones idóneas se conocen bien en la técnica y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria.

- Según una realización, la determinación de la expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa de tipo cuantitativo. En una realización, se realiza una PCR semicuantitativa. En otra realización, el método no es semicuantitativo. La realización de una PCR cuantitativa (qPCR) es ventajosa porque permite determinar si las moléculas de ARN del biomarcador están, por ejemplo, sobreexpresadas en las CTC y/o en las EV. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos idóneos para realizar una PCR cuantitativa y, por lo tanto, no se necesita una descripción detallada en la presente memoria. Los valores de Ct obtenidos en la PCR cuantitativa para una de las una o más moléculas de ARN marcadoras analizadas pueden entonces registrarse y usarse para dar a conocer el perfil de expresión.
- Al realizar un análisis de amplificación cuantitativa, se puede determinar el nivel de expresión y se puede analizar si las moléculas de ARN de un determinado biomarcador están sobreexpresadas o no en la muestra analizada. Según una realización, se realiza una qPCR en tiempo real para determinar, p. ej., basándose en el valor de Ct, el nivel de expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador.
- Tal y como se demuestra en los ejemplos, en una realización, se determina si las moléculas de ARN de un biomarcador están sobreexpresadas o no. Si se analizan las moléculas de ARN de varios biomarcadores (por ejemplo, un panel de biomarcadores) para dar a conocer el perfil de expresión, que es lo preferido, se puede determinar si las moléculas de ARN de dos o más, cinco o más, o preferiblemente todos, los biomarcadores analizados están sobreexpresadas en las CTC y/o en las EV, preferiblemente en las CTC y en las EV. Los resultados (por ejemplo, sobreexpresión: sí/no) se pueden incluir en los perfiles de expresión que se proporcionan en las etapas (A) y (B), y luego se pueden utilizar para el análisis combinado en la etapa (C). Según una realización, se lleva a cabo una PCR cuantitativa acoplada a la transcripción inversa.
- El ADNc puede amplificarse con cebadores que son específicos para el ADNc de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador. El experto en la técnica puede determinar los cebadores idóneos para la amplificación. Según una realización, el ADNc se pone en contacto con los cebadores sentido y antisentido que son específicos para al menos un biomarcador y, además, con una ADN polimerasa para generar el ADN amplificado.
- Para mejorar la especificidad en la reacción de amplificación, se pueden usar cebadores que se saltan los intrones. Esto evita una coamplificación de contaminaciones de ADN que podrían estar presentes en la preparación del ARN. Adicionalmente o como alternativa, p. ej., en el caso de que no se disponga de cebadores que se salten los intrones, se puede digerir el ARN con la ADNasa antes de la transcripción inversa para eliminar en la preparación de ARN las contaminaciones de ADN correspondientes y, por tanto, aislar el ARN.
- Según una realización, se realiza una etapa de preamplificación después de la etapa de transcripción inversa y antes de realizar una PCR cuantitativa. Dicha etapa de preamplificación puede mejorar la sensibilidad. Esto puede resultar ventajoso si se tiene en cuenta que las CTC suelen ser poco frecuentes. Dependiendo de la muestra biológica, a menudo se pueden aislar de una a veinte o de una a diez células tumorales circulantes. La preamplificación de las moléculas de ADNc que corresponden a las moléculas de ARN del uno o más biomarcadores analizados, se proporciona más material de ADN para la etapa de amplificación posterior, que preferiblemente es una qPCR. Esto puede mejorar los resultados de la PCR cuantitativa. Al realizar una etapa de preamplificación acorde, debe asegurarse de que la especificidad de la PCR cuantitativa posterior no se vea afectada o perjudicada. Los expertos en la técnica conocen los métodos correspondientes y, por lo tanto, no se necesita una descripción detallada en la presente memoria.
- Según una realización, determinar la expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende determinar si las moléculas de ARN del al menos un biomarcador están sobreexpresadas. Según esta realización preferida, se determina si las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores están, o no, sobreexpresadas en las CTC y/o en las EV. Los expertos en la técnica conocen los métodos idóneos para determinar la sobreexpresión de un marcador de ARN y, por lo tanto, no se necesita una descripción detallada en la presente memoria. No obstante, más adelante se describen los ejemplos de los métodos idóneos y preferidos.
- Según una realización, determinar la expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende determinar si el nivel de expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador es mayor que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de ese biomarcador en un control o en una referencia, p. ej., determinado en un control sano o en un grupo de referencia si el sujeto es un paciente con cáncer. El presente método también abarca realizaciones que determinan en las etapas (A) y/o (B) si el nivel de expresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador es menor que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de ese biomarcador en un control o en una referencia, p. ej., determinado de nuevo en un control sano o en un grupo de referencia si el sujeto es un paciente con cáncer.
- De acuerdo con una realización, se determina que las moléculas de ARN de un biomarcador están sobreexpresadas si su expresión supera un umbral definido, también denominado en la presente memoria punto de corte. P. ej., si en la etapa (A) se determina que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador está por encima de un umbral definido, el perfil de expresión en (A) indica que las CTC son positivas para las moléculas de ARN de

dicho biomarcador. Si en la etapa (B) se determina que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador está por encima de un umbral definido, el perfil de expresión en (B) indica que las vesículas extracelulares son positivas para las moléculas de ARN de dicho biomarcador.

5 El umbral/punto de corte se establece preferiblemente de modo que el ensayo logre una especificidad para las moléculas de ARN del al menos un biomarcador de al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%. A continuación, se explica una forma idónea y ejemplar de determinar el umbral. Al analizar la expresión de las moléculas de ARN de un biomarcador en las CTC obtenidas de un paciente con cáncer, el umbral se puede definir al determinar la expresión media de dicho biomarcador en una población de donantes sanos de un tamaño idóneo (por ejemplo, n = 15-50, por ejemplo, n = 20). P. ej., al aislar las CTC de una muestra de sangre de un paciente con cáncer para su análisis, se puede utilizar como referencia la sangre de donantes sanos. La expresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador se determina en cada donante sano y luego se calcula la expresión media para las moléculas de ARN de cada biomarcador. Para determinar el umbral para las moléculas de ARN de cada biomarcador, se considera el valor medio determinado, p. ej., más una desviación estándar relevante. Un umbral determinado por el valor medio más una desviación estándar relevante (p. ej., desviación estándar de 1x) se puede verificar dos veces para determinar si el umbral se establece lo suficientemente alto/estricto para lograr la especificidad deseada de, p. ej., al menos el 90%. Esto puede, p. ej., verificarse doblemente mediante la aplicación del umbral a los resultados de expresión obtenidos para cada donante sano de la población de donantes sanos utilizada. Si se determina que las moléculas de ARN del biomarcador están sobreexpresadas en más del 10% de los donantes sanos, el umbral/punto de corte no es lo suficientemente estricto y debe incrementarse para lograr una especificidad del 90% (por ejemplo, estableciendo el umbral en el valor medio más el doble de la desviación estándar). De ese modo, se puede calcular un umbral idóneo para las moléculas de ARN de cada biomarcador a analizar. Por tanto, en una realización, el método comprende la aplicación de diferentes umbrales/puntos de corte para las moléculas de ARN de los biomarcadores analizados. También se puede aplicar un método acorde para determinar el umbral de expresión en las EV. P. ej., al aislar el ARN vesicular del plasma de un paciente con cáncer para su análisis (con o sin aislamiento previo de las vesículas extracelulares del plasma), se puede utilizar como referencia el plasma de donantes sanos. Es posible que sea necesario aplicar diferentes umbrales/puntos de corte para las moléculas de ARN de un biomarcador en función de si la expresión se determina en las CTC o en las EV.

30 Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN del biomarcador se determina realizando una PCR cuantitativa, que proporciona un valor de Ct para las moléculas de ARN del biomarcador analizado. Cuanto menor sea el valor de Ct, mayor será la expresión de las moléculas del ARN del biomarcador. Para determinar la sobreexpresión en comparación con la referencia/umbral de control/punto de corte (que puede determinarse, por ejemplo, como se describe más arriba), el ΔCt puede tomarse en consideración, p. ej., $\Delta Ct = (\text{Corte}_{(\text{gen})} - \text{CtMuestra}_{(\text{gen})})$. Si el ΔCt es superior a 0, p. ej., al menos 0,5 o al menos 1, esto indica la sobreexpresión de las moléculas de ARN del biomarcador correspondiente. Si el ΔCt es 0 o menor, esto indica que las moléculas del biomarcador correspondiente no están sobreexpresadas. En las realizaciones, se considera también un control adicional en el cálculo (por ejemplo, para detectar contaminaciones, tales como una contaminación de leucocitos, p. ej., basándose en la expresión de la CD45), p. ej., el determinar un $\Delta\Delta Ct$. El $\Delta\Delta Ct$ se puede determinar de acuerdo con el siguiente principio: $\Delta\Delta Ct = (\text{Corte}_{(\text{gen})} - \text{CtMuestra}_{(\text{gen})}) - (\text{Corte}_{(\text{control})} - \text{CtMuestra}_{(\text{control})})$.

40 Según una realización, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende realizar una o más reacciones de control para detectar o considerar las posibles contaminaciones. Tal y como se explica en el apartado de ejemplos, p. ej., una contaminación habitual en las CTC aisladas de la sangre se debe a los leucocitos. La expresión en los leucocitos de las moléculas de ARN de los biomarcadores puede influir en los resultados de la expresión. Por lo tanto, es ventajoso realizar una o más reacciones de control para determinar una contaminación correspondiente en las CTC y/o en las EV, opcionalmente en las CTC y en las EV. A continuación, los resultados pueden considerarse y, por tanto, incluirse en la determinación de la expresión de las moléculas de ARN del biomarcador. Se conocen en la técnica los métodos idóneos para tener en cuenta tales posibles contaminaciones y en los ejemplos también se describen los métodos ejemplares. Según una realización, se tiene en cuenta la expresión de un gen de control acorde, tal como p. ej. el CD45, en la determinación de la expresión de las moléculas de ARN del biomarcador, p. ej., al determinar en una qPCR el $\Delta Ct = (\text{Corte}_{(\text{gen})} - \text{CtMuestra}_{(\text{gen})}) - (\text{Corte}_{(\text{CD45})} - \text{CtMuestra}_{(\text{CD45})})$.

55 Cuando en la presente memoria se hace referencia a que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de un determinado biomarcador o de una combinación de biomarcadores en las CTC y/o en las EV es indicativo de un determinado hallazgo médico o diagnóstico, es evidente por sí solo que la expresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador o de la combinación de los biomarcadores se ha determinado, respectivamente, en las etapas (A) y/o (B).

Muestras biológicas que comprenden células tumorales circulantes y vesículas extracelulares

60 Tal y como se analiza en la presente memoria, el presente método se puede realizar como un método *in vitro* con el uso de una muestra biológica que se ha obtenido de un sujeto, p. ej., un paciente con cáncer. La muestra biológica comprende o se sospecha que comprende células tumorales circulantes y vesículas extracelulares, tales como en concreto exosomas. Las muestras biológicas idóneas que se sabe que comprenden células tumorales circulantes y

vesículas extracelulares se conocen bien en la técnica y, por lo tanto, no se necesita una descripción detallada en la presente memoria.

Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra líquida, tal como una muestra de biopsia líquida. Se conocen bien las ventajas de las muestras de biopsia líquida. Pueden obtenerse con facilidad mediante métodos mínimamente invasivos, como p. ej., extracción de sangre. Esto también simplifica la repetición de los análisis.

Según una realización, la muestra biológica es un líquido corporal. En una realización, la muestra biológica se selecciona de sangre, orina, derrames peritoneales y derrames pleurales, aspirados de médula ósea y aspirados del pezón. La muestra biológica se selecciona preferiblemente de sangre y orina. En una realización, la muestra biológica es sangre, en concreto, sangre periférica. Tal y como se demuestra con los ejemplos, las células tumorales circulantes y las vesículas extracelulares, tales como los exosomas, pueden aislarse de las muestras de sangre y analizarse con facilidad con los presentes métodos. También se describieron más arriba los métodos idóneos para procesar una muestra biológica acorde, tal como una muestra de sangre, y se remite a la descripción de más arriba. Los flujos de trabajo descritos permiten obtener el perfil de expresión en las CTC, así como en las vesículas extracelulares, comprendidas en las muestras biológicas correspondientes.

Sujetos

Tal y como se explicó más arriba, se describe que se puede obtener una muestra biológica de un sujeto. El método de acuerdo con la presente invención se puede realizar como un método *in vitro* utilizando la muestra biológica. Las realizaciones ejemplares idóneas y preferidas para las muestras biológicas y los flujos de trabajo para el análisis se comentan más arriba y se remite a la descripción correspondiente.

En una realización, el sujeto es un sujeto humano. Tal y como se comentó más arriba, el método de acuerdo con la presente invención puede usarse ventajosamente como ayuda para el diagnóstico, el pronóstico y/o la predicción en el tratamiento de los pacientes, en concreto de los pacientes con cáncer. Según una realización, el sujeto padece o se sospecha que padece una enfermedad, en concreto un cáncer. En una realización, el paciente padece o se sospecha que padece un cáncer sólido como el cáncer de mama. En una realización, el paciente padece o se sospecha que padece un cáncer sólido metastásico. Las metástasis incluyen, pero no se limitan a ellas, metástasis óseas, metástasis viscerales, metástasis linfocíticas y metástasis cerebrales. En una realización, la paciente padece o se sospecha que padece un cáncer de mama, en concreto un cáncer de mama metastásico. Según una realización, el tumor primario del cáncer de mama es HER2- o HER2+. Según una realización, el tumor primario de mama es HER2-. Según una realización, la paciente con cáncer de mama metastásico tiene o corre el riesgo de desarrollar metástasis óseas.

Tal y como también se demuestra mediante los ejemplos, el presente método es particularmente útil para el análisis de pacientes con cáncer de mama, en concreto, pacientes que padecen o que se sospecha que padecen un cáncer de mama metastásico. Por lo tanto, los hallazgos y las realizaciones preferidas que se describen en la presente memoria se aplican en concreto a las pacientes con cáncer de mama, en concreto a las pacientes con cáncer de mama metastásico. Sin embargo, el presente método también se puede aplicar a pacientes con otros cánceres y les resulta ventajoso. P. ej., el valor informativo de las CTC no solo se establece en el cáncer de mama, sino también en muchos otros cánceres sólidos que incluyen, entre otros, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón y otros. Las vesículas extracelulares, tales como los exosomas, desempeñan una función importante como parte del microambiente tumoral, p. ej., en el crecimiento de los fibroblastos, las reacciones desmoplásicas, pero también el inicio de la EMT y SC, así como la construcción de resistencia al tratamiento y el inicio de las metástasis. Esto es relevante para numerosos cánceres sólidos.

El presente método, que tiene en cuenta un análisis combinado de los resultados del perfil de expresión de las CTC y de los resultados del perfil de expresión de las EV, p. ej., al proporcionar un perfil de expresión combinado, por lo tanto, mejora la relevancia y, por lo tanto, el valor de la información diagnóstica, pronóstica y/o predictiva obtenida para los cánceres sólidos en general. Por consiguiente, en una realización, el sujeto es un paciente que padece o se sospecha que padece un cáncer sólido seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, sarcoma y melanoma. Tal y como se mencionó más arriba, el cáncer puede ser un cáncer metastásico.

Moléculas de ARN de biomarcadores

Las moléculas de ARN de biomarcadores circulantes son de gran valor. Los biomarcadores se analizan en la presente memoria basándose en la expresión del ARN y, por lo tanto, se denominan en la presente memoria moléculas de ARN de biomarcadores. Tal y como se explica en la presente memoria, las moléculas de ARN de biomarcadores analizadas en el presente método son a menudo transcritos de genes asociados a tumores (véase, por ejemplo, la tabla I para los genes correspondientes).

Las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores analizados en la etapa (A) y en la etapa (B) pueden seleccionarse de ARN codificantes de proteínas o no codificantes de proteínas, y preferiblemente se seleccionan de ARNm y miARN. Tal y como se analiza en la presente memoria, se prefiere analizar la expresión de las moléculas de ARN de dos o

más biomarcadores, preferiblemente un panel de marcadores, en la etapa (A) y/o en la etapa (B), más preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B).

Está consolidado en la técnica que los ARNm transcritos a partir de genes marcadores proporcionan información molecular valiosa. Por consiguiente, en una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizadas en la etapa (A) y/o en la etapa (B) son de tipo ARNm.

Las realizaciones idóneas y preferidas se debaten en la presente memoria. El ARNm de uno o más biomarcadores analizados en el presente método pueden representar transcritos de genes asociados a tumores. Los genes correspondientes se recogen, por ejemplo, en la tabla I (figura 5) y la expresión de los transcritos de los genes correspondientes se puede analizar como moléculas de ARN de biomarcadores gracias al presente método. También se conocen en la técnica otros transcritos de genes marcadores y los ARNm correspondientes que son idóneos como ARN de biomarcadores y el experto en la materia puede identificarlos sin demasiado trabajo. Por lo tanto, los transcritos de tipo ARNm también pueden usarse como molécula de ARN de biomarcador en el presente método. Según una realización, las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizados en la etapa (A) y en la etapa (B) son transcritos de tipo ARNm. Según una realización, se utilizan ARNm y miARN, respectivamente, y se analizan como moléculas de ARN de biomarcadores en la etapa (A) y en la etapa (B).

Según una realización, la molécula de ARN del biomarcador es de tipo miARN. Se sabe en la técnica que los miARN también pueden proporcionar información molecular valiosa. P. ej., se encontró que las firmas de miARN son características del tipo de tumor y de su origen durante el desarrollo. Los miARN ya se han asociado a las EV. Por consiguiente, en una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizadas en la etapa (A) y/o en la etapa (B) son un miARN. Se conocen en la técnica las realizaciones idóneas para los biomarcadores de tipo miARN y también las puede identificar el experto en la materia. Según una realización, las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizadas en la etapa (A) y en la etapa (B) son miARN.

Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador es un marcador tumoral asociado al cáncer. Tal y como se analiza también en detalle a continuación, las moléculas de ARN de un biomarcador pueden ser un marcador de respuesta negativa o positiva en distintas realizaciones, p. ej., también depende de su expresión en las CTC y/o en las EV.

Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador son de un biomarcador de diagnóstico, pronóstico y/o predictivo. Preferiblemente, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador son de un biomarcador pronóstico o predictivo. Específicamente, las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores pueden ser de un biomarcador asociado al tipo de cáncer que padece el sujeto o ser de relevancia potencial para este. En una realización preferida, las moléculas de ARN de biomarcador son de un biomarcador de diagnóstico, pronóstico y/o predictivo del cáncer de mama, en concreto del cáncer de mama metastásico.

Tal y como se explica en la presente memoria, se prefiere analizar la expresión de moléculas de ARN de múltiples biomarcadores en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B). Por consiguiente, se puede analizar un panel de biomarcadores en la etapa (A) y/o en la etapa (B). Según una realización, un panel de biomarcadores acorde que se analiza en el presente método puede comprender moléculas de ARN de 2 a 50, de 5 a 100, de 10 a 200, de 20 a 250, de 25 a 300 o de 50 a 500 biomarcadores diferentes. En la presente memoria se describen moléculas de ARN de biomarcadores idóneos y preferidos que se pueden analizar con el presente método. Un panel de biomarcadores acorde analizado en el presente método puede comprender uno o más biomarcadores seleccionados entre los biomarcadores que se muestran en la tabla I. Tal y como se comentó, en la tabla I se recogen, entre otros, genes marcadores asociados a tumores y el nivel de expresión del ARN de los genes correspondientes se puede analizar como moléculas de ARN de biomarcadores en el presente método. Por lo tanto, según una realización, las moléculas del al menos un biomarcador de tipo ARN analizado en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la (B), se selecciona de los transcritos de los genes recogidos en la tabla I. Según una realización, la expresión de un panel de biomarcadores acorde se analiza en el presente método, que comprende al menos 2, al menos 3, al menos 5, al menos 7, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 biomarcadores, tal y como se muestra en la tabla I. Según una realización, se analiza un panel de biomarcadores acorde en la etapa (A) y en la etapa (B).

La expresión de los ARN de varios biomarcadores (por ejemplo, el panel de biomarcadores) se puede analizar en cada etapa (A) y (B), por ejemplo, en paralelo o en un ensayo multiplexado, para determinar los resultados de expresión para dar a conocer el perfil de expresión de las CTC y el perfil de expresión de las EV.

Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) se seleccionan del grupo que consiste en (i) transcritos de genes para un fenotipo parecido al epitelial, (ii) transcritos de genes para un fenotipo parecido al basal, (iii) transcritos de genes para receptores con actividad tirosina cinasa, (iv) transcritos de genes para factores relacionados con la resistencia al tratamiento, (v) transcritos de genes para factores relacionados con la transición de epitelio a mesénquima o células madre tumorales, (vi) transcritos de genes para factores implicados en la vía del receptor de esteroides, y (vii) transcritos de genes para factores implicados en la modulación inmunitaria. Los genes correspondientes se conocen en la técnica. En la tabla I se recogen las realizaciones ejemplares de los genes para cada clase que se pueden usar junto con la presente invención. Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) se seleccionan entre los transcritos de los genes recogidos en la tabla I. Las moléculas de ARN de biomarcadores que

se comprobaron en los ejemplos están resaltadas en negrita. Como puede verse, ciertos biomarcadores, tales como p. ej. cMET y EGFR, pertenecen a más de una clase. Según una realización, la expresión de moléculas de ARN de uno o más biomarcadores pertenecientes a al menos dos, al menos tres, al menos 4, al menos cinco o al menos seis de las clases (i) a (vii) mencionadas anteriormente se analiza en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B). Según una realización, la expresión de moléculas de ARN de uno o más biomarcadores de cada clase (i) a (vii) antes mencionada se analiza en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B).

- 5 Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizado en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B), se seleccionan del grupo que consiste en

- 10 - transcritos de genes para un fenotipo parecido al basal,
 - transcritos de genes para receptores con actividad tirosina cinasa,
 - transcritos de genes para factores relacionados con la resistencia al tratamiento, y
 - transcritos de genes para factores relacionados con la transición de epitelio a mesénquima o células madre tumorales.

- 15 Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN de uno o más biomarcadores pertenecientes a al menos dos, al menos tres o las cuatro clases mencionadas anteriormente se analiza en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B).

- 20 Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) se seleccionan del grupo que consiste en AKT2, ALK, AR, AURKA, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, ERCC1, HER2, HER3, KRT5, mTOR, NOTCH1, PARP1, PI3K y SRC1. Las abreviaturas se explican en la tabla I (estos marcadores se presentan en negrita). Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN de al menos dos, al menos tres, al menos cinco, al menos siete, al menos 10, al menos 12, al menos 15, o de todos los biomarcadores antes mencionados, se analiza en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B).

- 25 Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador se seleccionan del grupo que consiste en HER2, HER3, cKIT, cMET, AURKA, mTOR y ERCC1. Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o de los siete biomarcadores antes mencionados, se analiza en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B).

- 30 Según una realización, las moléculas de ARN del al menos un biomarcador analizado en la etapa (A) y/o en la etapa (B) se seleccionan del grupo que consiste en HER2, HER3, cKIT, cMET, AURKA y mTOR. Según una realización, al menos HER2 y/o HER3 se analizan como moléculas de ARN de al menos un biomarcador. Según una realización, se analiza al menos AURKA como molécula de ARN de al menos un biomarcador. Según una realización, se analiza al menos mTOR como molécula de ARN de al menos un biomarcador. Las ventajas de las realizaciones mencionadas anteriormente se describen a continuación y en los ejemplos. Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o de los seis biomarcadores antes mencionados, se analiza en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B).

- 35 Según una realización, al menos la expresión de las moléculas de biomarcadores de tipo ARN de HER2 y HER3 se determina en la etapa (A) y en la etapa (B). Según una realización, al menos la expresión de las moléculas de biomarcadores de tipo ARN de HER2, HER3, cMET y cKIT se determina en la etapa (A) y en la etapa (B). Según una realización, al menos la expresión de las moléculas de biomarcadores de tipo ARN de HER2, HER3, cMET, cKIT y AURKA se determina en la etapa (A) y en la etapa (B). Según una realización, al menos la expresión de las moléculas de biomarcadores de tipo ARN de HER2, HER3, cMET, cKIT, AURKA y mTOR se determina en la etapa (A) y en la etapa (B). Según una realización, al menos la expresión de las moléculas de biomarcadores de tipo ARN de HER2, HER3, cKIT, cMET, AURKA, mTOR y ERCC1 se determina en la etapa (A) y en la etapa (B).

- 40 Tal y como se demuestra en los ejemplos, el análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV que comprende los resultados de las moléculas de ARN de biomarcadores antes mencionados y las combinaciones de ARN de los biomarcadores proporciona información valiosa de diagnóstico, pronóstico y/o predicción que es útil para el tratamiento de los pacientes con cáncer, en concreto, de los pacientes con cáncer de mama, tales como las pacientes con cáncer de mama metastásico. La correlación entre la expresión del ARN del biomarcador en las CTC y/o en las EV y la respuesta al tratamiento que se ha encontrado basándose en el análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV se describe con más detalle en la presente memoria y se hace referencia a la descripción correspondiente.

Generación de las CTC, de las EV y del perfil de expresión combinado

- 45 Tal y como se demuestra en los ejemplos, los perfiles de expresión de las CTC y de las EV mostraron grandes diferencias. La frecuencia de las señales positivas correspondientes a una sobreexpresión de moléculas de ARN de un biomarcador analizado difería en las EV y en las CTC y, además, se observaron correlaciones inversas con la

respuesta al tratamiento para las moléculas de ARN de determinados biomarcadores (tales como, por ejemplo, mTOR), dependiendo de si se detectó una sobreexpresión en las CTC o en las EV. Por lo tanto, el análisis combinado de los perfiles de expresión obtenidos para las CTC y para las EV tal y como se da a conocer en la presente memoria mejora significativamente, entre otros, el valor predictivo y pronóstico de los resultados obtenidos. En función del enfoque del análisis pronóstico o predictivo realizado y/o del tipo de cáncer, el análisis de moléculas de ARN de diferentes biomarcadores, o sea, los correspondientes paneles de biomarcadores, puede ser de interés. Además, pueden ser importantes los diferentes perfiles de expresión. Por lo tanto, a continuación se describen ejemplos idóneos y preferidos ejemplares para generar y así dar a conocer el perfil de expresión de las CTC, el perfil de expresión de las EV y, además, el perfil de expresión combinado.

- 5 Según una realización, la expresión de moléculas de ARN de al menos un biomarcador idéntico se determina en la etapa (A) y en la etapa (B). P. ej., si las moléculas de ARN de dicho biomarcador están sobreexpresadas en las CTC, en las EV, o en ambas, puede entonces considerarse en el análisis combinado de los resultados. Como se explicó anteriormente, se puede dar a conocer un perfil de expresión combinado con el uso de los perfiles de expresión determinados en la etapa (A) y en la etapa (B). Tal y como se explicó más arriba, se prefiere determinar la expresión de moléculas de ARN de dos o más biomarcadores idénticos en la etapa (A) y en la etapa (B). Se han descrito más arriba realizaciones idóneas y preferidas para el número de biomarcadores de tipo molécula de ARN a analizar, así como determinados biomarcadores idóneos y preferidos de tipo moléculas de ARN, y se hace referencia a la descripción correspondiente. Según una realización, la expresión de las moléculas de ARN de los mismos biomarcadores se determina en la etapa (A) y en la etapa (B).
- 10 Según una realización, el método abarca la determinación de la expresión de moléculas de ARN de al menos un biomarcador divergente en la etapa (A) y en la etapa (B). Por lo tanto, el presente método también abarca realizaciones en las que las moléculas de ARN de un determinado biomarcador se analizan en la etapa (A), pero no en la etapa (B), o viceversa. Esto puede ser factible si, p. ej., las moléculas de ARN de un determinado biomarcador solo son significativas si se sobreexpresan en las CTC, pero no es significativa si se expresa en las EV (o viceversa).
- 15 Según una realización, el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente las etapas (A) y (B), comprende los resultados de las moléculas de ARN de los biomarcadores analizados que se determina que están sobreexpresados. Tal y como se demuestra en los ejemplos, a menudo se encontró que los biomarcadores cuyas moléculas de ARN se sobreexpresan en las CTC y/o en las EV se correlacionaban significativamente con la respuesta al tratamiento. Por lo tanto, es ventajoso incluir al menos los resultados de las moléculas de ARN de los biomarcadores analizados que se determina que están sobreexpresados. Por tanto, de acuerdo con una realización, el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (A) y/o en la etapa (B) solo comprende los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina que están sobreexpresados y no se incluyen los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que no están sobreexpresados. Según una realización alternativa, el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina que están sobreexpresados y adicionalmente comprende los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina que no están sobreexpresados. Tal y como se demuestra en los presentes ejemplos, el hallazgo de que una determinada molécula de ARN de biomarcador no se sobreexpresa en las CTC y/o en las EV también puede estar correlacionado significativamente con la respuesta al tratamiento y, por lo tanto, también puede tener un valor predictivo o pronóstico.
- 20 40 Por tanto, es ventajoso incluir al menos el resultado de que las moléculas de ARN de un determinado biomarcador no se sobreexpresan en las CTC y/o en las EV en los perfiles de expresión dados a conocer. Según una realización, el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (A) y/o en la etapa (B) comprende los resultados de expresión para las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizados en la etapa (A) y/o en la etapa (B), es decir, comprende los resultados de expresión positivos (sobreexpresados) así como negativos (no sobreexpresado). Preferiblemente, el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (A) y en la etapa (B) comprende los resultados de expresión para las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizados en la etapa (A) y en la etapa (B).
- 25 45 50 De acuerdo con una realización, la etapa (C) comprende usar, a partir de los perfiles de expresión determinados en la etapa (A) y/o determinados en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN determinados como sobreexpresados para el análisis combinado de los resultados. De acuerdo con una realización, la etapa (C) comprende usar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN que se ha determinado que se sobreexpresan para dar a conocer el perfil de expresión combinado. Según una realización, el perfil de expresión combinado dado a conocer en la etapa (C) solo comprende los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina en la etapa (A) y/o en la etapa (B) que están sobreexpresados y los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que no están sobreexpresados no se incluyen en el perfil de expresión combinado. Esta realización puede ser factible si el perfil de expresión combinado se da a conocer basándose en las moléculas de ARN de los biomarcadores que solo son significativas si se sobreexpresan en las CTC y/o en las EV. Según una realización alternativa, la etapa (C) comprende utilizar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determinó que están sobreexpresados y, además, los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que no se ha determinado que se sobreexpresan en la etapa (A) y/o en la etapa (B) para el análisis combinado de los resultados, respectivamente, para dar a conocer el perfil de expresión combinado. Tal y como se demuestra en los presentes ejemplos y tal y como se explicó anteriormente, el hallazgo de que las moléculas de ARN de un determinado biomarcador no se sobreexpresan en las

55 60 50 De acuerdo con una realización, la etapa (C) comprende usar, a partir de los perfiles de expresión determinados en la etapa (A) y/o determinados en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN determinados como sobreexpresados para el análisis combinado de los resultados. De acuerdo con una realización, la etapa (C) comprende usar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN que se ha determinado que se sobreexpresan para dar a conocer el perfil de expresión combinado. Según una realización, el perfil de expresión combinado dado a conocer en la etapa (C) solo comprende los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina en la etapa (A) y/o en la etapa (B) que están sobreexpresados y los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que no están sobreexpresados no se incluyen en el perfil de expresión combinado. Esta realización puede ser factible si el perfil de expresión combinado se da a conocer basándose en las moléculas de ARN de los biomarcadores que solo son significativas si se sobreexpresan en las CTC y/o en las EV. Según una realización alternativa, la etapa (C) comprende utilizar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determinó que están sobreexpresados y, además, los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que no se ha determinado que se sobreexpresan en la etapa (A) y/o en la etapa (B) para el análisis combinado de los resultados, respectivamente, para dar a conocer el perfil de expresión combinado. Tal y como se demuestra en los presentes ejemplos y tal y como se explicó anteriormente, el hallazgo de que las moléculas de ARN de un determinado biomarcador no se sobreexpresan en las

- CTC y/o en las EV también puede estar correlacionado significativamente con la respuesta al tratamiento y, por lo tanto, también tiene valor predictivo o pronóstico. Este es particularmente el caso cuando la sobreexpresión de un determinado biomarcador en las CTC tiene un significado diferente que cuando el mismo biomarcador se sobreexpresa en las EV. Esto se demuestra en los ejemplos basados en las moléculas de ARN de biomarcador mTOR. La sobreexpresión de mTOR en las CTC, pero no en las EV, está correlacionado significativamente con los pacientes que responden totalmente, mientras que la sobreexpresión de mTOR en las EV, pero no en las CTC, está correlacionado significativamente con los pacientes que no responden totalmente y, por lo tanto, con el fracaso del tratamiento. Así pues, el mismo transcripto mostró una correlación inversa con la respuesta al tratamiento en función de si el ARN de dicho biomarcador se expresaba en las CTC o en las EV. El uso de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV dados a conocer para un análisis combinado teniendo en cuenta adicionalmente los resultados de que dichos biomarcadores no se sobreexpresan en las CTC y/o en las EV, es, por lo tanto, ventajoso en las realizaciones. En las realizaciones, por lo tanto, es ventajoso y se prefiere incluir en el análisis combinado y, por lo tanto, en el perfil de expresión combinado, el resultado de que las moléculas de ARN de un biomarcador correspondiente no se sobreexpresa en las CTC y/o las EV. Según una realización, la etapa (C) comprende utilizar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B), los resultados para las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizados en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en las etapas (A) y (B), que se determina que son indicativos como marcador de respuesta para el análisis combinado de los resultados, que equivale a la generación del perfil de expresión combinado correspondiente.
- De acuerdo con una realización, la etapa (C) comprende utilizar, a partir de los perfiles de expresión determinados en la etapa (A) y/o determinados en la etapa (B), los resultados para las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizados en la etapa (A) y/o en la etapa (B) para el análisis combinado de los resultados, que equivale a la generación del perfil de expresión combinado. Preferiblemente, la etapa (C) comprende usar, a partir de los perfiles de expresión determinados en la etapa (A) y determinados en la etapa (B), los resultados para las moléculas de ARN de todos los biomarcadores analizados en la etapa (A) y en la etapa (B) para el análisis combinado de los resultados, que equivale a la generación del perfil de expresión combinado.

Además, el resultado de que las moléculas de ARN de un determinado biomarcador están reguladas a la baja en las CTC y/o en las EV también se puede incluir, si se determina, en el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (A) y/o en el perfil de expresión dado a conocer en la etapa (B). Los resultados correspondientes también se pueden utilizar para el análisis combinado en la etapa (C) o para dar a conocer el perfil de expresión combinado.

DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO, ESTADIFICACIÓN Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON CÁNCER, ENTRE OTROS

La información que se da a conocer basándose en el análisis combinado tal y como se da a conocer en la presente memoria puede usarse para respaldar el diagnóstico, el pronóstico, o para elegir el tratamiento más apropiado para los pacientes con cáncer. Los detalles de los pacientes con cáncer ya se describieron más arriba y se hace referencia a la descripción de más arriba, que también se aplica aquí. Posteriormente, se describen realizaciones idóneas y preferidas sobre cómo se puede utilizar el presente método como ayuda de diagnóstico, pronóstico y/o predicción en el tratamiento de los pacientes con cáncer. Esta descripción en concreto se aplica a los sujetos con cáncer de mama, en concreto con cáncer de mama metastásico. Cuando se debate si el nivel de expresión de las moléculas de ARN de un determinado biomarcador o de la combinación de biomarcadores de tipo ARN en las CTC y/o en las EV es indicativo de un determinado hallazgo médico o diagnóstico, es evidente que la expresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador o de la combinación de biomarcadores es, respectivamente, la que se ha determinado en la etapa (A) y/o (B), como se deducirá del contexto presentado.

Según una realización, el método comprende además utilizar los resultados del análisis combinado para el pronóstico médico, el diagnóstico y/o la elección del tratamiento. Tal y como se explica más arriba, el análisis combinado en la etapa (C) comprende preferiblemente dar a conocer un perfil de expresión combinado con el uso del perfil de expresión de las CTC dado a conocer en (A) y el perfil de expresión de las EV dado a conocer en (B). Por consiguiente, en una realización, el método comprende usar el perfil de expresión combinado para el pronóstico médico, el diagnóstico y/o la elección del tratamiento. El presente método puede comprender además el aporte de un pronóstico y/o diagnóstico médico basado en el perfil de expresión combinado.

Según una realización, el método comprende además usar los resultados del análisis combinado para predecir o seguir la respuesta al tratamiento. Según una realización, el método comprende además usar el perfil de expresión combinado para predecir o seguir la respuesta al tratamiento.

Según una realización, se predice que el paciente responderá o no responderá al tratamiento basándose en los resultados del análisis combinado. Según una realización, se predice que el paciente responderá, o se predice que no responderá al tratamiento basándose en el perfil de expresión combinado. El tratamiento se puede cambiar basándose en los resultados del análisis combinado, p. ej., con la administración de otro agente terapéutico en lugar de, o además de, el tratamiento existente.

Determinación de la eficacia del tratamiento contra el cáncer

Según una realización, el presente método es un método para determinar la eficacia de un tratamiento administrado a un sujeto humano que padece cáncer. Por consiguiente, el tratamiento cuya eficacia se determina es preferiblemente el tratamiento contra el cáncer. El tratamiento contra el cáncer puede seleccionarse entre quimioterapia, tratamiento hormonal, tratamiento dirigido, immunoterapia, tratamiento con inhibidores de la angiogénesis y radioterapia. El tratamiento dirigido contra el cáncer puede implicar el uso de un agente terapéutico que se dirija específicamente al cáncer. Los ejemplos de agentes terapéuticos dirigidos incluyen, pero no se limitan a ellos, fijadores terapéuticos, tales como anticuerpos terapéuticos y fragmentos funcionales de los mismos que se dirigen específicamente al cáncer mediante la fijación a, p. ej., HER2, EGFR o mTOR, o los correspondientes inhibidores de cinasas, que pueden ser moléculas pequeñas. Los agentes terapéuticos dirigidos incluyen, p. ej., agentes terapéuticos que se dirigen a HER2 (por ejemplo, anticuerpos anti-HER2, tales como el trastuzumab y los inhibidores de la cinasa de HER2, como el lapatinib), EGFR (por ejemplo, anticuerpos anti-EGFR como el cetuximab y los inhibidores del EGFR como el gefitinib), o mTOR (por ejemplo, inhibidores del mTOR como el everolímus). Además, El tratamiento puede dirigirse al entorno del cáncer, al dirigirse, p. ej., a los huesos (por ejemplo, tratamiento de estabilización ósea con, por ejemplo, anticuerpos terapéuticos como el denosumab o los bisfosfonatos), la vascularización (por ejemplo, inhibidores de la angiogénesis como el bevacizumab) y la inmunoterapia (por ejemplo, la inmunoterapia anti-PD-L1). Los detalles de los pacientes con cáncer ya se describieron más arriba y se hace referencia a la descripción anterior, que también se aplica aquí.

Según una realización, el tratamiento contra el cáncer cuya eficacia se determina comprende el tratamiento con un anticuerpo terapéutico. En una realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo dirigido. En una realización, el anticuerpo terapéutico es un anticuerpo anti-RANKL, preferiblemente el denosumab.

Según una realización, el tratamiento contra el cáncer cuya eficacia se determina comprende un tratamiento de estabilización ósea. El tratamiento de estabilización ósea se usa con frecuencia en el tratamiento antineoplásico de cánceres sólidos, tales como el cáncer de mama, para prevenir o tratar la metástasis ósea. Según una realización, el tratamiento de estabilización ósea comprende el tratamiento con un anticuerpo anti-RANKL y/o los bisfosfonatos. El anticuerpo anti-RANKL puede ser el denosumab. Cualquier descripción dada a conocer en la presente memoria relacionada con el tratamiento de estabilización ósea se aplica en concreto a un tratamiento con un anticuerpo anti-RANKL, tal como el denosumab, específicamente.

Tal y como se demuestra con los ejemplos, la presente invención puede usarse ventajosamente para predecir la respuesta al tratamiento del cáncer, en concreto a la quimioterapia y al tratamiento de estabilización ósea, basándose en el análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV.

Utilización de los resultados del presente método

Según una realización, el método comprende además usar los resultados del análisis combinado, preferiblemente del perfil de expresión combinado, para clasificar al sujeto en función de los perfiles de expresión determinados en (A) y (B). Opcionalmente, la clasificación comprende asignar al sujeto a una o más de las siguientes clases:

- 35 - Respuesta al tratamiento, tal como la respuesta al tratamiento dirigido, quimioterapia, tratamiento hormonal y/o radioterapia;
- Fracaso del tratamiento, tal como el fracaso del tratamiento dirigido, quimioterapia, tratamiento hormonal y/o radioterapia;
- Supervivencia libre de enfermedad;
- 40 - Supervivencia total;
- Pronóstico de reevaluación;
- Cualificación de diagnósticos complementarios (cDx); y/o
- Estratificación para el desarrollo de fármacos.

Según una realización, el método comprende además usar los resultados del análisis combinado, preferiblemente del perfil de expresión combinado, para predecir o detectar la progresión del cáncer. El presente método puede usarse como ayuda para detectar o predecir el desarrollo de las metástasis.

Además, el presente método puede usarse como ayuda para detectar o predecir el desarrollo de las metástasis que tienen un estado diferente al del tumor primario. P. ej., si un marcador tumoral asociado al cáncer (por ejemplo, HER2) no se expresa en el tumor primario (por ejemplo, estado: HER2-) según se refleja en el perfil de expresión de las EV, en donde se determina que el ARN del biomarcador correspondiente (por ejemplo, HER2) no se expresa (o que no está sobreexpresado), pero se determina que está sobreexpresado en las CTC y se incluye en el perfil de expresión de las CTC, el análisis combinado del perfil de expresión de las CTC y del perfil de expresión de las EV es indicativo de que las metástasis derivadas de tales CTC tendrán un estado diferente (p. ej., HER2+) al del tumor primario. En consecuencia, este es un indicador de que las metástasis requieren un tratamiento diferente al del tumor primario (por

ejemplo, tratamiento dirigido contra HER2). Se describe, pero no se reivindica, que el método comprende además administrar al paciente un tratamiento dirigido apropiado basado en el resultado de expresión obtenido para las CTC (por ejemplo, tratamiento dirigido contra HER2, si las CTC se determina que son HER2 positivas, mientras que las EV son HER2 negativas). Por consiguiente, la presente invención, que utiliza los perfiles de expresión de las CTC y de las EV para un análisis combinado de los resultados, es particularmente ventajosa. Ello permite la detección precoz de tales mecanismos de metástasis que, si no se detectan, pueden ser perjudiciales para el paciente.

Según una realización, el método comprende además usar los resultados del análisis combinado, preferiblemente del perfil de expresión combinado, para la estratificación del tratamiento.

Según una realización, el método comprende realizar las etapas (A) a (C) en diferentes momentos y comparar los resultados. La determinación del perfil de expresión de las moléculas de ARN del uno o más biomarcadores analizados en las células tumorales circulantes y en las EV, y usar los perfiles de expresión determinados de las CTC y de las EV para un análisis combinado de los resultados, p. ej., dando a conocer un perfil de expresión combinado, en un segundo momento se realiza mediante el método de acuerdo con la invención. El presente método se puede realizar repetidamente en un segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto o múltiples puntos temporales diferentes. En cada caso, 10 los resultados del análisis combinado, como el perfil de expresión combinado, proporcionado para un momento determinado, se pueden comparar entre sí. La comparación de, p. ej., los perfiles de expresión combinados obtenidos para al menos uno, al menos dos o al menos tres puntos temporales diferentes resulta ventajosa, p. ej., para vigilar una respuesta al tratamiento o la progresión de la enfermedad.

20 También se dan a conocer los métodos correspondientes para el diagnóstico, pronóstico, estadificación y seguimiento de los pacientes con un cáncer basados en el análisis combinado que se realiza con el método de acuerdo con el primer aspecto. Por consiguiente, los métodos correspondientes comprenden la realización del método de acuerdo con el primer aspecto. También se dan a conocer los métodos para vigilar la progresión del cáncer, determinar la eficacia de un agente terapéutico o determinar un tratamiento dirigido para los pacientes con cáncer que comprende realizar el método según el primer aspecto.

25 CORRELACIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO

Tal y como se demuestra en los ejemplos, la sobreexpresión de las moléculas de ARN de determinados biomarcadores en las CTC y/o en las EV, o la ausencia de las mismas, puede ser indicativa de una respuesta positiva o negativa al tratamiento (p. ej., éxito o fracaso del tratamiento), a menudo depende además de si las moléculas de ARN de biomarcadores se detectan en las CTC o en las EV. Se aplican consideraciones similares en las realizaciones a las 30 moléculas de ARN de biomarcadores que no se expresan, lo que indica que no se sobreexpresan en las CTC y/o en las EV. El presente método, que utiliza los perfiles de expresión de las CTC y de las EV para un análisis combinado de los resultados, p. ej., para dar a conocer un perfil de expresión combinado, tiene en cuenta estos importantes factores, con lo que mejora así significativamente el valor de los resultados obtenidos. Posteriormente, se describen 35 de forma general importantes correlaciones con la respuesta observada al tratamiento. Estas correlaciones con la respuesta al tratamiento se explican luego con más detalle junto con los biomarcadores específicos cuando se encontraron tales correlaciones en los ejemplos realizados. Cuando se describe que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de un determinado biomarcador o de una combinación de biomarcadores de tipo ARN en las CTC y/o en las EV es indicativo de un determinado hallazgo médico o diagnóstico, tal y como se describe con más detalle 40 a continuación, es evidente de por sí que el nivel de expresión de las moléculas de ARN de tal biomarcador o combinación de biomarcadores se ha determinado, respectivamente, en la etapa (A) y/o (B), como se deducirá del contexto presentado.

Otros biomarcadores mostrarán correlaciones de acuerdo con los mismos patrones básicos descritos en la presente memoria, en los que las moléculas de ARN de biomarcadores específicos y sus niveles de expresión pueden diferir, p. ej., en función del tipo de cáncer y del tratamiento administrado. El presente método es una herramienta importante 45 para identificar y utilizar tales correlaciones que se identifican mediante un análisis combinado de los perfiles de expresión obtenidos para las CTC y para las EV.

Patrón de correlación general: la sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las CTC y/o en las EV está relacionada con una respuesta negativa al tratamiento

Las moléculas de ARN de un biomarcador expresado en las CTC y/o en las EV pueden ser de un marcador de la 50 respuesta negativa. P. ej., si se determina la sobreexpresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador en las CTC y/o en las EV, esto puede ser indicativo de una respuesta negativa al tratamiento. Esto se demuestra en los ejemplos. Posteriormente, se dan a conocer ejemplos que demuestran cómo tal hallazgo puede correlacionarse con una respuesta negativa al tratamiento.

Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la 55 sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa del

fracaso del tratamiento o de resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no está beneficiándose del tratamiento.

5 Tal y como se demuestra en los ejemplos, los biomarcadores analizados también pueden tener un significado diferente como marcador de respuesta negativa en función de si se expresan en las CTC o en las EV, en función del nivel de expresión detectado en las CTC o en las EV. El presente método, que se basa en un análisis combinado de los perfiles de expresión obtenidos para las CTC y para las EV, permite tener en cuenta estos factores.

10 Las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores son particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta negativa, si se expresan, en concreto si se sobreexpresan, en las CTC. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad y/o del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. La identificación en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, de la sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares puede ser indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no está obteniendo beneficios del tratamiento.

15 Las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores son particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta negativa, si se expresan, en concreto si se sobreexpresan, en las EV. Por consiguiente, en una realización que identifica en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativa de la progresión de la enfermedad y/o del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. La identificación en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, de la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no está obteniendo beneficios del tratamiento.

20 Además, las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores son particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta negativa, si se expresan, en concreto si se sobreexpresan, en las EV, pero no en las CTC (véase, por ejemplo, mTOR en los ejemplos). En consecuencia, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares, pero no en las células tumorales circulantes, es indicativa de la progresión de la enfermedad y/o del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. La identificación en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, de la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares, pero no en las células tumorales circulantes, es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no se beneficia del tratamiento.

25 Según otra realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes, pero no en las vesículas extracelulares, es indicativa de la progresión de la enfermedad y/o del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. En una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes, pero no en las vesículas extracelulares, es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no se beneficia del tratamiento.

30 El presente método, que se basa en el análisis combinado de los resultados de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV, permite considerar ventajosamente estos patrones de correlación de esta combinación de diferentes marcadores de la respuesta negativa, con lo que se mejoran así los resultados obtenidos. Esto tiene un valor en concreto cuando se analiza la expresión de las moléculas de ARN de varios biomarcadores.

35 Los detalles con respecto al sujeto, tipos de cáncer en concreto y ejemplos de tratamientos contra el cáncer se trataron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí.

50 Patrón de correlación general: la sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las CTC y/o en las EV está relacionada con una respuesta positiva al tratamiento

55 Las moléculas de ARN de un biomarcador expresado en las CTC y/o en las EV también pueden ser un marcador de la respuesta positiva. P. ej., si se determina la sobreexpresión de las moléculas de ARN de dicho biomarcador en las CTC y/o en las EV, esto puede ser indicativo de una respuesta positiva al tratamiento. Esto también se demuestra en los ejemplos. Posteriormente, se dan a conocer ejemplos que demuestran cómo tal hallazgo puede correlacionarse con una respuesta positiva al tratamiento.

Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el

análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento. «Respuesta al tratamiento», tal y como se usa en la presente memoria, incluye la enfermedad estable y la regresión tumoral.

5 Tal y como se demuestra en los ejemplos, los biomarcadores analizados también pueden tener un significado diferente como marcador de la respuesta positiva dependiendo de si se expresan, en concreto de si se sobreexpresan, en las CTC o en las EV. El presente método, que se basa en un análisis combinado de los perfiles de expresión obtenidos para las CTC y para las EV, permite tener en cuenta estos factores.

10 Las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores son particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta positiva si se expresan, en concreto si se sobreexpresan, en las CTC. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y, opcionalmente, en las vesículas extracelulares, es indicativa de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y, opcionalmente, en las vesículas extracelulares, es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

15 Las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores son particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta positiva si se expresan, en concreto si se sobreexpresan, en las EV. Por consiguiente, en una realización que identifica en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares y, opcionalmente, en las células tumorales circulantes, es indicativa de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares y, opcionalmente, en las células tumorales circulantes, es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

20 25 Además, las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores son particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta positiva si se expresan, en concreto si se sobreexpresan, en las CTC, pero no en las EV (véase, p. ej., mTOR en los ejemplos). Por consiguiente, en una realización que identifica en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes, pero no en las vesículas extracelulares, es indicativa de una supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes, pero no en las vesículas extracelulares, es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

30 35 40 Según otra realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares, pero no en las células tumorales circulantes, es indicativa de una supervivencia libre de la progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las vesículas extracelulares, pero no en las células tumorales circulantes, es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

45 El presente método, que se basa en el análisis combinado de los resultados de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV, permite considerar ventajosamente estos patrones de correlación de la combinación de diferentes marcadores de la respuesta positiva, con lo que se mejoran así los resultados obtenidos. Esto tiene un valor en concreto cuando se analizan las moléculas de ARN de varios biomarcadores.

50 45 Los detalles con respecto al sujeto, tipos de cáncer en concreto y ejemplos de tratamientos contra el cáncer se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí.

Patrón de correlación general: la ausencia de sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las CTC y/o en las EV está relacionada con una respuesta positiva al tratamiento

55 Además, las moléculas de ARN de biomarcadores también pueden representar un marcador de la respuesta positiva, si no están sobreexpresadas en las CTC y/o en las EV, en donde la ausencia de sobreexpresión también incluye la ausencia de la expresión. P. ej., si la expresión de las moléculas de ARN de tal biomarcador no se determina en las CTC y/o en las EV, esto puede ser indicativo de una respuesta positiva al tratamiento. Esto también se demuestra en los ejemplos. Posteriormente, se dan a conocer los ejemplos que ilustran cómo tal hallazgo puede correlacionarse con una respuesta positiva al tratamiento.

55 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN del al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativo de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN

del al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativo de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

5 Nuevamente, los biomarcadores analizados también pueden tener un significado diferente como marcador de respuesta positiva dependiendo de si no se expresan en las CTC o en las EV. El presente método, que se basa en un análisis combinado de los perfiles de expresión obtenidos para las CTC y para las EV, permite tener en cuenta estos factores.

10 Las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores pueden ser particularmente relevantes como marcadoras de la respuesta positiva, si no se expresan en las CTC. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN del al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares es indicativo de una supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN del al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares es indicativo de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento. Según una realización, las moléculas de ARN del biomarcador correspondiente que no se sobreexpresa en las CTC se expresa en las EV.

15 Las moléculas de ARN de ciertos biomarcadores pueden ser particularmente relevantes como marcadores de la respuesta positiva, si no se expresan en las EV. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN del al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativo de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN del al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativo de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento. Según una realización, las moléculas de ARN del biomarcador correspondiente que no se sobreexpresa en las EV se expresa en las CTC.

20 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí.

25 **30 Patrón de correlación específico: la sobreexpresión de los receptores con actividad tirosina cinasa como las moléculas de ARN del al menos un biomarcador en las CTC y/o en las EV está relacionada con una respuesta negativa al tratamiento**

30 Los ejemplos demuestran que la expresión de los receptores con actividad tirosina cinasa como biomarcador de tipo moléculas de ARN en las CTC y/o en las EV representa un marcador de la respuesta negativa. Los ejemplos demuestran que si se determina la sobreexpresión de tales receptores con actividad tirosina cinasa como biomarcador de tipo molécula de ARN en las CTC y/o en las EV, se encontró que era indicativo de una respuesta negativa al tratamiento, en concreto a la quimioterapia.

35 Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no está obteniendo beneficios del tratamiento. Preferiblemente, la expresión de al menos dos, al menos tres o al menos cuatro receptores con actividad tirosina cinasa se determina en los métodos correspondientes. Tal y como se demuestra en los ejemplos, la importancia aumenta con el número de receptores con actividad tirosina cinasa considerados. Según una realización, el receptor con actividad tirosina cinasa se selecciona de HER2, HER3, cKIT y cMET, y en donde, más preferiblemente, se determina la expresión de al menos dos, al menos tres o los cuatro receptores con actividad tirosina cinasa. Las combinaciones idóneas de biomarcadores con los receptores con actividad tirosina cinasa también se describen en otra parte de la presente memoria y se hace referencia a la descripción correspondiente.

40 50 55 Tal y como se demuestra en los ejemplos, las moléculas de ARN de tirosina cinasas receptoras como biomarcador son particularmente relevantes como marcadores de la respuesta negativa, si se expresan en las CTC. En consecuencia, en una realización que identifica en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de las moléculas de ARN de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares es indicativa de la

progresión de la enfermedad y/o del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Además, puede indicar que el agente terapéutico es ineficaz (véase más arriba). Tal y como se explicó más arriba, se analizan preferiblemente varios receptores con actividad tirosina cinasa. Según una realización, el receptor con actividad tirosina cinasa se selecciona de HER2, HER3, cKIT y cMET, y en donde se determina preferiblemente la expresión de al menos dos, al

5 menos tres o los cuatro receptores con actividad tirosina cinasa. Las combinaciones idóneas de biomarcadores de tipo receptor con actividad tirosina cinasa también se describen en otra parte de la presente memoria y se hace referencia a la descripción correspondiente.

Tal y como se demuestra mediante los ejemplos, los resultados obtenidos en las CTC son significativos por sí mismos. Sin embargo, los resultados mejoran si en el análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV 10 según la invención se tiene en cuenta adicionalmente la expresión de los receptores con actividad tirosina cinasa en las EV. Tal y como se demuestra además en los ejemplos, la significación aumenta con el número de tirosina cinasas receptoras consideradas en las CTC y en las EV. Por lo tanto, la evaluación combinada de la combinación de varios receptores con actividad tirosina cinasa, combinados en las CTC y en las EV, produjo la mayor significación.

15 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. En concreto, los receptores con actividad tirosina cinasa representan un marcador de la respuesta negativa en las pacientes con cáncer de mama, en concreto con cáncer de mama metastásico.

20 Según una realización, el tratamiento es la quimioterapia. Tal y como se demuestra en los ejemplos, se encontró que los receptores con actividad tirosina cinasa eran marcadores de la respuesta negativa en relación con la quimioterapia.

Por consiguiente, determinar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la 25 sobreexpresión de las moléculas de ARN del al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa del fracaso de la quimioterapia o de la resistencia a la quimioterapia.

25 Se describe, pero no se reivindica, que el método puede comprender además tratar al sujeto con un agente terapéutico diferente. P. ej., se puede administrar un tratamiento dirigido además, o en lugar de, la quimioterapia.

Patrón de correlación específico: la sobreexpresión de AURKA como el al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las CTC y/o en las EV está relacionado con una respuesta negativa al tratamiento

Los ejemplos demuestran que la expresión de las moléculas de ARN del biomarcador AURKA en las CTC y/o en las EV 30 representa un marcador de la respuesta negativa. Los ejemplos demuestran que si se determina que AURKA se sobreexpresa en las EV y/o en las CTC, esto era indicativo de una respuesta negativa al tratamiento, en concreto a un tratamiento de estabilización ósea, p. ej., que implica el uso de un anticuerpo anti-RANKL, tal como el denosumab. Estos hallazgos también son relevantes para el segundo aspecto según la presente invención y se aplican a él.

35 Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes es indicativa del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA 40 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no obtiene beneficios del tratamiento.

Tal y como se demuestra en los ejemplos, AURKA como molécula de ARN de biomarcador es particularmente 45 relevante como marcador de la respuesta negativa, si se expresa, en concreto se sobreexpresa, en las EV. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares 50 y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativa del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz.

55 Tal y como se demuestra en los ejemplos, los resultados obtenidos en las EV son significativos por sí mismos. Sin embargo, los resultados mejoran si los resultados de la expresión de AURKA en las CTC se tienen en cuenta adicionalmente en el análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV según la invención.

Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. La sobreexpresión de AURKA en concreto representa un marcador de la respuesta negativa en las pacientes con cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

- 5 Según una realización, el tratamiento es un tratamiento de estabilización ósea, en concreto que implica un anticuerpo anti-RANKL, tal como el denosumab. Tal y como se demuestra en los ejemplos, se encontró que AURKA es un marcador de la respuesta negativa en relación con dicho tratamiento de estabilización ósea. Por consiguiente, determinar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA en las vesículas extracelulares y/o las células tumorales circulantes es indicativa del fracaso del tratamiento con el denosumab, o de la resistencia al tratamiento con el denosumab.

10 Se describe, pero no se reivindica, que el método puede comprender además tratar al sujeto con un agente terapéutico diferente.

Patrón de correlación específico: la sobreexpresión de mTOR como el al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las EV (pero no en las CTC) está relacionada con una respuesta negativa al tratamiento

- 15 Los ejemplos demuestran que la expresión de mTOR como biomarcador de tipo molécula de ARN en las EV (no en las CTC) representa un marcador de la respuesta negativa. Los ejemplos demuestran que si la sobreexpresión de mTOR se determina en las EV, resultaba indicativo de una respuesta negativa al tratamiento. Por el contrario, si se encontraba que mTOR estaba sobreexpresado en las CTC (no en las EV), el mTOR representaba un marcador de la respuesta positiva (véase más abajo). Por lo tanto, el mismo transcrift (mTOR) mostró una correlación inversa con la respuesta al tratamiento dependiendo de si la expresión de mTOR se detectaba en las EV o en las CTC. Esto subraya además que el método según la presente invención, que utiliza los perfiles de expresión determinados para las EV y para las CTC para un análisis combinado de los resultados, es particularmente ventajoso.

20 Tal y como se demuestra en los ejemplos, mTOR es relevante como marcador de la respuesta negativa, si se expresa, o se sobreexpresa correspondientemente, en las EV. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares, pero no en las CTC, es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares, pero no en las CTC, es indicativa del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento.

25 Tal y como se demuestra en los ejemplos, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares, pero no en las CTC, es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz y, en consecuencia, que el sujeto no obtiene beneficios del tratamiento.

- 30 35 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. La sobreexpresión de mTOR en las EV (pero no en las CTC) en concreto representa un marcador de la respuesta negativa en las pacientes con cáncer de mama, en concreto cáncer de mama metastásico.

Patrón de correlación específico: la sobreexpresión de los receptores con actividad tirosina cinasa como el al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las CTC y AURKA en las EV está relacionada con una respuesta negativa al tratamiento

40 Puede resultar ventajoso considerar varios marcadores de la respuesta negativa en el análisis combinado de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV. Los marcadores de la respuesta negativa explicados más arriba también pueden considerarse en combinación. A continuación, se enumeran algunos ejemplos.

- 45 50 55 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, (i) la sobreexpresión de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y (ii) la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, (i) la sobreexpresión de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y (ii) la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en el medio extracelular es indicativa del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, (i) la sobreexpresión del receptor con actividad tirosina cinasa como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y (ii) la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no está obteniendo beneficios del tratamiento. De acuerdo con una realización, un hallazgo acorde es indicativo del fracaso de la quimioterapia y del denosumab.

Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer también se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. La paciente puede padecer cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

5 Los métodos de más arriba pueden determinar además, p. ej., la expresión de mTOR como molécula de ARN de otro biomarcador. Tal y como se explicó más arriba, si la expresión de mTOR se detecta en las EV (pero no en las CTC), esto también es indicativo de una respuesta negativa al tratamiento.

Tal y como se ha explicado más arriba, preferiblemente, se determina la expresión de dos o más tirosina cinasas receptoras y se tiene en cuenta en el análisis combinado (véase más arriba). Preferiblemente, el receptor con actividad tirosina cinasa se selecciona de HER2, HER3, cKIT y cMET. Tal y como se explica más arriba, se prefiere que se determine la expresión de dos o más, tres o más, o más preferiblemente todas, estas tirosina cinasas receptoras y se consideren en el análisis combinado.

Patrón de correlación específico: la sobreexpresión de ERCC1 como el al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las EV está relacionada con una respuesta negativa al tratamiento

15 Los ejemplos demuestran que la expresión de ERCC1 como biomarcador de tipo molécula de ARN en las EV representa un marcador de la respuesta negativa. Los ejemplos demuestran que, si la sobreexpresión de ERCC1 se determina en las EV, esto era indicativo de una respuesta negativa al tratamiento. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de ERCC1 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad y/o del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de ERCC1 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares indica que el agente terapéutico es ineficaz, lo que indica que el sujeto no está obteniendo beneficios del tratamiento.

20 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer también se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. El sujeto puede padecer cáncer de mama, en concreto cáncer de mama metastásico.

Más marcadores de la respuesta negativa

25 De igual modo, la sobreexpresión de las moléculas de ARN de otros biomarcadores, tales como AR y KRT5, parecía correlacionarse con una respuesta negativa al tratamiento y, por lo tanto, podría ser útil sola o en combinación con las moléculas de ARN de otros biomarcadores (véase más arriba) como marcador de la respuesta negativa. Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AR y/o KRT5 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AR y/o KRT5 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AR y/o KRT5 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares indica que el agente terapéutico es ineficaz.

30 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer también se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. El sujeto puede padecer cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

Patrón de correlación específico: la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las CTC (no en las EV) está relacionada con una respuesta positiva al tratamiento

35 Tal y como también se debatió en otra parte de la presente memoria, la expresión de mTOR en las CTC (no en las EV) se identificó como marcador de la respuesta positiva. Los ejemplos demuestran que si se determina la sobreexpresión de mTOR en las CTC (pero no en las EV), esto es indicativo de una respuesta positiva al tratamiento.

40 Por consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes, pero no en las vesículas extracelulares, es indicativa de supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes, pero no en las vesículas extracelulares, es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

45 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer también se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. El sujeto puede padecer cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

Otros marcadores de la respuesta positiva

De igual forma, la expresión de las moléculas de ARN de otros biomarcadores, tales como BRCA1 y PI3K, pareció correlacionarse con una respuesta positiva al tratamiento y, por lo tanto, podría ser útil sola o en combinación con moléculas de ARN de otros biomarcadores (véase más arriba) como marcadores de la respuesta positiva. Por

5 consiguiente, en una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de BRCA1 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de BRCA1 como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de la respuesta al tratamiento.

10 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de PI3K como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de PI3K como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y/o las vesículas extracelulares es indicativa de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

15 Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer también se explicaron en detalle más arriba y la descripción también se aplica aquí. El sujeto puede padecer cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

20 **Patrón de correlación específico: la ausencia de sobreexpresión de moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las CTC y/o en las EV está relacionada con una respuesta positiva al tratamiento**

Tal y como se ha explicado más arriba, las moléculas de ARN de biomarcadores también pueden representar un marcador de la respuesta positiva, si no están sobreexpresadas en las CTC y/o las EV, en donde la ausencia de sobreexpresión incluye la ausencia de expresión. P. ej., si no se determina la sobreexpresión de la molécula de ARN de dicho biomarcador en las CTC y/o en las EV, esto puede ser indicativo de una respuesta positiva al tratamiento. Esto, p. ej., se aplica a los biomarcadores que, cuando están presentes se encuentran sobreexpresados cada uno de ellos, son marcadores de la respuesta negativa (véase más arriba). Por consiguiente, la ausencia de expresión, o sea, la ausencia de sobreexpresión de los biomarcadores correspondientes, puede ser indicativa de una respuesta positiva al tratamiento. A continuación, se dan a conocer los ejemplos:

30 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN no está sobreexpresado en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes, preferiblemente en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes, es indicativo de la supervivencia libre de la progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN no está sobreexpresado en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes, preferiblemente en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes, es indicativo de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto obtiene beneficios del tratamiento. Tal y como se ha explicado más arriba, el tratamiento es en una realización un tratamiento de estabilización ósea, que implica en concreto el uso de un anticuerpo anti-RANKL, tal como el denosumab. Estos hallazgos también son relevantes para el segundo aspecto según la presente invención y se aplican a él.

35 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN de al menos las tirosina cinasas receptoras HER2 y HER3 y preferiblemente también cKIT y cMET, como biomarcadores no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares, preferiblemente las células tumorales circulantes y opcionalmente las vesículas extracelulares, es indicativo de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que las moléculas de ARN de al menos las tirosina cinasas receptoras HER2 y HER3, y preferiblemente también cKIT y cMET, como biomarcadores no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares, preferiblemente en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares, es indicativo de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento. Como se ha explicado más arriba, el tratamiento es en una realización la quimioterapia.

40 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que (i) las moléculas de ARN de al menos las tirosina cinasas receptoras HER2 y HER3 y preferiblemente también cKIT y cMET como biomarcadores no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares y (ii) las moléculas de ARN de AURKA como al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes es indicativo de la supervivencia libre de progresión. Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que (i) las moléculas de ARN de al menos las tirosina cinasas receptoras HER2 y HER3 y preferiblemente también cKIT y cMET como biomarcadores no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes y/o en las

células tumorales circulantes y (ii) las moléculas de ARN de AURKA como al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes es indicativo de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento.

5 Según una realización, identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, que (i) las moléculas de ARN de al menos las tirosina cinasas receptoras HER2 y HER3 y preferiblemente también cKIT y cMET como biomarcadores no están sobreexpresadas en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares y (ii) las moléculas de ARN de AURKA como al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y, opcionalmente, en las células tumorales circulantes es indicativo de la supervivencia libre de progresión y/o de la respuesta al tratamiento.

10 Estos biomarcadores también pueden combinarse con otros marcadores de la respuesta positiva. Los detalles se explicaron en otra parte de la presente memoria y se hace referencia a la descripción correspondiente.

Los detalles con respecto al sujeto, los tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer se explicaron en detalle más arriba, también junto con los marcadores específicos, y la descripción también se aplica aquí. El sujeto puede padecer cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

15 Según un segundo aspecto, se da a conocer un método para determinar la eficacia de un tratamiento en un sujeto o para predecir o vigilar la respuesta al tratamiento en un paciente, que comprende determinar el nivel de expresión de AURKA en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes. Tal y como se demuestra en los ejemplos y se explica más arriba, la detección de la expresión de AURKA proporciona una información valiosa. Remítase a la descripción de más arriba. Estos hallazgos con respecto a la relevancia de la expresión de AURKA en

20 las vesículas extracelulares como marcador de la respuesta ya se explicaron y debatieron en detalle más arriba y también se ilustran en los ejemplos. Remítase a la descripción anterior que también se aplica aquí. En resumen, los ejemplos demuestran que, si se determina la sobreexpresión de AURKA en las vesículas extracelulares, se encontraba que esto era indicativo de una respuesta negativa al tratamiento, en concreto a un tratamiento de estabilización ósea, p. ej., que implica el uso de un anticuerpo anti-RANKL, tal como el denosumab. Tal y como se demuestra en los ejemplos, los resultados obtenidos en las EV son significativos por sí mismos. Sin embargo, los resultados mejoran si

25 se tienen en cuenta además los resultados de expresión de AURKA en las CTC. Además, el hallazgo de que las moléculas de ARN de AURKA como al menos un biomarcador no están sobreexpresadas en las vesículas extracelulares y, opcionalmente, tampoco en las células tumorales circulantes, es indicativo de una respuesta positiva al tratamiento y, por lo tanto, de la respuesta al tratamiento, lo que indica que el sujeto está obteniendo beneficios del tratamiento. Tal y como se ha explicado más arriba, el tratamiento es en una realización un tratamiento de estabilización ósea, que en concreto implica el uso de un anticuerpo anti-RANKL, tal como el denosumab. Los detalles con respecto al sujeto, tipos de cáncer en concreto y los ejemplos de tratamientos contra el cáncer se analizan en detalle más arriba. El sujeto puede padecer cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico.

30 También se describen kits para ser usados en los métodos descritos más arriba. Dichos kits pueden comprender, por ejemplo, uno o más de lo siguiente:

- Uno o más componentes para aislar las células tumorales circulantes;
 - Uno o más componentes para aislar las vesículas extracelulares;
 - Uno o más componentes para aislar el ARN;
 - Una o más polimerasas de tipo retrotranscriptasa;
- 40 - Uno o más componentes para realizar una reacción de amplificación, en concreto para realizar una PCR cuantitativa, tal como p. ej., una ADN polimerasa, cebadores o sondas, p. ej., uno o más conjuntos de cebadores idóneos para amplificar las moléculas de ARN de biomarcadores descritos en detalle más arriba, o sea, el ADNc correspondiente.

45 Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los títulos dados a conocer en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención que pueden leerse con referencia a la especificación en su conjunto.

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones en cuestión, las formas singulares «un», «una», «la» y «el» incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La referencia a «la descripción» y «la invención» y similares incluye aspectos únicos o múltiples dados a conocer en la presente memoria; etc. Los aspectos dados a conocer en la presente memoria están englobados por el término «invención».

Según una realización, la materia en cuestión descrita en la presente memoria que comprende determinadas etapas en el caso de los métodos o que comprende determinadas características o componentes se refiere a la materia en cuestión que consiste en las correspondientes etapas o características o componentes.

Se prefiere seleccionar y combinar las realizaciones preferidas descritas en la presente memoria y el tema en cuestión específico que surge de una combinación correspondiente de las realizaciones preferidas también pertenece a la presente descripción.

EJEMPLOS

- 5 La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Pacientes y recogida de muestras

Se extrajo sangre de 30 pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) en el momento de la progresión de la enfermedad (T0) y en dos momentos de la estadificación clínica consecutivos (T1 y T2) durante el tratamiento, lo que dio lugar a un total de 90 muestras de sangre (3 muestras de cada paciente con CMM).

En el transcurso del tratamiento, estos 30 pacientes con CMM que no respondían en T0 se asignaron nuevamente a pacientes que responden o que no responden al tratamiento en los dos puntos de tiempo de la estadificación clínica consecutiva (T1 y T2). Los pacientes que responden al tratamiento y los que no responden al tratamiento se identificaron de acuerdo con los criterios RECIST.

- 15 Las muestras de sangre recogidas se procesaron de la siguiente manera:

a) Aislamiento de las células tumorales circulantes (CTC)

Las CTC se aislaron de 5 ml de sangre mediante selección inmunomagnética positiva dirigida a EpCAM, EGFR y HER2 (AdnaTest EMT2/StemCell Select™, QIAGEN; de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Brevemente, las células tumorales circulantes se marcaron con perlas inmunomagnéticas dirigidas a los antígenos epiteliales y asociados a tumores (EpCAM, EGFR y HER2), y se separaron mediante un concentrador de partículas magnéticas. Las células separadas se lisaron (tampón de Adnálisis) y después se purificó el ARNm a partir de estos lisados mediante las perlas magnéticas recubiertas con Oligo-(dT)25, tal y como se describe con más detalle a continuación.

b) Aislamiento de las vesículas extracelulares (EV) y aislamiento del ARN total vesicular

25 El aislamiento del ARN total de las vesículas extracelulares se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante a partir de 4 ml de plasma prefiltrado mediante el uso de una fijación basada en afinidad de dos etapas (purificación de las vesículas extracelulares y aislamiento del ARN total) a una columna centrifugable (exoRNeasy, QIAGEN). Brevemente, para la etapa de purificación de las vesículas extracelulares, se mezcló el plasma prefiltrado (excluidas las partículas mayores de 0,8 µm) con el tampón XBP y se fijó a una columna de afinidad centrifugable con la membrana exoEasy. Las vesículas extracelulares unidas se lavaron con el tampón XWP y luego se lisaron con QIAzol.

- 30 En la etapa de extracción del ARN, se añadió cloroformo al lisado de QIAzol y se recuperó la fase acuosa y se mezcló con etanol. El ARN total se pegó a una columna de centrifugación, donde se lavó tres veces y se eluyó.

c) Aislamiento del ARNm de (i) el lisado de las CTC y (ii) el ARN total vesicular, y retrotranscripción

A continuación, se purificó el ARNm a partir de (i) el lisado de las CTC y (ii) el ARN vesicular total mediante perlas magnéticas recubiertas con Oligo-(dT)25 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (AdnaTest EMT2/StemCell Detect™, QIAGEN). De este modo, se obtuvieron dos fracciones de ARNm distintas, a saber (i) el ARNm obtenido de las CTC y (ii) el ARNm obtenido de las EV.

A continuación, el ARNm aislado se retrotranscribió en ADNc de acuerdo con el protocolo del fabricante (AdnaTest EMT2/StemCell Detect™, QIAGEN), con lo que se generaron así dos fracciones de ADNc independientes, a saber (i) el ADNc obtenido de las CTC y (ii) el ADNc obtenido de las EV.

40 **d) Generación de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV**

El ADNc obtenido de las CTC y el ADNc obtenido de las EV fue posteriormente preamplificado y analizado mediante una qPCR de multimarcadores (AdnaPanel TNBC, QIAGEN). Se obtuvieron los perfiles de ARN de 17 genes biomarcadores (incluidos AKT2, ALK, AR, AURKA, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, ERCC1, HER2, HER3, KRT5, mTOR, NOTCH1, PARP1, PI3K y SRC1) y GAPDH; el CD45 sirvió de control de los leucocitos.

- 45 Para cada gen, los datos de expresión obtenidos se normalizaron mediante los datos de expresión de donantes sanos ($n = 20$) para el gen correspondiente. Para cada gen, se determinó una expresión media basada en los datos de los donantes sanos (sangre para las CTC y plasma para las EV). El punto de corte/umbral (valor medio más la desviación estándar requerida) para la sobreexpresión se estableció para lograr una especificidad de al menos el 90% para cada gen en las CTC y en las EV. Por lo tanto, se determinaron diferentes umbrales/puntos de corte para cada gen en las CTC y en las EV. A continuación, al punto de corte se le restó el Ct de la muestra correspondiente. Se puede suponer que varios de los genes de interés, p. ej., no se expresan exclusivamente en las CTC sino también, en cierta cantidad,

en los leucocitos contaminantes (aproximadamente 1000 leucocitos por muestra). Por lo tanto, se incluyó el CD45 para normalizar y así calcular una contribución de los leucocitos a cada gen (se construyó un valor de $\Delta\Delta Ct$). Los experimentos de titulación de los leucocitos mostraron que se deben considerar dos correlaciones:

- 5 1. Es posible que algunos genes de interés no se expresen en los leucocitos. Por lo tanto, para tales genes no es necesaria la corrección de los leucocitos. Aquí, el cálculo se puede realizar de la siguiente manera:

$$\Delta Ct = (\text{Corte}_{(\text{gen})} - \text{CtMuestra}_{(\text{gen})}).$$

- 10 2. La expresión tanto del gen de interés como de CD45 aumenta al aumentar el número de leucocitos que contienen la preparación de las CTC. Cuando se muestra en un gráfico con escala logarítmica, las dos curvas corren paralelas entre sí. Esto significa que el gen de interés conduce a una señal de fondo que depende del recuento de los leucocitos en la fracción de las CTC. Para eliminar la contribución de los leucocitos al nivel de expresión del gen de interés y así evitar los resultados falsos positivos, se calculó el nivel de expresión específico del gen de interés basándose en el $\Delta\Delta Ct$. $\Delta\Delta Ct = (\text{Corte}_{(\text{gen})} - \text{CtMuestra}_{(\text{gen})}) - (\text{Corte}_{(\text{CD45})} - \text{CtMuestra}_{(\text{CD45})})$. Esta corrección de los leucocitos basada en el CD45 también se integró para los genes que se vio que se expresaban en un nivel más bajo en los leucocitos. P. ej., los resultados que se debaten a continuación para las tirosina cinasas receptoras, mTor y AURKA, se calcularon basándose en el $\Delta\Delta Ct$.

$\text{Corte}_{(\text{gen})}$ = umbral/corte del biomarcador en los donantes sanos (valor medio + desviación estándar requerida para lograr una especificidad del 90%)

$\text{CtMuestra}_{(\text{gen})}$ = expresión del gen en la muestra del paciente (EV o CTC)

$\text{Corte}_{(\text{CD45})}$ = umbral/corte de CD45 en los donantes sanos

20 $\text{CtMuestra}_{(\text{CD45})}$ = expresión de CD45 en la muestra del paciente (CTC o EV)

Para el perfil de expresión de las EV y de las CTC, se determinó que una muestra era positiva para el biomarcador de tipo ARN concreto si el resultado era superior a 0. Se determinó que una muestra (CTC o EV) era negativa si el resultado era 0 o inferior.

Resultados

25 En general, el análisis de los datos mostró grandes diferencias en los perfiles de expresión de ARN en las EV y en las CTC. De los 17 genes de biomarcadores analizados, la observación general de la señal positiva fue de 223 de 1530 (15%) para las CTC y 108/1462 (7,4%) para las EV, y las señales solapantes en las CTC y en las EV eran 18/1530 (1%) solamente. En consecuencia, la frecuencia de las señales difería en las EV y en las CTC, y solo se encontró un pequeño número de señales de sobreexpresión coincidentes en las CTC y en las EV para las moléculas de ARN de los biomarcadores analizados.

30 Se encontró que la información obtenida del análisis del perfil de expresión de las CTC y el perfil de expresión de las EV era altamente complementaria y aditiva a la hora de mejorar, p. ej., los resultados pronósticos y predictivos con respecto a la capacidad de respuesta al tratamiento. Por lo tanto, el uso del perfil de expresión determinado de las CTC y el perfil de expresión determinado de las EV para un análisis combinado de los resultados, p. ej., al dar a conocer un perfil de expresión combinado, conduce a una relevancia pronóstica y predictiva mejorada en el diagnóstico del cáncer en comparación con considerar como alternativa solo el perfil de expresión de las CTC o solo el perfil de expresión de las EV. La combinación de los perfiles de expresión de las CTC y de las EV mejoraba inesperadamente el poder de diagnóstico, pronóstico y predictivo en comparación con un perfil de expresión individual de las CTC o de las EV.

40 Esto se ilustrará en los siguientes ejemplos donde se explican las correlaciones observadas de la expresión de los biomarcadores y la respuesta al tratamiento. Las correlaciones se calcularon mediante la prueba exacta de Fisher unilateral y los valores de $p \leq 0,05$ se interpretaron como significativos.

EJEMPLO 2: La sobreexpresión de al menos uno de los receptores con actividad tirosina cinasa HER2, HER3, cKIT y cMET en las CTC o en las EV se correlaciona con el fracaso del tratamiento

45 Pacientes y flujo de trabajo experimental

50 Los perfiles de expresión de las células tumorales circulantes (CTC) y de las vesículas extracelulares (EV) se generaron a partir de un total de 90 muestras de sangre recogidas de 30 pacientes con cáncer de mama metastásico en el momento de la progresión de la enfermedad (T0) y en dos momentos consecutivos de la estadificación clínica (T1 y T2) en el curso del tratamiento (para más detalles, consulte el ejemplo 1). Los pacientes con la enfermedad estable (pacientes que responden al tratamiento) y con la enfermedad progresiva (pacientes que no responden al tratamiento) se identificaron de acuerdo con los criterios RECIST y se subdividieron a su vez en pacientes positivos para el biomarcador (pos) y negativos para el biomarcador (neg). «Positivo» significa que se determinó la sobreexpresión, «negativo» significa que no se determinó la sobreexpresión (para el cálculo, consulte el ejemplo 1).

Resultados

La sobreexpresión de cuatro receptores con actividad tirosina cinasa (TK; TK ALL = HER2, HER3, cKIT y cMET) se analizó en las CTC y en las EV. En general, los cuatro TK se sobreexpresaban con mayor frecuencia en las CTC que en las EV, en los que, en las pacientes analizadas, HER2 se sobreexpresaba exclusivamente en las CTC. No se pudo

5 detectar ninguna correlación de HER2 con la respuesta al tratamiento en las CTC de las pacientes analizadas ($p = 0,10$; figura 1A). Sin embargo, se encontró que HER3 se sobreexpresaba en las CTC y en las EV. Se observó una correlación significativa con la respuesta al tratamiento (paciente que no responde al tratamiento) al analizar HER3 en las CTC (0,012) que se incrementó aún más cuando se combinaron los resultados de las señales de HER3 en las CTC o en las EV (0,004). Al valorar tanto HER2 como HER3 en combinación, la sobreexpresión de HER2 o HER3 en las CTC quedó correlacionada con el fracaso del tratamiento ($p = 0,005$; figura 1B). Esta correlación era aún más significativa cuando se realizó el análisis de los cuatro TK en las CTC, en donde en el 37% de las muestras se pudo detectar una sobreexpresión de al menos uno de los cuatro TK ($p = 0,004$; figura 1C). Sorprendentemente y a pesar de la menor frecuencia de la sobreexpresión de los TK en las EV, el análisis combinado de los perfiles de expresión de los TK en las CTC y en las EV arrojó los resultados más significativos ($p = 0,001$; figura 1D). Además de una mayor significación, también aumentó al 49% el porcentaje de muestras con sobreexpresión detectable de al menos uno de 10 los cuatro TK en las CTC o en las EV, lo que en particular refleja el mayor poder predictivo de la invención.

15 Además, se observó que la correlación del fracaso del tratamiento estaba relacionada principalmente con la quimioterapia (CTX) más que con el tratamiento con el denosumab. Las pacientes que no sobreexpresaban ninguno de los cuatro TK en las CTC respondieron bien a la CTX ($p = 0,0008$), mientras que las pacientes que sobreexpresaban al menos uno de los cuatro TK en las CTC no lo hicieron ($p = 0,57$).

EJEMPLO 3: La sobreexpresión de AURKA en las EV o en las CTC se correlaciona con la resistencia al denosumab

Pacientes y flujo de trabajo experimental

25 El perfil de expresión de las vesículas extracelulares (EV) se generó a partir de un total de 90 muestras de sangre recogidas de 30 pacientes con cáncer de mama metastásico en el momento de la progresión de la enfermedad (T0) y en dos momentos consecutivos de la estadificación clínica (T1 y T2) en el curso del tratamiento (para más detalles, consulte el ejemplo 1). Las pacientes con la enfermedad estable (pacientes que responden al tratamiento) y con la enfermedad progresiva (pacientes que no responden al tratamiento) se identificaron de acuerdo con los criterios RECIST y se subdividieron a su vez en pacientes que no recibieron el tratamiento con el denosumab (sin denosu) y pacientes que fueron tratadas con el denosumab (con denosu). El denosumab es un anticuerpo anti-RANKL utilizado para el tratamiento de los pacientes con cáncer, p. ej., para prevenir o tratar la metástasis ósea.

Resultados

35 Las pacientes que se encontró que eran positivas para AURKA en las EV mostraban una correlación con el fracaso del tratamiento con denosumab. Esto se demostró en las pacientes que sobreexpresaban AURKA en las EV (AURKA(EV)POS), en donde no se pudo detectar una correlación con la respuesta al tratamiento, lo que sugiere una correlación de la sobreexpresión de AURKA con el fracaso del tratamiento con el denosumab ($p = 0,13$; figura 2A). Por el contrario, en el grupo AURKA(EV)NEG, las pacientes respondieron muy bien al tratamiento con el denosumab y se correlacionó con la respuesta al tratamiento ($p = 0,0023$; figura 2B). En consecuencia, las pacientes que no sobreexpresaban AURKA en las EV respondieron bien al tratamiento con el denosumab ($p = 0,0023$), mientras que 40 las pacientes que sobreexpresaban AURKA en las EV no lo hicieron ($p = 0,13$).

45 Es importante destacar que la combinación de pacientes que sobreexpresan AURKA en las CTC (que no eran significativas por sí solas) y de pacientes con AURKA(EV)POS condujo a una correlación significativa de la sobreexpresión de AURKA con el fracaso del tratamiento con el denosumab ($p = 0,0024$). Además de una mayor significación tras el análisis combinado de los perfiles de expresión, el porcentaje de muestras con sobreexpresión detectable de AURKA también aumentó del 38% (AURKA solo en las EV) al 43% (AURKA en las CTC o en las EV), lo que refleja el mayor valor predictivo de la invención.

EJEMPLO 4: Correlación inversa entre la respuesta al tratamiento y la sobreexpresión de mTOR en las CTC y en las EV

Pacientes y flujo de trabajo experimental

50 Los perfiles de expresión de las células tumorales circulantes (CTC) y de las vesículas extracelulares (EV) se generaron a partir de un total de 90 muestras de sangre recogidas de 30 pacientes con cáncer de mama metastásico en el momento de la progresión de la enfermedad (T0) y en dos momentos consecutivos de la estadificación clínica (T1 y T2) durante el curso del tratamiento (para más detalles, consulte el ejemplo 1). Las pacientes con la enfermedad estable (pacientes que responden al tratamiento) y con la enfermedad progresiva (pacientes que no responden al tratamiento) se identificaron de acuerdo con los criterios RECIST.

55 En función de la respuesta de los pacientes en los diferentes momentos, se definieron cuatro grupos de respuesta:

Pacientes que responden totalmente:	Respuesta al tratamiento en T1 y T2
Pacientes que no responden totalmente:	Sin respuesta al tratamiento en T1 ni T2
Pacientes que responden tarde:	Fracaso del tratamiento en T1 pero respuesta en T2
Pacientes que no responden tarde:	Respuesta al tratamiento en T1 pero fracaso en T2

Los pacientes de cada uno de los cuatro grupos de respuesta se subdividieron a su vez en pacientes que no sobreexpresaban el mTOR (neg) y pacientes que sobreexpresaban el mTOR (pos).

Resultados

Sorprendentemente, la sobreexpresión de mTOR en las CTC se correlacionaba con una mejor respuesta total al tratamiento ($p = 0,01$; figura 3A). Esto es sorprendente en cierto modo ya que mTOR se considera un factor clave en la transición de epitelio a mesénquima que está correlacionada con la vía PI3K y, por lo tanto, a menudo se discute que representa un indicador de un peor desenlace.

Más detalladamente, este efecto positivo de mTOR en las CTC se correlacionaba con la quimioterapia ($p = 0,0065$). Esto fue respaldado por el hallazgo de que ya no se podía detectar una correlación con la respuesta a la quimioterapia en las pacientes sin sobreexpresión de mTOR en las CTC ($p = 0,43$).

Si bien se identificaron CTC que sobreexpresaban el mTOR en los cuatro grupos de respuesta, la correlación positiva con la respuesta al tratamiento se identificó predominantemente en el grupo que responde totalmente, donde aproximadamente el 59% tenía muestras de CTC positivas para el mTOR, frente a aproximadamente el 8,5% en las pacientes que no responden al tratamiento totalmente; aproximadamente el 8,5% en las que responden tarde y aproximadamente el 24% en las que no responden tarde.

Sin embargo, al contrario de lo que se encontró en las CTC, la sobreexpresión del mTOR en las EV se correlacionaba con las que no respondían totalmente y, por lo tanto, con el fracaso del tratamiento ($p = 0,006$; figura 3B). Esta correlación negativa se identificó predominantemente en el grupo de las que no responden totalmente (aproximadamente el 71% de las muestras positivas del mTOR de las EV; frente a aproximadamente el 14,2% en las que responden totalmente; aproximadamente el 14% en las que no responden tarde y el 0% en las que responden tarde).

Estos datos reflejan de nuevo el incremento del valor predictivo de la invención en comparación con los métodos convencionales.

En los ejemplos 1 a 4 se demuestra que los análisis de los transcriptomas de las CTC y de las EV correspondientes conducían a unos perfiles de expresión altamente diferenciales. Los ejemplos muestran que ciertos biomarcadores tienen una preferencia diferente por el tipo de analito (CTC o EV).

En ese contexto, las tirosina cinasas (TK = HER2, HER3, cKIT y cMET) se encontraron en las CTC con mayor incidencia y podrían correlacionarse con el fracaso del tratamiento, sobre todo de la quimioterapia, cuando se sobreexpresan en las CTC (37% de las muestras). La combinación de perfiles de TK derivados de las CTC y de las EV condujo a una correlación aún más significativa con el fracaso del tratamiento, sobre todo de la quimioterapia (49%), lo que afirma con claridad el aumento de la sensibilidad general del método inventivo (37% a 49%).

AURKA se encontró predominantemente en las EV y se correlacionó con el fracaso del tratamiento con el denosumab (anticuerpo anti-RANKL para proteger contra la metástasis ósea). Sorprendentemente, si se combinaba con pacientes que sobreexpresaban AURKA en las CTC, se obtenía un efecto complementario positivo que aumentó la sensibilidad general del 38% al 43%.

Se encontró que el mTOR estaba sobreexpresado en las CTC y en las EV. Sin embargo, dependiendo del tipo de analito analizado (CTC o EV), la sobreexpresión del mTOR se correlacionaba inversamente con la respuesta total o con el fracaso del tratamiento, respectivamente. Si bien el mTOR se sobreexpresaba predominantemente en las CTC procedentes de las que responden totalmente, se correlacionaba principalmente con la resistencia general al tratamiento cuando se sobreexpresaba en las EV.

Estos ejemplos reflejan con claridad el aumento del valor predictivo de la invención, en donde el perfil de expresión de las CTC y el perfil de expresión de las EV se utilizan para un análisis combinado de los resultados, en comparación con los métodos convencionales que se centran en un solo tipo de analito (ya sea CTC o EV).

EJEMPLO 5: La sobreexpresión de ERCC1 en las EV se correlaciona con el fracaso del tratamiento***Pacientes y flujo de trabajo experimental***

El perfil de expresión de las vesículas extracelulares (EV) se generó a partir de un total de 90 muestras de sangre recogidas de 30 pacientes con cáncer de mama metastásico en el momento de la progresión de la enfermedad (T0) y en dos momentos consecutivos de la estadificación clínica (T1 y T2) en el curso del tratamiento (para más detalles, consulte el ejemplo 1). Las pacientes con una enfermedad estable (pacientes que responden) y una enfermedad progresiva (pacientes que no responden) se identificaron de acuerdo con los criterios RECIST. En función de la respuesta de las pacientes en los diferentes momentos, se definieron cuatro grupos de respuesta:

Pacientes que responden totalmente:	Respuesta al tratamiento en T1 y T2
Pacientes que no responden totalmente:	Sin respuesta al tratamiento en T1 ni en T2
Pacientes que responden tarde:	Fracaso del tratamiento en T1 pero respuesta en T2
Pacientes que no responden tarde:	Respuesta al tratamiento en T1 pero fracaso en T2

Las pacientes de cada uno de los cuatro grupos de respuesta se subdividieron a su vez en pacientes que no sobreexpresaban el ERCC1 (neg) y pacientes con sobreexpresión del ERCC1 (pos).

10 ***Resultados***

La sobreexpresión de ERCC1 en las EV se correlacionó con las que no responden totalmente y, por lo tanto, con el fracaso del tratamiento ($p = 0,01$). La porción de sobreexpresión de ERCC1 en las EV aumenta con el aumento de la resistencia al tratamiento, lo que sugiere que el ERCC1 en las EV es un marcador de respuesta negativa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar la expresión de una o más moléculas de ARN biomarcadores, que comprende

(A) aislar el ARN de las células tumorales circulantes obtenidas de un sujeto, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado y proporcionar un perfil de expresión basado en los resultados;

5 (B) aislar el ARN de las vesículas extracelulares obtenidas del sujeto, determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado y proporcionar un perfil de expresión basado en los resultados; y

10 (C) utilizar los perfiles de expresión determinados en (A) y determinados en (B) para un análisis combinado de los resultados.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el análisis combinado comprende dar a conocer un perfil de expresión combinado con el uso del perfil de expresión determinado en (A) y el perfil de expresión determinado en (B).

3. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 2,

15 en donde el método comprende a)

- proporcionar una muestra biológica líquida obtenida del sujeto;
- retirar las células de la muestra biológica líquida, con lo que se proporciona así una muestra biológica sin células;
- aislar las células tumorales circulantes a partir de las células extraídas;
- en donde la etapa (A) comprende aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas;

20 - en donde la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células;

o en donde el método comprende b)

- proporcionar una muestra biológica líquida obtenida del sujeto;
 - aislar las células tumorales circulantes de la muestra biológica líquida;
- 25 - retirar las células restantes de la muestra biológica líquida de la que se aislaron las células tumorales circulantes, con lo que se proporciona así una muestra biológica sin células;
- en donde la etapa (A) comprende aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas;
 - en donde la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células;

30 o en donde el método comprende c)

- proporcionar al menos dos muestras biológicas líquidas del mismo tipo obtenidas del mismo sujeto;
- aislar las células tumorales circulantes a partir de al menos una de las muestras biológicas líquidas, en donde la etapa (A) comprende aislar el ARN de las células tumorales circulantes aisladas;
- obtener una muestra sin células a partir de al menos una de las muestras biológicas líquidas, en donde la etapa (B) comprende aislar el ARN de las vesículas extracelulares comprendidas en la muestra biológica sin células.

35 4. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en donde determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B), comprende uno o más de lo siguiente:

- (i) comprende la retrotranscripción para obtener el ADNc;
- (ii) comprende al menos una etapa de amplificación del ADNc; y/o
- (iii) comprende realizar una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

40 5. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en donde determinar la expresión de las moléculas de ARN de al menos un biomarcador en el ARN aislado en la etapa (A) y/o en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la (B), comprende determinar si las moléculas de ARN del al menos un biomarcador están

sobreexpresadas o no, en donde opcionalmente se determina que las moléculas de ARN de un biomarcador están sobreexpresadas si su expresión excede un umbral o corte definidos.

6. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene una o más de las siguientes características:

- 5 a) la muestra biológica tiene una o más de las siguientes características:
 - Es una muestra de biopsia líquida;
 - Es un líquido corporal;
 - Se selecciona de sangre, orina, derrames peritoneales y derrames pleurales, aspirados de médula ósea y aspirados del pezón;
- 10 b) el sujeto tiene una o más de las siguientes características:
 - Padece o se sospecha que padece una enfermedad;
 - Padece o se sospecha que padece un cáncer, en concreto un cáncer sólido;
- 15 c) las moléculas de ARN del al menos un biomarcador tienen una o más de las siguientes características:
 - Se seleccionan entre ARNm y miARN.
 - Es ARNm;
 - Es un marcador tumoral asociado al cáncer;
 - Es un biomarcador diagnóstico, pronóstico y/o predictivo;
 - Es un biomarcador pronóstico o predictivo;
 - Está asociado al cáncer de mama, en concreto al cáncer de mama metastásico;
 - Es un marcador de respuesta positiva o negativa;
- 20 d) la molécula de ARN del al menos un biomarcador se selecciona de
 - (vi) el grupo que consiste en transcritos de genes para un fenotipo similar al epitelial, transcritos de genes para un fenotipo similar al basal, transcritos de genes para receptores con actividad tirosina cinasa, transcritos de genes para factores relacionados con la resistencia al tratamiento, transcritos de genes para factores relacionados con la transición de epitelio a mesénquima o células madre tumorales, transcritos de genes para factores implicados en la vía del receptor de esteroides, y transcritos de genes para factores implicados en la modulación inmunitaria; preferiblemente los transcritos de los genes correspondientes que se muestran en la tabla I;
 - (vii) el grupo que consiste en transcritos de genes para un fenotipo de tipo basal, transcritos de genes para receptores con actividad tirosina quinasa, transcritos de genes para factores relacionados con la resistencia al tratamiento, transcritos de genes para factores relacionados con la transición de epitelio a mesénquima o células madre tumorales; preferiblemente los transcritos de los genes correspondientes que se muestran en la tabla I;
 - (viii) el grupo que consiste en AKT2, ALK, AR, AURKA, BRCA1, cKIT, cMET, EGFR, ERCC1, HER2, HER3, KRT5, mTOR, NOTCH1, PARP1, PI3K y SRC1;
 - (ix) el grupo que consiste en HER2, HER3, cKIT, cMET, AURKA, mTOR y ERCC1; y/o

- (x) el grupo que consiste en HER2, HER3, cKIT, cMET, AURKA y mTOR;
y/o
e) en la etapa (A) y en la etapa (B) se determina al menos la expresión de las moléculas de ARN de uno o más de los biomarcadores siguientes
- 5 (x) HER2;
 (xi) HER3;
 (xii) HER2 y HER3;
 (xiii) AURKA;
 (xiv) mTOR;
- 10 (xv) HER2, HER3, cMET y cKIT;
 (xvi) HER2, HER3, cMET, cKIT y AURKA;
 (xvii) HER2, HER3, cMET, cKIT, AURKA y mTOR; y/o
 (xviii) HER2, HER3, cKIT, cMET, AURKA, mTOR y ERCC1.
- 15 7. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, que tiene una o más de las siguientes características:
- (a) en donde la etapa (C) comprende utilizar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina que están sobreexpresados para el análisis combinado de los resultados, preferiblemente para dar a conocer el perfil de expresión combinado;
- 20 (b) en donde la etapa (C) comprende usar, a partir del perfil de expresión determinado en la etapa (A) y/o determinado en la etapa (B), preferiblemente en la etapa (A) y en la etapa (B), los resultados de los biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina que están sobreexpresados y, además, los resultados de biomarcadores de tipo ARN analizados que se determina que no están sobreexpresados en la etapa (A) y/o en la etapa (B) para el análisis combinado de los resultados, preferiblemente para dar a conocer el perfil de expresión combinado.
- 25 8. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el método comprende además
- utilizar los resultados del análisis combinado, preferiblemente del perfil de expresión combinado, para el pronóstico médico, el diagnóstico y/o la elección del tratamiento, o para predecir o seguir la respuesta al tratamiento; o
 - utilizar los resultados del análisis combinado, preferiblemente del perfil de expresión combinado, para predecir o detectar la progresión del cáncer y/o para la estratificación del tratamiento.
- 30 9. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en donde identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad, del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento.
- 35 10. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en donde identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de moléculas de ARN de al menos un biomarcador en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares es indicativa de la supervivencia libre de progresión o de la respuesta al tratamiento.
- 40 11. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en donde identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y/o en las vesículas extracelulares, preferiblemente en las células tumorales circulantes y opcionalmente en las vesículas extracelulares, es indicativa de la progresión de la enfermedad, del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento, en concreto de la quimioterapia.
- 45 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene una o más de las siguientes características:
- La expresión de al menos dos, al menos tres o al menos cuatro receptores con actividad tirosina cinasa se determina en la etapa (A) y/o en la etapa (B);

- El receptor con actividad tirosina cinasa se selecciona de HER2, HER3, cKIT y cMET;
- El receptor con actividad tirosina cinasa se selecciona de HER2, HER3, cKIT y cMET y la expresión de al menos dos, al menos tres o los cuatro receptores con actividad tirosina cinasa se determina en la etapa (A) y/o en la etapa (B).

- 5 13. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 12, en donde identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares y/o en las células tumorales circulantes, preferiblemente en las vesículas extracelulares y opcionalmente en las células tumorales circulantes, es indicativa de la progresión de la enfermedad, del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento.
- 10 14. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 13, que tiene una o más de las siguientes características:
 - (i) el tratamiento es o comprende un tratamiento de estabilización ósea, en concreto uno que implica el uso de un anticuerpo anti-RANKL, más preferiblemente el denosumab;
 - (ii) el sujeto es un paciente que padece un cáncer de mama, en concreto, cáncer de mama metastásico; y/o
 - (iii) el método comprende además tratar al sujeto con un agente terapéutico diferente.
- 15 15. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 14, en donde identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, (i) la sobreexpresión de al menos un receptor con actividad tirosina cinasa como biomarcador de tipo molécula de ARN en las células tumorales circulantes y (ii) la sobreexpresión de AURKA como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares es indicativa de la progresión de la enfermedad, del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento.
- 20 16. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 15, en donde identificar en el análisis combinado, preferiblemente en el perfil de expresión combinado, la sobreexpresión de mTOR como al menos un biomarcador de tipo molécula de ARN en las vesículas extracelulares, pero no en las células tumorales circulantes, es indicativa de la progresión de la enfermedad, del fracaso del tratamiento o de la resistencia al tratamiento.

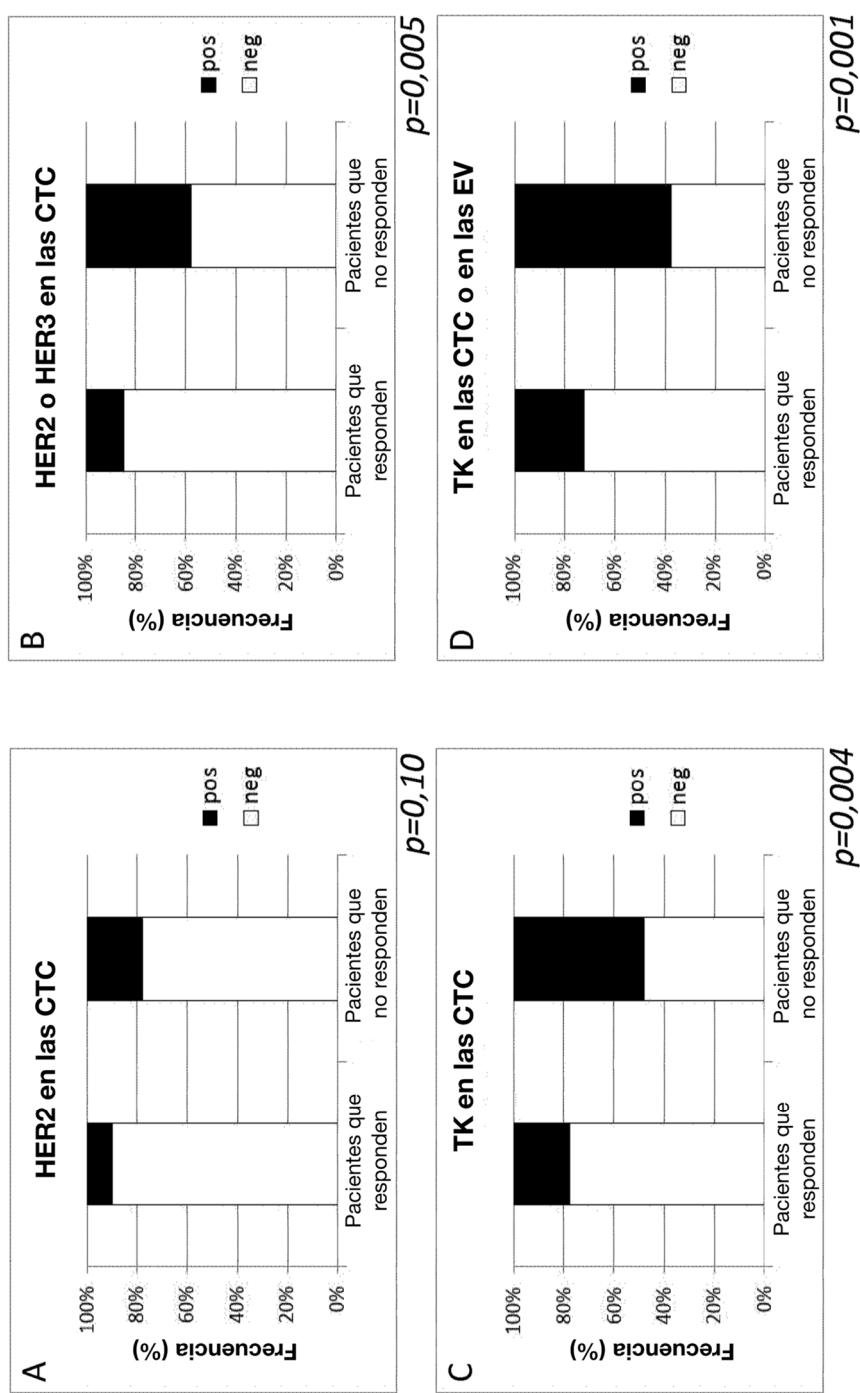


Fig. 1

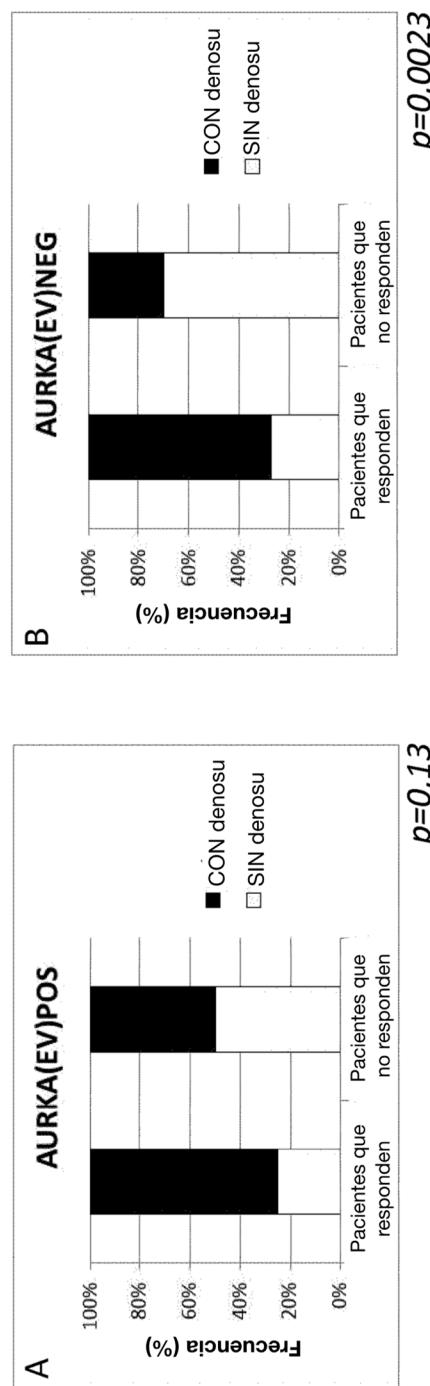


Fig. 2

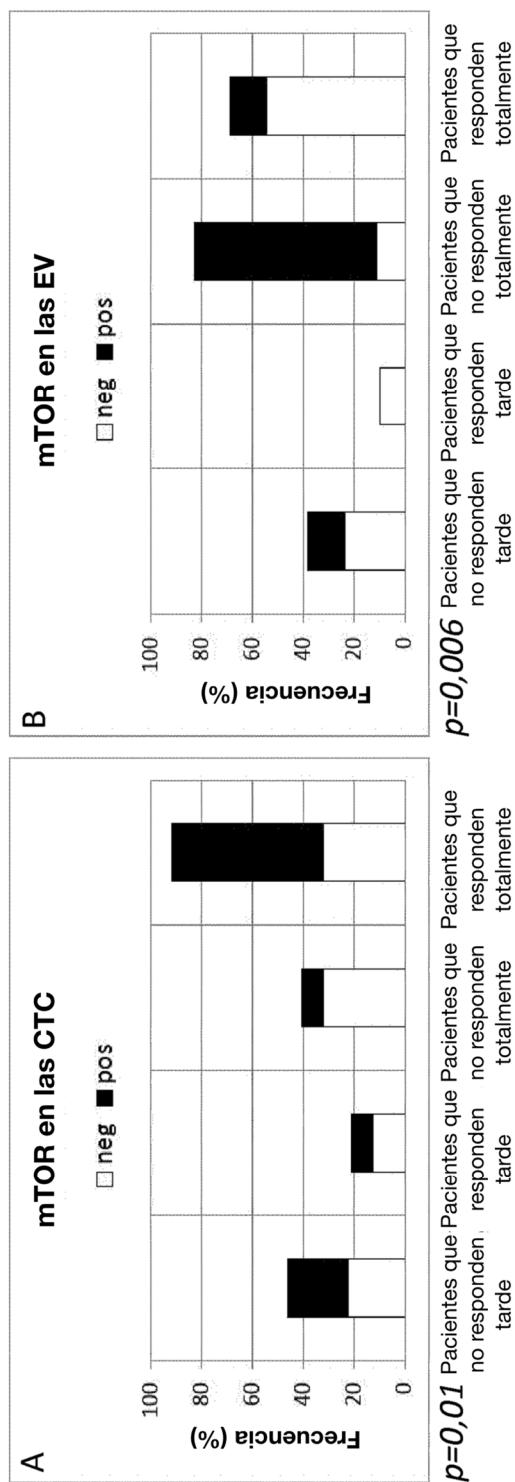


Fig. 3

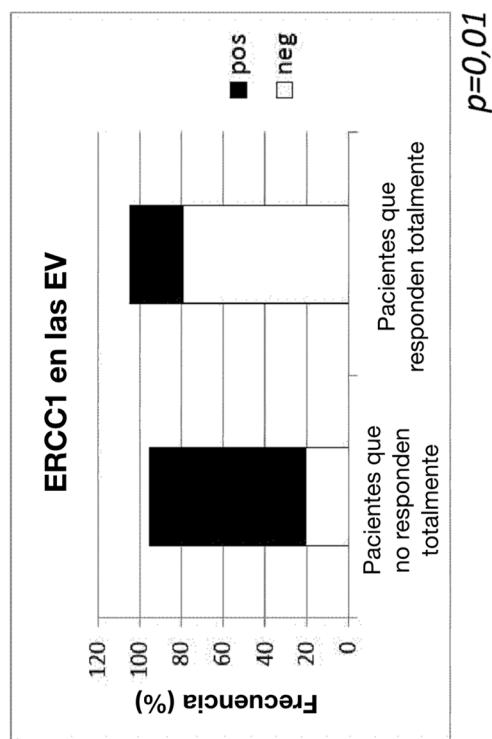


Fig. 4

Figura 5: tabla I

	Marcador	Nombre completo
Tipo basal 1/2	EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
	cMET	protooncogén MET, receptor con actividad tirosina cinasa
	PI3KCA/PI3K	subunidad α catalítica de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa / fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
	PARP	poli(ADP-ribosa) polimerasa 1
	AURKA	Aurora cinasa A
	BRAF	homólogo B del oncogén vírico v-Raf del sarcoma murino
	CK5	citoqueratina 5
	CK6	citoqueratina 6
	ERB	receptor de estrógenos β
	ERK	cinasa regulada por señales extracelulares
	KRAS	homólogo del oncogén vírico Kristen del sarcoma de rata
	MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
	MEK	cinasa de MAPK/ERK
	P53	proteína tumoral p53
	AURKB	Aurora cinasa B
	BUB1	gemación desinhibida por bencimidazoles 1
	CCNA2	ciclina A2
	CENPA	proteína centromérica A
	CENPF	proteína centromérica F
	CHEK1	cinasa del punto de verificación 1
	CK14	citoqueratina 14
	EPHA2	receptor 2 de efrina de tipo A
	Exo1	exonucleasa 1
	FANCA	grupo de complementación A de la anemia de Fanconi
	FANCG	grupo de complementación G de la anemia de Fanconi
	Ki-67	marcador de proliferación Ki-67
	MCM10	factor de iniciación de la replicación 10 para el mantenimiento de los cromosomas
	MDC1	mediador del punto de verificación 1 de daño en el ADN
	MME	metaloendopeptidasa membranaria
	MSH2	homólogo 2 de mutS
	MYC	homólogo del oncogén vírico v-myc de la miecelocitomatosis aviar
	NBN	nibrina
	NRAS	homólogo del oncogén vírico neuroblastoma del sarcoma de rata
	PLK1	cinasa 1 de tipo polo
	PRC1	proteína reguladora de la citocinesis 1
	RAD21	componente RAD21 del complejo de cohesinas
	RAD51	recombinasa RAD51
	RAD54B	homólogo B de RAD54
	Survivin	survivina
	TP63	proteína tumoral p63
	TTK	proteína cinasa TTK

	Marcador	Nombre completo
Tipo epitelial	KRT5	queratina 5
	AFP	α -fetoproteína
	CEA	antígeno carcinoembrionario
	EpCam	molécula de adhesión de las células epiteliales
	KRT8	queratina 8
	KRT 18	queratina 18
	KRT 19	queratina 19
	KRT 21	KRT21 = KRT20 = queratina 20
	Muct	mucina 1, asociada a la superficie celular
	Muc16	mucina 16, asociada a la superficie celular
	Muc4	mucina 4, asociada a la superficie celular
	PSA	antígeno específico de la próstata
	PSMA	antígeno membranario específico de la próstata
Transición de epitelio a mesénquima / Célula madre tumoral	Notch	Proteína de las muescas en las alas de <i>Drosophila</i>
	Akt2	homólogo 2 del oncogén vírico v-akt del timoma murino
	PIS3KCA	subunidad catalítica α de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
	mTor	diana del mecanismo de la rapamicina
	Her2/3	receptor 2/3 del factor de crecimiento epidérmico de humanos
	ALK	cinasa del linfoma anaplásico
	ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1
	BMI1	homólogo de la región 1 de inserción del Mo-MLYV en el linfoma B
	CD44	cúmulo de diferenciación 44
	e-cadherin	cadherina e
	Jagged-1	dentado 1
	mesothelin	mesotelina
	n-cadherin	cadherina n
	Slug	babosa
	Snail	caracol
	Twist	factor de transcripción 1 con giro de la familia bHLH
	Vimentin	vimentina
	ABCA8	miembro 8 de la subfamilia A de casetes de fijación al ATP
	ABCB1	miembro 1 de la subfamilia B de casetes de fijación al ATP
	ACTA2	α -actina 2
	ALDH1	aldehído deshidrogenasa 1
	BCL2	linfoma de linfocitos B 2
	BGN	biglucano
	BMP2	proteína 2 de la morfogénesis del hueso
	CAV1	caveolina 1
	CAV2	caveolina 2
	CCND2	ciclina D2
	COL3A1	cadena α 1 del colágeno de tipo III
	COL5A2	cadena α 2 del colágeno de tipo V
	CTNNB1	catenina β 1
	DKK2	inhibidor 2 de la vía de señalización de WNT <i>dkkkopf</i> (del alemán: cabezón)
	DKK3	inhibidor 3 de la vía de señalización de WNT <i>dkkkopf</i> (del alemán: cabezón)
	ENG	endoglina
	FBN1	fibrilina 1

	Marcador	Nombre completo
Transición de epitelio a mesénquima / Célula madre tumoral	FZD4	receptor 4 de clase crepitada
	GNG11	subunidad y 11 de las proteínas G
	HIF	factor 1 inducible por hipoxia
	HIF2	factor 2 inducible por hipoxia
	HOXA10	homeocaja A10
	HOXA5	homeocaja A5
	ITGAV	subunidad o V de la integrina
	LDH	lactato deshidrogenasa
	MEIS1	proteína Meis1 con homeocaja
	MEIS2	proteína Meis2 con homeocaja
	MEOX1	proteína 1 del mesénquima con homeocaja
	MEOX2	proteína 2 del mesénquima con homeocaja
	MMP2	metalopeptidasa 2 de la matriz
	MSX1	proteína msh1 con homeocaja
	NGFR	receptor del factor de crecimiento del nervio
	NT5E	5'-nucleotidasa ecto
	PAI-1	inhibidor de tipo 1 del activador del plasminógeno
	PDGFR	receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
	PER1	proteína del periodo 1 del reloj circadiano
	PROCR	receptor de la proteína C
	SERPINE1	miembro 1 de las serpinas de la familia E
	SFRP4	proteína 4 relacionada con la crepitada secretada
	SMAD6	miembro 6 de la familia SMAD
	SMAD7	miembro 7 de la familia SMAD
	SNAI2	represor transcripcional 2 de la familia <i>snail</i> (con forma de caracol)
	SPARC	proteína ácida secretada y rica en cisteínas
	TAGLN	transgelina
	TCF4	factor de transcripción 4
	TERF2IP	proteína que interacciona con el factor de fijación 2 a las repeticiones teloméricas
	TGF β	factor de crecimiento transformante β
	TGFBR	receptor del factor de crecimiento transformante β
	THY1	antígeno de superficie celular Thy-1
	TIE	tirosina cinasa 1 con dominios de tipo inmunoglobulina y de tipo EGF
	uPA	activador del plasminógeno de tipo urocinasa
	VCAM1	molécula de adhesión 1 de las células vasculares
	VEGFR	receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
	ZEB1	proteína 1 con homeocaja de fijación a la caja E mediante dedos de zinc
	ZEB2	proteína 2 con homeocaja de fijación a la caja E mediante dedos de zinc

	Marcador	Nombre completo
Receptor con actividad tirosina cinasa	cKit	protooncogén KIT, receptor con actividad tirosina cinasa
	cMET	protooncogén MET, receptor con actividad tirosina cinasa
	EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
	Her2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
	Her3	receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano
	Her4	receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico humano
	IGFR	receptor del factor de crecimiento insulinoide
	PDGFR	receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
	VEGFR	receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
	TEK	receptor TEK con actividad tirosina cinasa
Modulación inmunitaria	TIE1	tirosina cinasa con dominios de tipo inmunoglobulina y de tipo EGF
	BRCA1	proteína 1 del cáncer de mama
	BRCA2	proteína 2 del cáncer de mama
	CD19	cúmulo de diferenciación 19
	CD4	cúmulo de diferenciación 4
	CD45	cúmulo de diferenciación 45
	CD8	cúmulo de diferenciación 8
	IFN α	interferón α
	IFN γ	interferón γ
	PD-1	proteína 1 de la muerte celular programada
	PD-L1	ligando de la proteína 1 de la muerte celular programada
	TNF β	factor β de necrosis tumoral
	IRF8	factor 8 regulador del interferón
	IRF1	factor 1 regulador del interferón
	IRF7	factor 7 regulador del interferón
	ITK	cinasa de los linfocitos T inducible por IL2
	JAK1	cinasa Jano 1
	JAK2	cinasa Jano 2
	LCK	protooncogén LCK, tirosina cinasa de la familia Src
	LYN	protooncogén LYN, tirosina cinasa de la familia Src
	NFKB1	subunidad 1 del factor nuclear κ B
	NFKBIA	inhibidor α del factor nuclear κ B
	NFKBIE	inhibidor ϵ del factor nuclear κ B
	RELB	protooncogén RELB, subunidad del NF- κ B
	STAT1	transductor de señal y activador de transcripción 1
	STAT4	transductor de señal y activador de transcripción 4
	STAT5A	transductor de señal y activador de transcripción 5A
	BIK	tirosina cinasa Bruton
	ZAP70	cadena z de la proteína cinasa 70 asociada al receptor de linfocitos T

	Marcador	Nombre completo
Marcador de resistencia	AURKA	Aurora cinasa A
	ERCC1	proteína 1 de la reparación por excisión ERCC, grupo 1 de complementación cruzada de reparación por excisión
	ALDH1	Aldehído deshidrogenasa 1
	Caspase(all)	cisteína aspartasas
	CXCR4	receptor de quimiocinas de tipo 4 C-X-C
	Cyclin-D1	ciclina D1
	Cyclooxygenase2	ciclooxygenasa 2
	DPD	dihidropirimidina deshidrogenasa
	H2AX	miembro X de la familia de histonas H2A
	Heregulin	herregulina
	Ki-67	marcador de proliferación Ki-67
	MDR1	proteína 1 de multirresistencia farmacológica
	pTEN	homólogo a tensina y fosfatasa
	RANK/RANKL	Receptor del activador del factor nuclear κB / ligando de RANK
	Survivin	survivina
	Tubulinbeta	tubulina β
	TYMS	timidilato sintetasa
Vía del receptor de esteroides	AR	receptor de andrógenos
	SRC	sarcoma
	ARV7 u otras variantes de ayuste del AR	variante 7 del receptor de andrógenos
	ER	receptor de estrógenos [vmt <i>ER1</i>]
	PR	receptor de progesterona
	ALCAM	molécula activada de la adhesión celular de los leucocitos
	APOD	apolipoproteína D
	CLDN8	claudina 8
	DHCR24	24-deshidrocolesterol reductasa
	FASN	ácido graso sintasa
	FKBP5	proteína 5 de fijación a FK506
	PIP	proteína inducida por la prolactina
	SPDEF	factor de transcripción de la familia ETS que contiene un dominio con motivo α de esterilidad (SAM)
Otro	CA 125	antígeno del cáncer 125
	CA 15-3	antígeno del cáncer 15-3
	CA 19-9	antígeno del cáncer 19-9
	CA 72-4	antígeno del cáncer 72-4
	hCG	gonadotropina coriónica humana