

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 135**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2019 PCT/US2019/022050**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019 WO19178226**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2019 E 19713958 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 3765853**

54 Título: **Métodos para monitorizar la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad en sujetos usando células circulantes**

30 Prioridad:

13.03.2018 US 201862642318 P
16.04.2018 US 201862658122 P
19.10.2018 US 201862747796 P
16.11.2018 US 201862768561 P
19.01.2019 US 201962794580 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ADAMS, DANIEL y
TANG, CHA-MEI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 980 135 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

Métodos para monitorizar la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad en sujetos usando células circulantes

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a métodos para monitorizar la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad en sujetos que tienen cáncer, tal como un tumor sólido, usando biomarcadores de células circulantes en la sangre y otros fluidos corporales.

Técnica relacionada

- 10 Cuando las células tumorales se separan de los tumores sólidos primarios, penetran en la sangre o la circulación linfática, y finalmente abandonan el torrente sanguíneo y entran en órganos o tejidos para formar metástasis. El 90% de las muertes relacionadas con el cáncer están provocadas por el proceso de metástasis. Los sitios metastásicos más comunes son el pulmón, hígado, hueso y cerebro. Las células tumorales encontradas en la circulación se denominan células tumorales circulantes (CTCs). Muchas publicaciones de investigación y ensayos clínicos muestran que las CTCs tienen utilidad clínica para (i) proporcionar información de supervivencia pronóstica y recurrencia del
15 cáncer a través de la enumeración de CTCs en el torrente sanguíneo, y (ii) proporcionar información del tratamiento a través del examen de los niveles de expresión de proteínas, y la aparición de mutaciones y translocaciones génicas en las CTCs. Sin embargo, las CTCs no están asociadas de manera consistente con el desarrollo y/o presencia de cáncer en un sujeto, incluso en pacientes con cáncer en estadio IV. Aunque las CTCs se encuentran lo más a menudo en el estadio IV de los cánceres de mama, próstata y colorrectal, son raras en los estadios tempranos del mismo
20 cáncer. Las CTCs también son raras en otros cánceres.

- Las células circulantes asociadas a cáncer de tipo macrófago (CAMLs) son otro tipo de células relacionadas con
25 cáncer que se encuentra en la sangre de sujetos que tienen cáncer. Son células estromales gigantes circulantes. Las CAMLs se asocian con todos los tumores sólidos ensayados y todos los estadios del cáncer. Las CAMLs son poliploides y de tamaño muy grande, de ~25 µm a ~300 µm de tamaño. Estas células poliploides pueden ser CD45(-) o CD45(+) y la mayoría del tiempo expresan CD11c, CD14 y CD31, lo que confirma su origen como un linaje mielóide. A menudo se encuentran en el proceso de fagocitar las CTCs y restos celulares [1,6].

- Los ensayos asociados con la identificación y caracterización de biomarcadores, tales como CAMLs, en sangre y otros
30 fluidos corporales pueden usarse para proporcionar una variedad de información, incluyendo indicaciones sobre si una enfermedad progresará en un sujeto que tiene cáncer, si un sujeto que tiene cáncer está respondiendo al tratamiento, si un sujeto que tiene cáncer es probable que responda a un futuro tratamiento, e información de supervivencia global (OS) y supervivencia libre de progresión (PFS) en dichos sujetos. La presente invención se dirige a proporcionar dichas herramientas a los médicos para predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento y otros objetivos importantes.

- La importancia de poder predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento mediante un análisis de
35 sangre rápidamente se asocia con proporcionar la oportunidad de cambiar el tratamiento si el primer tratamiento no es eficaz. La posibilidad de realizar un cambio rápidamente sirve para minimizar la progresión del cáncer antes de otro tratamiento. Para inmunoterapia, el cambio rápido también reduce el coste, porque la inmunoterapia puede costar entre 150.000 \$ y más de 350.000 \$ al año. Yong Tang et al.: "Biomarkers for early diagnosis, prognosis, prediction, and recurrence monitoring of non-small cell lung cancer", ONCOTARGETS AND THERAPY, vol. Volume 10, 1
40 September 2017 (2017-09-01), revisan una amplia variedad de biomarcadores para predecir la progresión del cáncer y la respuesta al tratamiento.

Compendio

- La presente invención está dirigida a métodos para usar un tipo de célula con características únicas que se encuentra
45 en la sangre de sujetos que tienen tumores sólidos, incluyendo carcinoma, sarcoma, neuroblastoma y melanoma. Se ha demostrado que estas células circulantes, denominadas "células circulantes asociadas al cáncer de tipo macrófagos" (CAMLs), se asocian con la presencia de tumores sólidos en un sujeto que tiene cáncer. Se han caracterizado y descrito cinco morfologías asociadas con las CAMLs [1,2]. Se han encontrado CAMLs mediante diversos métodos en la sangre periférica de pacientes con cáncer. La metodología de exclusión por tamaño, tal como microfiltración usando un microfiltro de precisión, proporciona un aislamiento consistente de CAMLs de la sangre
50 periférica de sujetos que tienen tumores sólidos en estadio I a estadio IV.

- Las aplicaciones médicas asociadas con las CAMLs incluyen, pero no se limitan a, el uso de las células como un
biomarcador para proporcionar la detección temprana del cáncer y el diagnóstico del cáncer, en particular en la detección y el diagnóstico temprano de la recaída o recurrencia del cáncer, y en la determinación de la mutación del
55 cáncer. Se muestra que las CAMLs tienen utilidad clínica como un biomarcador en la realización de pronósticos con respecto a la supervivencia del paciente. También se muestra que las CAMLs a través de los datos presentados en la presente memoria tienen utilidad clínica como un biomarcador en la realización de predicciones de la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad.

Por lo tanto, la presente invención se dirige a los métodos para predecir la progresión de la enfermedad y/o la respuesta al tratamiento en sujetos que tienen cáncer, tal como un cáncer de tumor sólido.

5 En una primera realización, los métodos de la invención comprenden determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer a lo largo del tiempo, en donde cuando se encuentra una disminución en el tamaño de las células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se predice que el cáncer no progresa y/o se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento. En una realización relacionada, los métodos de la invención comprenden determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer a lo largo del tiempo, en donde cuando se encuentra una disminución en el número de células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se predice que el cáncer no progresa y/o se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

10 En un aspecto relacionado, el método comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño de al menos una célula en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y las muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el cáncer no progresa y/o se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

20 En otro aspecto relacionado, el método comprende determinar el tamaño promedio de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño promedio de las células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las células en la primera muestra, el sujeto se identifica como que responde al tratamiento. En algunos aspectos, el tamaño promedio de las células circulantes en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más.

25 En una segunda realización, la invención se dirige a métodos para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene cáncer, y hacer una predicción basada en la misma, en donde cuando cada célula circulante en la muestra tiene menos de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el cáncer no progresa, y en donde cuando al menos una célula circulante en la muestra tiene aproximadamente 50 μm o más de tamaño, se predice que el cáncer progresa.

30 En un aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene un cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda muestra y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer,

35 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer no progresa en el sujeto y el sujeto se identifica opcionalmente como que responde al tratamiento; o

40 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer progresa en el sujeto y el sujeto se identifica opcionalmente como que no responde al tratamiento; o

45 en donde cuando el tamaño de al menos una CAML en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y las muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el cáncer no progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que responde al tratamiento; o

50 en donde cuando el tamaño de cada CAML en la primera muestra es menor de aproximadamente 50 μm , y cuando al menos una CAML en la segunda y las muestras adicionales opcionales es mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el cáncer progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que no responde al tratamiento. En algunos aspectos, el tamaño promedio de las células circulantes en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más.

55 En otro aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene un cáncer que comprende determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda

5 muestra y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el número de células circulantes en la primera muestra, se predice que el cáncer no progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que responde al tratamiento, y en donde cuando el número de células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el número de células circulantes en la primera muestra, se predice que el cáncer progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que no responde al tratamiento.

10 En una tercera realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida del sujeto, y hacer una predicción basada en la misma, en donde cuando cada célula circulante en la muestra tiene menos de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento, y en donde cuando al menos una célula circulante en la muestra tiene aproximadamente 50 μm o más de tamaño, se predice que el sujeto no responde al tratamiento.

15 En un aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y

20 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto responde al tratamiento;

en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto no responde al tratamiento;

25 en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento; o

en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento; o

30 en donde cuando el tamaño de cada célula circulante en la segunda o siguiente muestra disminuye en comparación con la primera muestra, y en donde el tamaño de cada célula circulante en la segunda o muestra adicional opcional es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el sujeto responde al tratamiento y potencialmente cura al cáncer.

35 En otro aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar la ausencia de cualquier célula circulante, tal como CAMLs, mayor de aproximadamente 50 μm en una muestra biológica del sujeto y predecir si el sujeto está respondiendo al tratamiento.

40 En un aspecto adicional de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene cáncer, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando cada célula circulante tiene aproximadamente 50 μm o menos de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento.

45 En un aspecto adicional de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de células circulantes disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento, y en donde cuando el número de células circulantes se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento.

55 En una cuarta realización, la invención se dirige a métodos para predecir la resistencia al tratamiento en un sujeto que tiene cáncer de pulmón, comprendiendo dicho método determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene aproximadamente 50 μm o más de tamaño, se predice que el sujeto es más resistente al tratamiento contra el cáncer que un sujeto que tiene cáncer donde ninguna de las células tiene más de aproximadamente 50 μm de tamaño. En ciertos aspectos de esta realización, el cáncer es cáncer de pulmón.

La presente invención también se dirige a métodos para el tratamiento del cáncer, donde las decisiones de tratamiento pueden basarse en predicciones de la respuesta al tratamiento usando las células circulantes en los métodos descritos anteriormente.

5 Por ejemplo, y en una quinta realización, la invención se dirige a métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde una primera muestra biológica se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde una segunda muestra biológica se obtiene del sujeto durante o después del tratamiento contra el cáncer, en donde cuando se encuentra una disminución en el tamaño de las células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento y se continúa el tratamiento, y en donde cuando no se encuentra una disminución en el tamaño de las células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto no está respondiendo al tratamiento y no se continúa el tratamiento.

15 En una realización relacionada, los métodos de la invención comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde una primera muestra biológica se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde una segunda muestra biológica se obtiene del sujeto durante o después del tratamiento contra el cáncer, en donde cuando se encuentra una disminución en el número de células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento y se continúa el tratamiento, y en donde cuando no se encuentra una disminución en el número de células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto no está respondiendo al tratamiento y no se continúa el tratamiento.

25 En un aspecto de esta realización, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño de al menos una célula en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y las muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 μm , se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento y se continúa el tratamiento.

35 En otro aspecto relacionado, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño promedio de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño promedio de las células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las células en la primera muestra, el sujeto se identifica como que responde al tratamiento y el tratamiento continúa, y en donde cuando el tamaño promedio de las células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales no disminuye en comparación con el tamaño promedio de las células en la primera muestra, el sujeto se identifica como que no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa. En algunos aspectos, el tamaño promedio de las células circulantes en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más.

45 En una sexta realización, la invención se dirige a métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y

50 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento;

en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa;

55 en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño se mantiene o aumenta desde la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa;

en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento y el tratamiento continúa; o

5 en donde cuando el tamaño de cada célula circulante en la segunda o siguiente muestra disminuye en comparación con la primera muestra, y en donde el tamaño de cada célula circulante en la segunda o muestra adicional opcional es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el sujeto responde al tratamiento y el tratamiento continúa.

10 En un aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar la ausencia de cualquier célula circulante, tal como CAMLs, mayor de aproximadamente 50 μm en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando hay una ausencia de cualquier célula circulante mayor de aproximadamente 50 μm en la muestra biológica se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento.

15 En un aspecto adicional de la realización, la invención se dirige a métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando cada célula circulante tiene aproximadamente 50 μm o menos de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento.

20 En un aspecto adicional de la realización, la invención se dirige a métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de células circulantes disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento, y en donde cuando el número de células circulantes se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento y no se continúa el tratamiento.

30 En cada una de estas realizaciones y aspectos de la presente invención, si no se encuentran células circulantes en la muestra biológica al final del tratamiento, se puede concluir que se ha eliminado el cáncer. Cuando aún se encuentran células circulantes en la muestra biológica al final del tratamiento, se puede concluir que el cáncer en el paciente no se ha eliminado, y que el paciente tiene enfermedad residual.

35 La agresividad de la enfermedad residual puede predecirse por el tamaño de las células circulantes. Por ejemplo, el cáncer progresa más rápido cuando al menos una CAMLs en una muestra biológica tiene un tamaño de 50 μm o más.

En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, las células circulantes pueden ser CAMLs. Las CAMLs se definen como que tienen cada una de las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de aproximadamente 14-64 μm de tamaño, múltiples núcleos individuales y/o uno o más núcleos fusionados que tienen un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ;
- 40 (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husillo, renacuajo, redonda, oblonga, dos patas, más de dos patas, patas delgadas y amorfa.

En ciertos aspectos de las realizaciones de la invención, las células circulantes se pueden definir además como que tienen una o más de las siguientes características adicionales:

- 45 (d) fenotipo positivo para CD14;
- (e) expresión de CD45;
- (f) expresión de EpCAM;
- (g) expresión de vimentina;
- (h) expresión de PD-L1;
- 50 (i) expresión del marcador CD11C;
- (j) expresión del marcador CD146;

(k) expresión del marcador CD202b;

(l) expresión del marcador CD31; y

(m) fenotipo epitelial CK8, 18, 19.

5 En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, el tamaño de la muestra biológica está entre 0,5 y 50 mL. El tamaño de la muestra biológica también puede estar entre 5 y 15 mL. En determinados aspectos de la invención, el tamaño de la muestra biológica es de aproximadamente 7,5 mL.

10 En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, la fuente de la muestra biológica es una o más de sangre, ganglio linfático, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido, orina, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y PBMCs crioconservadas. Cuando la muestra biológica es sangre, la sangre puede ser sangre periférica, sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior, sangre de la vena femoral, sangre de la vena porta o sangre de la vena yugular, por ejemplo. La muestra puede ser una muestra fresca o una muestra crio-conservada preparada adecuadamente que se descongela.

15 En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, el cáncer es un tumor sólido, cáncer en Estadio I, cáncer en Estadio II, cáncer en Estadio III, cáncer en Estadio IV, carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de esófago u otro cáncer de tumor sólido.

20 En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando uno o más medios seleccionados de metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, captura de células multivalentes mediada por dendrímeros, captura de superficie basada en afinidad, captura de recubrimiento de superficie biomimética, captura de superficies recubiertas con selectina, otras capturas de superficie funcionalizadas, chips de enfoque inercial, lisis de glóbulos rojos, reducción de glóbulos blancos, separación de FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo, levitación magnética y diversos chips microfluidicos, o una combinación de los mismos.

25 El término "micrómetro" mencionado en este y otros párrafos se considerará como perteneciente a la unidad de SI "µm".

30 En un aspecto de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando metodología de exclusión por tamaño que comprende usar un microfiltro. El microfiltro puede tener un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros. Los intervalos adecuados de tamaños de poro también incluyen, pero no se limitan a, tamaños de poro que varían de aproximadamente 5-7 micrómetros, aproximadamente 7-8 micrómetros, 8-10 micrómetros, 11-13 micrómetros, 14-16 micrómetros, 17-20 micrómetros, 5-10 micrómetros, 11-15 micrómetros, 15-20 micrómetros, 9-15 micrómetros, 16-20 micrómetros y 9-20 micrómetros. Otro intervalo adecuado comprende tamaños de poro que varían de aproximadamente 5-20 micrómetros, pero excluyendo poros de entre 7 y 8 micrómetros. Los poros del microfiltro pueden tener una forma redonda, de pista de carreras, ovalada, de hendidura, cuadrada, rectangular y/u otras formas. El microfiltro puede tener geometría de poro de precisión, distribución de poro uniforme, más de una geometría de poro, y/o distribución de poro no uniforme. El microfiltro puede ser de una sola capa o multicapa con diferentes formas en diferentes capas. Los microfiltros que tienen poros redondos de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son especialmente óptimos cuando se usan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene geometría de poros de precisión y distribución uniforme de poros.

40 En otro aspecto de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando un ensayo de microfiltración a baja presión CellTiter™.

45 En otro aspecto de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando un chip microfluidico mediante clasificación basada en tamaño físico, rendijas, canales, clasificación basada en tamaño hidrodinámico, agrupamiento, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas basadas en tamaño.

50 En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, el sujeto está sometido a tratamiento. El tratamiento puede ser uno o más de quimioterapia, fármaco único, combinación de fármacos, inmunoterapia, radioterapia, quimiorradiación, radiación combinada con fármaco único o múltiple, quimiorradiación combinada con fármacos únicos o múltiples, vacuna contra el cáncer y terapia celular. Cuando el tratamiento es una vacuna contra el cáncer, el sujeto puede expresar al menos un alelo de HLA.

55 En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, las CAMLs pueden usarse independientemente como un marcador de cáncer, o en combinación con otras células circulantes, tales como células tumorales circulantes (CTCs), células de transición mesenquimatosa epitelial (EMTs) y células circulantes endoteliales vasculares asociadas al cáncer (CAVEs), así como con DNA libre de células (cfDNA), DNA tumoral circulante (ctDNA), DNA metilado, proteómico, metabolómico, lipidómico y otros biomarcadores para proporcionar una comprensión más completa de la

enfermedad de un paciente. Las CAMLs son el único tipo de célula entre el grupo de células circulantes mencionado en la presente memoria que es típicamente mayor de 30 μm de tamaño.

5 Cuando los métodos de la invención se asocian con la predicción de las respuestas al tratamiento en un sujeto, la escala de tiempo para obtener información de la respuesta al tratamiento puede ser tan corta como dos ciclos de tratamiento o 60 días, dependiendo del tipo de tratamiento.

En los aspectos relevantes de la invención, la prueba para predecir la respuesta al tratamiento del cáncer puede ser una o más de las siguientes:

- independiente del tipo de tumor sólido,
- independiente del estadio de cáncer,
- 10 • independiente del tipo de tratamiento,
- al inicio del tratamiento, durante el tratamiento en curso o al final del tratamiento,
- basándose en la muestra de sangre,
- sin necesitar tejido, y
- realizándose mediante la determinación obtenida antes de la obtención de imágenes.

15 Los sujetos mencionados en los métodos de la presente invención serán un ser humano, un primate no humano, ave, caballo, vaca, cabra, oveja, animal de compañía, tal como un perro, gato o roedor, u otro mamífero.

Breve descripción de los dibujos

20 Las **Figuras 1A-1D** muestran los cambios de tamaño de la CAML más grande y su relación con la respuesta para $n=42$ pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados por radiación. Las líneas discontinuas indican pacientes que responden y las líneas continuas indican pacientes que no responden. La respuesta se determina a los 24 meses.

25 Las **Figuras 2A-2C** muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia libre de progresión (PFS) en tres puntos de tiempo, (Figura 2A) punto inicial antes de la quimiorradiación, (Figura 2B) primer seguimiento (~ día 30 después del punto inicial), y (Figura 2C) segundo seguimiento (~ 60 días después del punto inicial) analizado basándose en el tamaño de las CAMLs para pacientes con cáncer de pulmón y esófago tratados por radiación.

Las **Figuras 3A-3C** muestran las gráficas de Kaplan Meier de la supervivencia global (OS) en tres puntos de tiempo, (Figura 3A) inicio antes de la quimiorradiación, (Figura 3B) primer seguimiento (~ día 30 después del inicio), y (Figura 3C) segundo seguimiento (~ 60 días después del inicio) analizado basándose en el tamaño de las CAMLs para pacientes con cáncer de pulmón y esófago tratados por radiación.

30 Las **Figuras 4A-4F** muestran el tamaño de la CAML más grande en pacientes con cáncer de mama, próstata y pulmón que (Figura 4A) era inferior a 50 μm en el punto inicial y también inferior a 50 μm en el segundo seguimiento, (Figura 4B) inferior a 50 μm en el punto inicial y cambiaron a superior a 50 μm en el segundo seguimiento, (Figura 4C) superior a 50 μm en el punto inicial y cambiaron a inferior a 50 μm en el segundo seguimiento, (Figura 4D) superior a 50 μm en el punto inicial y también superior a 50 μm en el segundo seguimiento, (Figura 4E) inferior a 50 μm en el segundo seguimiento independientemente del tamaño en el punto inicial, y (Figura 4F) superior a 50 μm en el segundo seguimiento independientemente del tamaño en el punto inicial.

40 Las **Figuras 5A-5B** muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia libre de progresión (PFS) en dos puntos de tiempo, (Figura 5A) punto inicial antes de la terapia y (Figura 5B) seguimiento (~ día 90 después del punto inicial) analizado basándose en el tamaño de las CAMLs para pacientes con cáncer de mama, próstata y pulmón.

Las **Figuras 6A-6B** muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia global (OS) en dos puntos de tiempo, (Figura 6A) punto inicial antes de la terapia y (Figura 6B) seguimiento (~ día 90 después del punto inicial) analizado basándose en el tamaño de las CAMLs para pacientes con cáncer de mama, próstata y pulmón.

45 La **Figura 7** muestra que las CTCs se identificaron en un 21% de pacientes en el punto inicial y 23% en el seguimiento. Las CTCs se encuentran más a menudo en el cáncer de mama, pero no en otros tipos de cánceres. Por el contrario, las CAMLs se encuentran en altos porcentajes en los 5 tipos de cánceres.

Las **Figuras 8A-8C** muestran las gráficas de Kaplan Meier de la supervivencia global (OS) en FU para (Figura 8A) con CTC frente a sin CTC, (Figura 8B) tamaño de CAML < 50 µm frente a ≥ 50 µm, y (Figura 8C) para ≥ 1 CTC o ≥ 50 µm frente a 0 CTC o < 50 µm.

5 La **Figura 9** muestra la intensidad de los marcadores de diferenciación celular usados para identificar y sub-clasificar CAMLs.

La **Figura 10** muestra el número de las CAMLs para 10 pacientes con cáncer de mama a lo largo del tiempo sometidos a tratamiento con vacuna.

La **Figura 11** muestra el tamaño de las CAMLs para 10 pacientes con cáncer de mama a lo largo del tiempo sometidos a tratamiento con vacuna.

10 **Descripción detallada**

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

20 Tal y como se usa en la presente memoria, "aproximadamente" se refiere a un valor numérico, que incluye, por ejemplo, números enteros, fracciones y porcentajes, ya se indique o no explícitamente. El término "aproximadamente" se refiere generalmente a un intervalo de valores numéricos (por ejemplo, +/- 5, 6, 7, 8, 9 ó 10% del valor enumerado) que un experto en la técnica consideraría equivalente al valor enumerado (por ejemplo, que tiene la misma función o resultado). En algunos casos, el término "aproximadamente" puede incluir valores numéricos que están redondeados a la cifra significativa más cercana.

Las cuestiones definidas en la descripción, tales como una construcción y elementos detallados, no son nada más que los proporcionados para ayudar a una comprensión exhaustiva de la invención.

25 El cáncer es una de las enfermedades más temidas en el mundo, afectando a todas las poblaciones y etnias en todos los países. Aproximadamente el 40% tanto de hombres como de mujeres desarrollarán cáncer en su vida. Solo en los Estados Unidos, en cualquier momento dado hay más de 12 millones de pacientes con cáncer, con 1,7 millones de casos de cáncer nuevos y más de 0,6 millones de muertes estimadas para 2018. Se estima que la muerte por cáncer en todo el mundo es de aproximadamente 8 millones anualmente, de los cuales 3 millones se producen en países desarrollados donde los pacientes tienen acceso al tratamiento.

30 Idealmente, habrá diagnósticos que pueden determinar rápidamente si una terapia seleccionada está funcionando y proporcionar pronóstico para la progresión de la enfermedad.

35 En esta divulgación, se presenta un tipo de célula que se encuentra más consistentemente en la sangre de pacientes con tumores sólidos en estadios I-IV que cualquier otra célula relacionada con cáncer. Estas células circulantes son células de tipo macrófagos que contienen los mismos marcadores tumorales que el tumor primario y se denominan en la presente memoria células circulantes de tipo macrófagos asociadas a cáncer (CAMLs).

40 Junto con las células tumorales circulantes (CTCs), las CAMLs presentes en muestras biológicas de pacientes que tienen cáncer se pueden aislar y caracterizar, por ejemplo, mediante el uso de métodos de exclusión por tamaño, incluyendo métodos de microfiltración. Los microfiltros pueden estar formados con poros lo suficientemente grandes como para permitir que pasen los glóbulos rojos y la mayoría de los glóbulos blancos, mientras que retienen las células circulantes más grandes, tales como las CTCs y las CAMLs. Las células recogidas pueden caracterizarse después, bien directamente sobre los filtros o bien a través de otros medios.

45 Las CAMLs tienen muchas utilidades clínicas cuando se usan solas. Sin embargo, la caracterización de las CAMLs en una muestra biológica usando los métodos de la presente invención puede combinarse con el ensayo de otros marcadores para las mismas características (por ejemplo, tamaño y número) u otras características. Estos otros marcadores incluyen CTCs, células de transición mesenquimatosas epiteliales (EMTs) y células circulantes endoteliales vasculares asociadas a cáncer (CAVEs), así como con DNA libre de células (cfDNA), DNA tumoral circulante (ctDNA), DNA metilado, proteómico, metabolómico, lipidómico y otros biomarcadores, y proteínas libres en sangre para mejorar aún más la sensibilidad y especificidad de un método definido en la presente memoria. Esto es especialmente cierto para CAMLs y CTCs porque pueden aislarse e identificarse al mismo tiempo usando los mismos métodos descritos en la presente memoria.

50

Células circulantes de tipo macrófago asociadas a cáncer (CAMLs)

Tal y como se define en la presente memoria, las CAMLs tienen una o más de las siguientes características:

- 5 • Las CAMLs tienen un núcleo poliploide atípico grande o múltiples núcleos individuales, a menudo dispersados en la célula, aunque son comunes los nucleolos fusionados agrandados. Los núcleos de CAML generalmente varían en tamaño de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 70 µm de diámetro, más comúnmente de aproximadamente 14 µm a aproximadamente 64 µm de diámetro.
- 10 • Para muchos cánceres, las CAMLs expresan el marcador de cáncer de la enfermedad. Por ejemplo, las CAMLs asociadas con cánceres epiteliales pueden expresar CK 8, 18 o 19, vimentina, etc. Los marcadores están típicamente difundidos, o se asocian con vacuolas y/o material ingerido. El patrón de tinción para cualquier marcador se difunde casi uniformemente por toda la célula. Para los sarcomas, neuroblastomas y melanomas, se pueden utilizar otros marcadores asociados con los cánceres en lugar de CK 8, 18, 19.
- 15 • Las CAMLs pueden ser CD45 positivos o CD45 negativos, y la presente invención abarca el uso de ambos tipos de CAMLs.
- Las CAMLs son grandes, de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros de tamaño en la dimensión más larga.
- Las CAMLs se encuentran en muchas formas morfológicas distintas, incluyendo husillo, renacuajo, redonda, oblonga, dos patas, más de dos patas, patas delgadas o formas amorfas.
- Las CAMLs de carcinomas tienen típicamente citoqueratinas difundidas.
- 20 • Si las CAMLs expresan EpCAM, la EpCAM se difunde típicamente a través de la célula, o se asocia con vacuolas y/o material ingerido, y casi uniforme a través de toda la célula, pero no todas las CAMLs expresan EpCAM, porque algunos tumores expresan muy poca o ninguna EpCAM.
- 25 • Si las CAMLs expresan un marcador, el marcador se difunde a menudo a través de la célula, o se asocia con vacuolas y/o material ingerido, y casi uniforme a través de toda la célula, pero no todas las CAML expresan los mismos marcadores con igual intensidad y para un número limitado de marcadores, los marcadores no se distribuyen por igual a través de la célula.
- 30 • Las CAMLs a menudo expresan marcadores asociados con los marcadores de origen tumoral, por ejemplo, si el tumor es de origen de cáncer de próstata y expresa PSMA, entonces las CAMLs de dicho paciente también expresan PSMA. Como otro ejemplo, si el tumor primario es de origen pancreático y expresa PDX-1, entonces las CAMLs de dicho paciente también expresan PDX-1. Como ejemplo adicional, si el tumor primario o CTC de origen canceroso expresan CXCR-4, entonces las CAMLs de dicho paciente también expresan CXCR-4.
- Si el tumor primario o CTC que se origina a partir del cáncer expresa un biomarcador de un objetivo farmacológico, las CAMLs de dicho paciente también expresan el biomarcador del objetivo farmacológico. Un ejemplo de dicho biomarcador de inmunoterapia es PD-L1.
- 35 • Las CAMLs expresan marcadores monocíticos (por ejemplo, CD11c, CD14) y marcadores endoteliales (por ejemplo, CD146, CD202b, CD31).
- Las CAMLs tienen la capacidad de unirse a fragmentos Fc.

Se evaluó un conjunto extensivo de marcadores para determinar su expresión en CAMLs, y los resultados se muestran en la **Figura 9**. En un aspecto de la invención, las CAMLs de la presente invención expresan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o los 21 marcadores mostrados en la **Figura 9**. Los marcadores se seleccionaron frente a 1118 CAMLs de 93 pacientes diferentes con diferentes cánceres.

Los marcadores, y por tanto las propias CAMLs, pueden detectarse y/o caracterizarse usando diversos medios conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos que tienen especificidad de unión para marcadores particulares pueden usarse para seleccionar, detectar y/o identificar células que expresan uno o más marcadores. Las CAMLs se aislaron inicialmente y se identificaron con DAPI, citoqueratina y CD45; después se volvieron a teñir secuencialmente con un total de 27 marcadores, incluyendo los marcadores mieloides/macrófago, glóbulos blancos, megacariocitos, epiteliales, endoteliales, progenitores/madre y de motilidad. Como puede verse a partir de la **Figura 9**, la expresión del marcador varía de 0% a 96%. Se encontró que casi todas las CAMLs expresaban niveles de CD31, y comúnmente co-expresaban citoqueratina, CD14, CXCR4, vimentina y otros marcadores. Sin embargo, aunque las CAMLs contenían marcador de linaje mieloides claro (CD14), el marcador CD31 se expresó más a menudo al 96%.

50

Las CAMLs también presentan numerosos fenotipos que no parecen coincidir con la comprensión de la diferenciación celular clásica (es decir, coexpresión de CD45 [leucocito] y citoqueratina [epitelial], CD11c/CD14 [macrófago] y CD41 [macrófago/megacariocitos], CD146 [endotelial] y CD61 [macrófago/endotelial/megacariocitos], CD31 [glóbulos blancos/macrófago/endotelial/megacariocitos/célula madre] y CD68/CD163 [macrófago]). Muchos de los marcadores aparecen en múltiples tipos de células. Combinados, estos datos muestran que las CAMLs son células derivadas de mieloides tempranamente en su proceso de diferenciación que poseen muchos atributos fenotípicos asociados con las capacidades proangiogénicas y de células madre.

Las CAMLs se pueden visualizar mediante tinciones colorimétricas, tales como H&E, o tinción fluorescente de marcadores específicos como se muestra en **Figura 9**. Para el citoplasma, CD31 es el fenotipo más positivo. Se recomienda CD31 solo, o en combinación con otros marcadores positivos en la **Figura 9**, o marcadores de cáncer asociados al tumor.

Por lo tanto, y en las diversas realizaciones y aspectos de la invención, las CAMLs se pueden definir como que tienen cada una de las siguientes características y se pueden identificar en una muestra biológica basándose en estas características solas:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de aproximadamente 14-64 μm de tamaño, o múltiples núcleos en la misma célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husillo, renacuajo, redonda, oblonga, dos patas, más de dos patas, patas delgadas y amorfa.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, las CAMLs pueden definirse además como que tienen una o más de las siguientes características adicionales:

- (d) fenotipo positivo para CD14;
- (e) expresión de CD45;
- (f) expresión de EpCAM;
- (g) expresión de la vimentina;
- (h) expresión de PD-L1;
- (i) expresión del marcador CD11C;
- (j) expresión del marcador CD146;
- (k) expresión del marcador CD202b;
- (l) expresión del marcador CD31; y
- (m) fenotipo epitelial CK8, 18, 19.

Para el cáncer metastásico, la información diagnóstica obtenida de un paciente es útil en métodos para: (i) eliminar el cáncer en sitios metastásicos y (ii) el tratamiento y/o cura del cáncer, es decir, eliminar el cáncer en todas partes del sujeto. La reducción del número de CAMLs es un indicador de regresión y aclaramiento tumoral en los sitios metastásicos. Este concepto es aplicable a todos los tratamientos y a todos los cánceres que están asociados con un gran número de CAMLs. Por ejemplo, en sujetos que tienen cáncer de mama, normalmente hay un gran número de CAMLs, con aproximadamente 30-50 CAMLs por 7,5 mL de sangre en pacientes en estadio IV. Por el contrario, en sujetos que tienen cáncer de pulmón, típicamente solo hay aproximadamente 5 CAMLs por 7,5 mL de sangre en pacientes en Estadio IV. La existencia de CAMLs es un indicador de la presencia de cáncer. El tamaño de la CAML también es un indicador de la agresividad de la enfermedad.

Células tumorales circulantes

Las CTCs expresan varias citoqueratinas (CKs). Las CK 8, 18, & 19 son las más comúnmente usadas en diagnósticos, y pueden usarse en los métodos de la presente invención, pero la investigación no necesita limitarse a estas tres. La superficie de las CTCs de tumores sólidos expresa normalmente la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM). Sin embargo, esta expresión no es uniforme o coherente. Las CTCs no deben expresar ningún CD45, porque es un marcador de glóbulos blancos. En ensayos para identificar las células asociadas a tumores, tales como CTCs y CAMLs, es suficiente usar anticuerpo contra CK 8, 18 o 19, o anticuerpo contra CD45 o DAPI. Combinando la presencia de tinción con morfología, pueden identificarse CTCs patológicamente definibles, CTCs apoptóticas y CAMLs.

Una CTC patológicamente definible se identifica mediante las siguientes características:

- Tienen un núcleo "similar al cáncer" teñido por DAPI. La excepción es cuando la célula está en división; el núcleo se condensa.
 - Expresan al menos CK 8, 18 y 19. Las citoqueratinas tienen un patrón filamentososo.
- 5 • Carecen de expresión de CD45. Para evitar la pérdida de células CD45 de baja expresión, se usa una exposición larga durante la adquisición de imágenes.

Una CTC patológicamente definible de la presente invención incluye por tanto aquellas CTCs que tienen una, dos o tres de las siguientes características: (a) núcleo similar al cáncer; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde las citoqueratinas tienen patrón filamentososo; y (c) fenotipo negativo para CD45.

10 Una CTC apoptótica se identifica mediante las siguientes características:

- Tienen un núcleo canceroso.
 - Expresan al menos CK 8, 18 y 19; las citoqueratinas no están filamentosas, sino que aparecen fragmentadas en forma de puntos.
 - No expresan CD45.
- 15 Una CTC apoptótica de la presente invención incluye por tanto aquellas CTCs que tienen una, dos o tres de las siguientes características: (a) núcleo similar al cáncer; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde la citoqueratina está fragmentada en forma de puntos; y (c) fenotipo negativo para CD45.

Captura de CAMLS y CTC

20 Como se ha sugerido anteriormente, las características únicas de las CAMLS y CTCs descritas en la presente memoria las hacen muy adecuadas para su uso en metodología clínica que incluye métodos de selección y diagnóstico de enfermedades tales como cáncer, seguimiento del tratamiento, seguimiento de la progresión y recurrencia de la enfermedad.

25 Las células más grandes y/o menos flexibles que otras células presentes en un fluido corporal, por ejemplo, CAMLS y CTCs, pueden recogerse filtrando el fluido corporal. Por ejemplo, las células diana indicativas de una afección pueden recogerse haciendo pasar un fluido corporal a través de un filtro que tiene aberturas que son demasiado pequeñas para que las células diana pasen a través, pero lo suficientemente grandes para que otras células pasen a través. Una vez recogidas, se puede realizar cualquier número de análisis de las células diana. Dichos análisis pueden incluir, por ejemplo, identificar, contar, caracterizar expresiones de marcadores, obtener análisis molecular y/o cultivar las células recogidas.

30 En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, las células circulantes (por ejemplo, CAMLS y CTCs) pueden aislarse de las muestras biológicas en los métodos de la invención usando cualquier medio relevante conocido por el experto en la técnica. Los medios adecuados incluyen, pero no se limitan a, uno o más medios seleccionados de metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de glóbulos rojos, reducción de glóbulos blancos, separación de FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo, levitación magnética y diversos chips microfluidicos mediante clasificación física basada en tamaño, rendijas, canales, clasificación hidrodinámica basada en tamaño, agrupamiento, atrapamiento, concentración de células grandes, eliminación de células pequeñas o una combinación de los mismos. En un aspecto particular, la metodología de exclusión por tamaño comprende el uso de un microfiltro.

35 Como un ejemplo, las células circulantes (por ejemplo, CAMLS y CTCs) pueden aislarse de las muestras biológicas usando metodología de exclusión por tamaño que comprende usar un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Por ejemplo, el microfiltro puede tener un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros. Los intervalos adecuados de tamaños de poro también incluyen, pero no se limitan a, tamaños de poro que varían de aproximadamente 5-7 micrómetros, 7-8 micrómetros, 8-10 micrómetros, 11-13 micrómetros, 14-16 micrómetros, 17-20 micrómetros, 5-10 micrómetros, 11-15 micrómetros, 15-20 micrómetros, 9-15 micrómetros, 16-20 micrómetros y 9-20 micrómetros. Otro intervalo adecuado comprende tamaños de poro que varían de aproximadamente 5-20 micrómetros, pero excluyendo poros de entre 7 y 8 micrómetros. En determinados aspectos de la invención, el tamaño de poro está entre aproximadamente 5 y 10 micrómetros; en otros aspectos, el tamaño de poro está entre aproximadamente 7 y 8 micrómetros. Los tamaños de poro más grandes eliminarán la mayor parte de la contaminación de glóbulos blancos (WBC) en el filtro. Los poros del microfiltro pueden tener cualquier forma, con formas aceptables que incluyen formas redondas, de pista de carrera, ovaladas, de hendidura, cuadradas, rectangulares y/u otras formas. El microfiltro puede tener geometría de poro de precisión, distribución de poro uniforme, más de una geometría de poro, y/o distribución no uniforme. El microfiltro puede ser de una sola capa o multicapa con diferentes formas en diferentes capas.

5 Las células circulantes (por ejemplo, CAMLs y CTCs) también pueden aislarse de las muestras biológicas usando un chip microfluídico mediante clasificación física basada en el tamaño, rendijas, canales, clasificación hidrodinámica basada en el tamaño, agrupamiento, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas basadas en tamaño. La eficiencia de la captura de células circulantes puede variar dependiendo del método de recogida. El tamaño de las células circulantes que se pueden capturar en diferentes plataformas también puede variar. El principio de usar el tamaño de las células circulantes para determinar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento es el mismo, pero las estadísticas variarán. La recogida de células circulantes usando microfiltros CellSieve™ proporciona una eficacia de captura del 100% y células de alta calidad.

10 Las muestras biológicas, especialmente cuando la muestra es sangre, pueden recogerse en tubos de recogida de sangre. Los tubos de recogida de sangre CellSave (Menarini Silicon Biosystems Inc., San Diego, CA) proporcionan una morfología y tamaño celular estables. Otros tubos de recogida de sangre disponibles pueden no proporcionar estabilidad celular. Las células pueden agrandarse e incluso pueden reventar en la mayoría de los tubos de recogida de sangre distintos.

15 El tamaño de las muestras biológicas ensayadas en los métodos de la invención puede variar sin cambiar la teoría y características subyacentes de la invención. Los tamaños de muestra adecuados varían generalmente de aproximadamente 0,5 mL a aproximadamente 50 mL. Los tamaños adecuados incluyen muestras que varían de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mL, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mL, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mL, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mL, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mL, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 mL, de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 mL, de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 mL, de aproximadamente 40 a aproximadamente 45 mL y de aproximadamente 45 a aproximadamente 50 mL. En determinados aspectos de la invención, el tamaño de la muestra biológica es de aproximadamente 7,5 mL.

25 La fuente de las muestras biológicas usada en los métodos de la invención sólo está limitada porque debe contener uno de los tipos de células circulantes mencionados en la presente memoria, por ejemplo, CAMLs y/o CTCs. Las fuentes adecuadas para las muestras biológicas incluyen sangre, ganglio linfático, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido, orina, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y PBMCs crioconservadas. Cuando la muestra biológica es sangre, la sangre puede ser sangre periférica, sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior, sangre de la vena femoral, sangre de la vena porta o sangre de la vena yugular, por ejemplo. La muestra puede ser una muestra fresca o una muestra crioconservada preparada adecuadamente que se descongela.

30 En un aspecto adicional de la invención, se aíslan células circulantes (CAMLs) de las muestras biológicas usando un ensayo de microfiltración a baja presión CellSieve™.

35 Cuando se comparan los tamaños de células circulantes entre dos sujetos que tienen cáncer, es preferible que los sujetos tengan el mismo tipo de cáncer. Sin embargo, puede ser difícil hacer coincidir completamente dos sujetos en términos del tipo de cáncer, el estadio del cáncer, la velocidad de progresión del cáncer, la historia del tratamiento y la historia de remisión y/o recurrencia del cáncer, entre otros factores. Por lo tanto, debe entenderse que puede haber algunas variaciones en las características en los cánceres de dos sujetos que se comparan en los métodos relevantes de la invención.

Identificación de CAMLs

40 Como se indicó anteriormente, las diversas realizaciones y aspectos de la invención se basan en determinar el tamaño o número de CAMLs en una muestra obtenida de un sujeto que tiene cáncer. Los medios específicos para identificar CAMLs en una muestra se mencionan anteriormente e incluyen: (i) determinar el tamaño, la forma y el número de núcleos en la célula; (ii) determinar el tamaño celular global; (iii) determinar la forma morfológica de la célula; y (iv) el uso de uno o más de los marcadores mostrados en la Figura 9.

45 Sin embargo, debe aclararse que cada una de las realizaciones y aspectos de la invención puede ponerse en práctica sin identificar definitivamente las células circulantes en las muestras biológicas como CAMLs *per se*. En su lugar, se puede usar, por ejemplo, la identificación simple de las células basada en el tamaño de la célula. Los ejemplos de otras técnicas incluyen usar tinciones colorimétricas, tales como tinciones H&E, o simplemente identificar células CK (+) en o recogidas de una muestra biológica.

Sujetos

50 Los sujetos mencionados en los métodos de la presente invención serán un ser humano, un primate no humano, un ave, un caballo, una vaca, una cabra, una oveja, un animal de compañía, tal como un perro, un gato o un roedor, u otro mamífero. Los animales también pueden desarrollar cáncer. El cáncer provoca casi el 50% de muertes en mascotas mayores de 10 años de edad. Algunos tipos comunes de cánceres en mascotas incluyen: piel, mama, cabeza y cuello, linfoma, leucemia, testicular, abdominal y óseo. Ejemplos de cánceres que se encuentran comúnmente en mascotas que también se encuentran comúnmente en seres humanos son linfoma, melanoma y osteosarcoma. Las CAMLs se encuentran en animales no humanos. Por lo tanto, la utilidad clínica de las CAMLs para seres humanos también es aplicable a otros animales.

En los diversos aspectos y realizaciones de la invención, el sujeto es un sujeto que tiene cáncer. El cáncer puede ser un tumor sólido, cáncer en Estadio I, cáncer en Estadio II, cáncer en Estadio III, cáncer en Estadio IV, carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer celular epitelial, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, 5 cáncer de esófago u otro cáncer de tumor sólido. El experto en la materia apreciará que los métodos de la invención no se limitan a formas o tipos particulares de cáncer y que pueden ponerse en práctica en asociación con una amplia variedad de cánceres.

Tratamiento

En determinados aspectos y realizaciones de la invención, el sujeto se somete a tratamiento. El tratamiento puede ser uno o más de quimioterapia, fármaco único, combinación de fármacos, inmunoterapia, radioterapia, quimiorradiación, radiación combinada con fármaco único o múltiple, quimiorradiación combinada con fármaco único o múltiple, vacuna 10 contra el cáncer y terapia celular.

Las vacunas contra el cáncer pueden administrarse a un sujeto en forma de células que expresan los marcadores previstos como dianas de vacuna. Las células pueden estar en forma de células cancerosas, virus modificados y otros tipos de células modificadas. Después de que el sujeto recibe la vacuna, el sistema inmunitario del cuerpo produce células T que reconocen y atacan antígenos expresados por la vacuna así como células cancerosas. Cuando el 15 tratamiento es una vacuna contra el cáncer, el sujeto puede expresar al menos un alelo de HLA.

El tamaño de CAML todavía es predictivo de la agresividad del cáncer. Se puede obtener información adicional mediante el número de CAML. El sistema inmunitario puede ser capaz de eliminar el cáncer de sitios metastásicos más pequeños más rápido que de los sitios cancerosos más grandes. Las células T asesinas del sistema inmunitario pueden ser más capaces de penetrar tumores en algunos órganos que en otros. Por ejemplo, la inmunoterapia funciona típicamente mejor para el cáncer de pulmón y el melanoma, pero peor para los cánceres de mama y próstata. A menudo, a medida que el tumor se hace más grande, se observa una pseudo progresión, a medida que las células inmunitarias entran en el tumor para matar las células tumorales. La pseudo progresión es un indicador de una buena 20 respuesta al tratamiento de inmunoterapia.

Un ejemplo de vacuna contra el cáncer es SV-BR-1-GM, una línea celular de cáncer de mama modificada por ingeniería genética con GM-CSF que expresa antígenos HER2, PRAME y HLA de clase I y clase II. Las células SV-BR-1-GM cargadas con un péptido del virus de la fiebre amarilla (YFV) activaron directamente las células T CD4+ específicas de YFV.

Se predice que los pacientes que responden a esta vacuna de SV-BR-1-GM son pacientes con cáncer de mama que expresan al menos un alelo de HLA. 30

Métodos de la invención

Como se ha descrito en el Compendio anteriormente, la presente invención se dirige, *entre otros*, a métodos para predecir la respuesta al tratamiento y/o la progresión de la enfermedad (por ejemplo, progresión del cáncer) en un 35 sujeto basándose en el número y/o tamaño de células circulantes. Estos métodos comprenden determinar el número y/o tamaño de células circulantes en una muestra biológica de un sujeto, tal como un sujeto que tiene cáncer, y en algunos aspectos y realizaciones, comparar los resultados de muestras tomadas del mismo sujeto en diferentes puntos de tiempo. El cambio del tamaño o el número de células circulantes que se analizan es un indicador de la respuesta al tratamiento y/o la progresión de la enfermedad en el sujeto y las predicciones se pueden basar en esto.

Las realizaciones y aspectos específicos de la invención se presentan en los párrafos siguientes. Sin embargo, en primer lugar, se puede observar en la presente memoria que cuando los métodos de la invención se asocian con la predicción de las respuestas al tratamiento en un sujeto, la escala de tiempo para obtener información de la respuesta al tratamiento puede ser generalmente tan corta como dos ciclos de tratamiento o 60 días, dependiendo del tipo de 40 tratamiento. Será evidente que la respuesta al tratamiento también puede observarse después de un ciclo de tratamiento, o en tan solo 10 días, dependiendo del tipo de tratamiento.

También se puede observar en la presente memoria que el tamaño y número de CAML, y los cambios en el tamaño y número de CAML, se pueden analizar junto con otros parámetros para mejorar la probabilidad de una determinación correcta de la respuesta al tratamiento y/o la progresión de la enfermedad. Dichos parámetros incluyen:

1. Buena respuesta al tratamiento, por ejemplo:

- 50 o -desaparición de CTCs
- o -disminución del número de CTCs cuando son muy altos inicialmente
- o -disminución del DNA tumoral circulante (ctDNA)

2. Respuesta al tratamiento deficiente, por ejemplo:

- o aumento del número de CTCs [3]
- o aparición de CTCs en mitosis [7]
- o aparición de CTCs en agrupaciones
- 5 o aumento de la cantidad de ctDNA
- o aumento de la mutación en el ctDNA.
- o aumento de la mutación en el DNA de CAML.

Además, el tamaño y número de CAML, y los cambios en el tamaño y número de CAML, pueden proporcionar una predicción de la respuesta al tratamiento y/o progresión de la enfermedad antes de que la obtención de imágenes pueda proporcionar información de pronóstico. La obtención de imágenes requiere que el tumor crezca sustancialmente para ver la diferencia en la progresión de la enfermedad. La obtención de imágenes de CT también produce una dosis de radiación indeseable, que puede provocar cáncer y no es deseable a intervalos de 30-45 días. Finalmente, la obtención de imágenes es cara.

Se sabe que un aumento en el número de CTCs constituye la base para las predicciones sobre la progresión de la enfermedad. Sin embargo, solo es aplicable por sí misma para cánceres de mama, próstata y colorrectales en Estadio IV. Las CTCs son raras en estadios tempranos del cáncer y otros tipos de tumores sólidos.

Determinación del tamaño de las células circulantes

En una realización, los métodos de la invención comprenden determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer a lo largo del tiempo, en donde cuando se encuentra una disminución en el tamaño de las células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se predice que el cáncer no progresa y/o se encuentra que el sujeto responde al tratamiento. En una realización relacionada, los métodos de la invención comprenden determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer a lo largo del tiempo, en donde cuando se encuentra una disminución en el número de células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se predice que el cáncer no progresa y/o se encuentra que el sujeto responde al tratamiento.

En un aspecto relacionado, el método comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño de al menos una célula en la primera muestra es de aproximadamente 50 µm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y las muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 µm, se predice que el cáncer no progresa y/o se encuentra que el sujeto responde al tratamiento.

En otro aspecto relacionado, el método comprende determinar el tamaño promedio de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño promedio de las células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las células en la primera muestra, el sujeto se identifica como que responde al tratamiento. En algunos aspectos, el tamaño promedio de las células circulantes en la primera muestra es de aproximadamente 50 µm o más.

Predicción de la progresión del cáncer

En otra realización, la invención se dirige a métodos para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene cáncer, y hacer una predicción basada en la misma, en donde cuando cada célula circulante en la muestra tiene menos de aproximadamente 50 µm de tamaño, se predice que el cáncer no progresa, y en donde cuando al menos una célula circulante en la muestra tiene aproximadamente 50 µm o más de tamaño, se predice que el cáncer progresa.

En un aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene un cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda muestra y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer,

en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer no progresa en el sujeto y el sujeto se identifica opcionalmente como que responde al tratamiento; o

5 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer progresa en el sujeto y el sujeto se identifica opcionalmente como que no responde al tratamiento; o

10 en donde cuando el tamaño de al menos una CAML en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el cáncer no progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que responde al tratamiento; o

15 en donde cuando el tamaño de cada CAML en la primera muestra es menor de aproximadamente 50 μm , y cuando al menos una CAML en la segunda y muestras adicionales opcionales es mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el cáncer progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que no responde al tratamiento. En algunos aspectos, el tamaño promedio de las células circulantes en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más.

20 En otro aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene un cáncer que comprende determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda muestra y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el número de células circulantes en la primera muestra, se predice que el cáncer no progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que responde al tratamiento, y en donde cuando el número de células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el número de células circulantes en la primera muestra, se predice que el cáncer progresa y el sujeto se identifica opcionalmente como que no responde al tratamiento.

Predicción de la respuesta al tratamiento

30 En una realización adicional, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida del sujeto, y hacer una predicción basada en la misma, en donde cuando cada célula circulante en la muestra tiene menos de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento, y en donde cuando al menos una célula circulante en la muestra tiene aproximadamente 50 μm o más de tamaño, se predice que el sujeto no responde al tratamiento.

35 En un aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y

40 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto responde al tratamiento;

en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto no responde al tratamiento;

45 en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento; o

en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento; o

50 en donde cuando el tamaño de cada célula circulante en la segunda o siguiente muestra disminuye en comparación con la primera muestra, y en donde el tamaño de cada célula circulante en la segunda o la muestra adicional opcional es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el sujeto responde al tratamiento y potencialmente cura el cáncer.

En otro aspecto de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar la ausencia de cualquier célula circulante, tal como CAMLs, mayor de aproximadamente 50 µm en una muestra biológica del sujeto y predecir que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

- 5 En un aspecto adicional de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene cáncer, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando cada célula circulante tiene aproximadamente 50 µm o menos de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento.
- 10 En un aspecto adicional de la realización, la invención se dirige a métodos para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de células circulantes disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento, y en donde cuando el número de células circulantes se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento.

Predicción de la resistencia al tratamiento

- 20 Se describen, pero no se reivindican, métodos para predecir la resistencia al tratamiento en un sujeto que tiene cáncer de pulmón, comprendiendo dicho método determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene aproximadamente 50 µm o más de tamaño, se predice que el sujeto es más resistente al tratamiento del cáncer que un sujeto que tiene cáncer donde ninguna de las células tiene más de aproximadamente 50 µm de tamaño. En determinados aspectos, el cáncer es cáncer de pulmón.

Si no se encuentran células circulantes en la muestra biológica al final del tratamiento, se puede concluir que el cáncer se ha eliminado. Cuando aún se encuentran células circulantes en la muestra biológica al final del tratamiento, se puede concluir que el cáncer en el paciente no se ha eliminado, y que el paciente tiene enfermedad residual.

- 30 Las CAMLs se puede usar independientemente como un marcador de cáncer, o en combinación con otras células circulantes, tales como células tumorales circulantes (CTCs), células de transición mesenquimatosas epiteliales (EMTs) y células circulantes endoteliales vasculares asociadas al cáncer (CAVEs), así como con DNA libre de células (cfDNA), DNA tumoral circulante (ctDNA), DNA metilado, proteómico, metabolómico, lipídómico y otros biomarcadores para proporcionar una comprensión más completa de la enfermedad de un paciente. Las CAMLs son el único tipo de célula entre el grupo de células circulantes mencionado en la presente memoria que es normalmente mayor de 30 µm de tamaño.

Métodos de tratamiento

Se describen, pero no se reivindican, métodos para el tratamiento del cáncer, donde las decisiones del tratamiento pueden basarse en predicciones de la respuesta al tratamiento usando las células circulantes en los métodos descritos anteriormente.

- 40 La divulgación abarca, por lo tanto, métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde una primera muestra biológica se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde una segunda muestra biológica se obtiene del sujeto durante o después del tratamiento contra el cáncer, en donde cuando se encuentra una disminución en el tamaño de las células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento y se continúa el tratamiento, y en donde cuando no se encuentra una disminución en el tamaño de las células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto no está respondiendo al tratamiento y no se continúa el tratamiento.
- 50 Los métodos relacionados comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en dos o más muestras biológicas obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde una primera muestra biológica se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde una segunda muestra biológica se obtiene del sujeto durante o después del tratamiento contra el cáncer, en donde cuando se encuentra una disminución en el número de células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto está respondiendo al tratamiento y se continúa el tratamiento, y en donde cuando no se encuentra una disminución en el número de células circulantes entre las muestras a lo largo del tiempo, se encuentra que el sujeto no está respondiendo al tratamiento y no se continúa el tratamiento.

5 En un aspecto, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño de al menos una célula en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y las muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 μm , se encuentra que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento.

10 En otro aspecto relacionado, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño promedio de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el tamaño promedio de las células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las células en la primera muestra, el sujeto se identifica como que responde al tratamiento y el tratamiento continúa, y en donde cuando el tamaño promedio de las células circulantes en la segunda y las muestras adicionales opcionales no disminuye en comparación con el tamaño promedio de las células en la primera muestra, el sujeto se identifica como que no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa. En algunos aspectos, el tamaño promedio de las células circulantes en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más.

15 Se describen, pero no se reivindican, métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y

20 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento;

25 en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa;

30 en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa;

35 en donde cuando el número de células circulantes mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento y el tratamiento continúa; o

40 en donde cuando el tamaño de cada célula circulante en la segunda o siguiente muestra disminuye en comparación con la primera muestra, y en donde el tamaño de cada célula circulante en la segunda o muestra adicional opcional es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el sujeto responde al tratamiento y el tratamiento continúa.

45 Se describen, pero no se reivindican, métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar la ausencia de cualquier célula circulante, tal como CAMLs, mayor de aproximadamente 50 μm en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando hay una ausencia de cualquier célula circulante mayor de aproximadamente 50 μm en la muestra biológica se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento.

50 Se describen, pero no se reivindican, métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el tamaño de las células circulantes, tales como CAMLs, en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando cada célula circulante tiene aproximadamente 50 μm o menos de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento y se continúa el tratamiento.

55 Se describen, pero no se reivindican, métodos para el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un tratamiento contra el cáncer a un sujeto que tiene cáncer y determinar el número de células circulantes, tales como CAMLs, en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas del sujeto, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen

del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de células circulantes disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento y el tratamiento continúa, y en donde cuando el número de células circulantes se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento y el tratamiento no continúa.

Ejemplos

Ejemplo 1

Recogida y procesamiento de muestras

La exclusión por tamaño es un método para recoger tanto las CTCs como las CAMLs. Existen muchos métodos de exclusión por tamaño. El método de filtración se da en la presente memoria como ejemplo. Se recogió sangre periférica en tubos CellSave (Menarini Silicon Biosystems Inc., San Diego, CA) y se procesó en 96 horas. Se utilizó la técnica de microfiltración CellSieve™ para recoger todas las células asociadas con el cáncer (CTCs, EMTs, CECs y CAMLs) en la muestra de sangre. Los microfiltros CellSieve™ tienen más de 180.000 poros en una matriz uniforme con un diámetro de poro de 7µm dentro de un área de 9mm. Los reactivos incluyen tampón de prefijación, tampón de postfijación, tampón de permeabilización y un combinado de anticuerpos. La técnica para realizar la filtración usó un conjunto de bombas de jeringa extraídas a 5 mL/min [5] o una bomba de vacío [4]. El proceso de filtración comenzó prefijando 7,5mL de la sangre en 7,5 mL de tampón de prefijación antes de extraerla a través del filtro. El filtro y las células capturadas se sometieron después a lavado, postfijación, lavado, permeabilización y lavado. Después, las células capturadas en el filtro se tiñeron con un combinado de anticuerpos seguido de lavado. Los filtros se colocaron en un portaobjetos de microscopio y se cubrieron con Fluoromount-G/DAPI (Southern Biotech). Un posible combinado de anticuerpos para identificar CTCs y CAMLs en cánceres epiteliales puede contener citoqueratinas y anticuerpos CD45. Pueden incluirse anticuerpos adicionales para marcadores de interés. El portaobjetos se lee después en un microscopio fluorescente. Se cuenta el número de CTCs. Se mide el tamaño de las CAMLs. Se registran el número de CTCs, el tamaño de CAML más grande y el tamaño de CAML más grande < 50 µm o ≥ 50 µm. Hay una amplia variedad de otros métodos para recoger CTCs y CAMLs de la sangre.

Estudio 1: Estudio de n=42 pacientes con NSCLC tratados por radiación

Las Figuras 1A-1D muestran el tamaño de CAML y los cambios del tamaño de CAML relacionados con la respuesta al tratamiento. Las curvas y líneas continuas indican pacientes que no responden, mientras que las líneas discontinuas indican pacientes que responden. Para el análisis de datos de esta figura, la respuesta al tratamiento se definió como respuesta en un punto de tiempo de 24 meses. Para este estudio piloto de n=42 muestras, los sujetos tenían cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y la mayoría de ellos estaban sometidos a radioterapia y unos pocos también estaban recibiendo quimioterapia. La progresión se basa en la formación de imágenes estándar de atención en pacientes de pulmón antes y después de la inducción de quimioradioterapia. Los resultados incluso en los primeros 100 días muestran una fuerte tendencia. La Figura 1A muestra que la mayoría de los pacientes con CAMLs menores de 50 µm de tamaño en el punto inicial permanecieron menores de 50 µm. La Figura 1B muestra que todos los pacientes con CAMLs que aumentan de tamaño desde menos de 50 µm a más de 50 µm progresaron. La Figura 1C muestra que un paciente que tenía inicialmente CAMLs mayores de 50 µm y en el segundo punto de tiempo que tenía CAMLs menores de 50 µm sí respondía a la terapia. La Figura 1D no muestra respuesta al tratamiento en pacientes donde las CAMLs eran mayores de 50 µm en el punto inicial y no hubo reducción en el tamaño a lo largo del tiempo, así como para un sujeto que sí mostraba reducción del tamaño de CAML.

Para proporcionar una medición cualitativa, la precisión de la predicción en un punto de tiempo dado se definió como (positivos verdaderos + negativos verdaderos)/(falsos positivos + falsos negativos). Los positivos verdaderos son el número de pacientes con tamaño de CAML >50 µm y progresaron. Los falsos positivos son el número de pacientes con tamaño de CAML >50 µm y pero no progresaron. Los negativos verdaderos son el número de pacientes con tamaño de CAML <50 µm y no progresaron. Los falsos negativos son el número de pacientes con tamaño de CAML <50 µm y progresaron. Este uso de 50 µm de tamaño se basa en los datos mostrados en la publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2018/151865, fechada el 23 de agosto, 2018. La precisión en el punto inicial fue del 69%, y la precisión en el último seguimiento fue del 85%.

La indicación de la respuesta al tratamiento se puede obtener en 100 días para la mayoría de los pacientes. En resumen, el tamaño final de las CAMLs después del tratamiento proporciona la base para hacer predicciones y conclusiones con respecto a la respuesta al tratamiento.

Estudio 2: Estudio de n=52 pacientes con NSCLC tratados por radioterapia

Para lograr un 90% de potencia de 2 colas con un α de 0,05, se empleó un conjunto de prueba de 52 pacientes con NSCLC. Todos los pacientes tenían cánceres de pulmón patológicamente confirmados en Estadio I (n=7), Estadio II (n=7), Estadio III (n=29) & Estadio IV (n=9), y recibieron exploraciones PET/CT estándar. Se tomó una muestra de sangre en el punto inicial (BL) antes de comenzar la terapia. El primer seguimiento (FU1) se tomó durante la radioterapia (~30 días). El segundo seguimiento (FU2) se tomó al final de la radioterapia (~ 60 días). Unos pocos pacientes también recibieron quimioterapia en los 60 días.

La sangre se filtró mediante microfiltración CellSieve™ y se cuantificaron los tamaños de CAML. Se usó el análisis por tamaño de CAML de <50 µm o ≥50 µm para evaluar las relaciones de riesgo de PFS (HRs) por análisis univariable & multivariable censurado en cada punto de tiempo.

5 El análisis a continuación predice la progresión de la enfermedad, frente a la respuesta al tratamiento. Se identificaron las CAMLs en el 97% de todas las muestras que tenían un promedio de 2,9 CAMLs/7,5 mL de muestra en BL, teniendo las CAMLs de ≥ 50 µm una supervivencia libre de progresión reducida (PFS) (HR=2,9, 95%CI 1,3-6,2, p=0,015). En FU1 (seguimiento 1), 7 pacientes tenían un tamaño de CAML aumentado que redujo la PFS (HR=5,0 95%CI 2,3-10,9, p<0,001). En FU2 (seguimiento 2), 7 pacientes adicionales tenían un tamaño de CAML aumentado reduciendo aún más la PFS (HR=7,1, 95%CI 3,4-14,8, p<0,001). En total, las CAMLs con tamaño ≥50 µm en BL fueron un 65 %
10 precisos para predecir la progresión eventual en 24 meses, mientras que las CAMLs con tamaño ≥50 µm en FU2 fueron un 89 % precisos para predecir la progresión.

Obsérvese que es aplicable para predecir la respuesta o progresión al tratamiento en todos los estadios del NSCLC.

Estudio 3: n=52 pacientes con NSCLC y n=29 pacientes con cáncer de esófago tratados por quimiorradiación

15 Se realizó un estudio más amplio para predecir los resultados de la terapia de radiación que incluyen cáncer de esófago basándose en los mismos 52 de NSCLC que se describen en las Figuras 1A-1D (estadio I, n=7, estadio II, n=7, estadio III, n=29 y estadio IV, n=9) y 21 pacientes con cáncer de esófago (estadio III, n=20 y estadio IV (n=1).

20 Las Figuras 2A-2C muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia libre de progresión (PFS) en tres puntos de tiempo: punto inicial (BL) (Figura 2A), primer seguimiento (FU1) (Figura 2B), y segundo seguimiento (FU2) (Figura 2C). Los datos se analizan basándose en el tamaño de las CAMLs, < 50 µm (curvas azules (superiores)) o ≥ 50 µm (curvas rojas (inferiores)). En el punto inicial la Figura 2A y la Tabla 1, los tamaños de las CAMLs proporcionan información de pronóstico. En el primer seguimiento la Figura 2B y la Tabla 2, hay indicios de predecir la respuesta al tratamiento basándose en el tamaño de CAML. En el segundo seguimiento después de finalizar la radioterapia la Figura 2C y la Tabla 3, el tamaño de CAML proporcionó una predicción mucho mejor de la PFS de los pacientes que responden a pacientes que no responden. Se realizó un análisis multivariante. El tamaño de CAML proporcionó los mejores resultados en comparación con el estadio, tipo de cáncer, edad y sexo.
25

Tabla 1

5 Variable	PFS (valor p)	2 Variable	PFS (valor p)
Estadio	0,014	Estadio	0,005
Tamaño de CAML en BL (<50 µm frente a ≥50 µm)	0,002	Tamaño de CAML en BL (<50 µm frente a ≥50 µm)	0,003
Esófago/pulmón	0,587		
M/F	0,975		
Edad	0,225		

Tabla 2

5 Variable	PFS (valor p)	2 Variable	PFS (valor p)
Estadio	0,022	Estadio	0,014
Tamaño de CAML en FU1 (<50 µm frente a ≥50 µm)	0,000	Tamaño de CAML en FU1 (<50 µm frente a ≥50 µm)	0,000
Esófago/pulmón	0,565		
M/F	0,499		
Edad	0,858		

Tabla 3

5 Variable	PFS (valor p)	2 Variable	PFS (valor p)
Estadio	0,041	Estadio	0,033
Tamaño de CAML en FU2 (<50 μm frente a $\geq 50 \mu\text{m}$)	0,000	Tamaño de CAML en FU2 (<50 μm frente a $\geq 50 \mu\text{m}$)	0,000
Esófago/pulmón	0,529		
M/F	0,340		
Edad	0,748		

Las **Figuras 3A-3C** muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia global (OS) en tres puntos de tiempo: punto inicial (BL) (**Figura 3A**), primer seguimiento (FU1) (**Figura 3B**), y segundo seguimiento (FU2) (**Figura 3C**). Los datos se analizan basándose en el tamaño de las CAMLs, < 50 μm (curvas azules (superiores)) o $\geq 50 \mu\text{m}$ (curvas rojas (inferiores)). El tamaño de las CAMLs proporciona una buena predicción de la OS de pacientes que responden de pacientes que no responden para la quimiorradiación de NSCLC y cánceres de esófago.

Se encontraron CAMLs en el 97% de todas las muestras en BL. En promedio se encontraron 2,9 CAMLs/7,5 mL de sangre. Los pacientes con CAMLs gigantes en BL tenían la PFS significativamente reducida para NSCLC (HR=2,9, 95% CI 1,3-6,2, p=0,015) y ligeramente para el cáncer de esófago (HR=3,0, 95%CI 0,9-9,9, p=0,14).

En FU1, los pacientes con CAMLs gigantes detectables redujeron adicionalmente la PFS después del tratamiento (NSCLC, HR = 5,0, 95%CI 2,3-10,9, p<0,001; EC, HR = 4,0, 95%CI 1,2-13,2, p=0,05), e incluso más significativamente en FU2 (NSCLC, HR = 7,1, 95%CI 3,4-14,8, p<0,001; EC, HR = 5,6, 95%CI 1,6-18,8, p=0,01). Combinando los dos conjuntos de datos de enfermedad, las CAMLs gigantes en BL eran 70% precisas para predecir la progresión final en 24 meses, mientras que las CAMLs gigantes en FU2 eran 84% precisas para predecir la progresión. En el análisis multivariable, las CAMLs gigantes fueron las más significativas en la predicción de la respuesta al tratamiento.

Las **Figuras 4A-4F** muestran los detalles de la CAML más grande en cada paciente a lo largo de los 3 puntos de tiempo, para pacientes que tienen cáncer de mama, próstata o pulmón. Las curvas roja y verde son pacientes que progresaron (rojo) frente a pacientes que no progresaron o curados (verde).

La **Figura 4A** muestra los pacientes con un tamaño de CAML inferior a 50 μm en el punto inicial y permaneció por debajo de 50 μm en FU2. El 81% de los pacientes NO progresaron en 24 meses.

La **Figura 4B** muestra los pacientes con un tamaño de CAML inferior a 50 μm en el punto inicial y pero aumentado por encima de 50 μm en FU2. El 79% de los pacientes progresaron en 24 meses.

La **Figura 4C** muestra los pacientes con un tamaño de CAML superior a 50 μm en el punto inicial y disminuido por debajo de 50 μm en FU2. El 60% de los pacientes NO progresaron en 24 meses.

La **Figura 4D** muestra los pacientes con un tamaño de CAML superior a 50 μm en el punto inicial y permanecieron por encima de 50 μm en FU2. El 96% de los pacientes progresaron en 24 meses.

La **Figura 4E** muestra los pacientes con un tamaño de CAML inferior a 50 μm en FU2. El 79% de los pacientes NO progresaron en 24 meses.

La **Figura 4F** muestra los pacientes con un tamaño de CAML superior a 50 μm en FU2. El 89% de los pacientes progresaron en 24 meses.

Estudio 4: Aplicable a muchos tumores sólidos y tratamientos

Se usan biomarcadores basados en sangre (PSA, CEA, CA125) para rastrear la progresión en tiempo real de la enfermedad en paralelo con la formación de imágenes. Sin embargo, aunque existen numerosos biomarcadores sanguíneos, son específicos para el tipo de cáncer (es decir, PSA para próstata y CEA para colon) y pueden no aparecer en todos los individuos enfermos. Se identificaron las CAMLs en diversos tipos de cáncer sólido que se observaron aumentando en tamaño y en hiperploidía durante la enfermedad progresiva. Para evaluar si el agrandamiento de CAML es un biomarcador de progresión/respuesta, se siguió el crecimiento/encogimiento de CAML en un estudio prospectivo multi-institucional usando muestras de sangre periférica anonimizada de terapia de 34 pacientes con cáncer [estadio I (n=2), II (n=3), III (n=8) & IV (n=21)] con mama (n=10), pulmón (n=16), & próstata (n=8). Se tomaron muestras antes de la terapia (BL), a ~1 mes (FU1) de seguimiento y a ~3 meses (FU2) de

seguimiento, después de la inducción de la terapia.

La terapia del paciente en este grupo fue muy diversa. Las terapias incluyeron: radiación, quimiorradiación, quimioterapia, docetaxel, trastuzumab, trastuzumab/lapatinib, fulvestrant/trastuzumab/lapatinib/radiación cerebral, letrozol/denosumab, Trastuzumab/Pertuzumab/Eribulina, paclitaxel/herceptina/pertuzumab, Abraxane, Eligard, Lupron, Eligard/Bicalutamida, Casodex, Lupron/Bicalutamida, Lupron, cirugía, Abiraterona/Lupron, Nivolumab, Carboplatino/Taxol, Carboplatino/Gemcitabina, Gemcitabina/trastuzumab+lapatinib, Eribulina/trastuzumab/lapatinib, Herceptina/Fulvestrant/Palbociclib, eribulina, paclitaxel/herceptina/pertuzumab, Abraxane, Eligard+Enzalutamida, Lupron+Enzalutamida, Casodex+Lupron, Vinorelbina/trastuzumab/lapatinib, letrozol/fulvestrant, eribulina/herceptina, herceptina/femara.

10 Los datos clínicos globales son:

- Se encontraron CAMLs en el 97% de los pacientes con cáncer en BL, el 97% en FU1 y el 94% en FU2
- Durante dos años, siete pacientes no mostraron progresión clínica de la enfermedad (línea azul o superior en las **Figuras 5 y 6**), mientras que 29 pacientes tenían progresión clínica observable de la enfermedad (línea roja o inferior en las **Figuras 5 y 6**).
- 15 • De los pacientes sin progresión (línea azul o superior en las **Figuras 5 y 6**, n=7), uno tenía CAMLs de $\geq 50 \mu\text{m}$ en todos los puntos de tiempo, mientras que seis tenían solo CAMLs pequeñas en todos los puntos de tiempo.
- De los 29 pacientes que progresaron,
 - 22 pacientes tenían CAMLs $\geq 50 \mu\text{m}$ en todos los puntos de tiempo
 - 5 pacientes con tenían CAMLs $< 50 \mu\text{m}$ en BL que aumentó de tamaño en FU2
 - 20 ○ 1 paciente tenía CAMLs $\geq 50 \mu\text{m}$ en BL que disminuyeron en FU2
 - 1 paciente tenía CAMLs pequeñas en todos los puntos de tiempo.

Se evaluó si el tamaño de CAML puede predecir la respuesta al tratamiento independientemente del tipo de tumor sólido y el tipo de tratamientos.

25 Las **Figuras 5A-5B** muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia libre de progresión (PFS) en dos puntos de tiempo: punto inicial (BL) (**Figura 5A**), y segundo seguimiento (FU2) (**Figura 5B**). Los datos se analizan basándose en el tamaño de las CAMLs, $< 50 \mu\text{m}$ (curvas azules (superiores)) o $\geq 50 \mu\text{m}$ (curvas rojas (inferiores)).

Las **Figuras 6A-6B** muestran las gráficas de Kaplan Meier de supervivencia global (OS) en dos puntos de tiempo: punto inicial (BL) (**Figura 6A**), y segundo seguimiento (FU2) (**Figura 6B**). Los datos se analizan basándose en el tamaño de las CAMLs, $< 50 \mu\text{m}$ (curvas azules (superiores)) o $\geq 50 \mu\text{m}$ (curvas rojas (inferiores)).

30 Se muestra que el aumento del agrandamiento de CAML en comparación con el punto inicial indica que no responde al tratamiento, dando como resultado PFS más cortas en una variedad de tipos de cáncer.

Estudio 5: Combinación de datos de CTC y CAML

Otro conjunto de resultados está relacionado con diferentes cánceres y diferentes tratamientos. Se realizó un estudio multi-institucional ciego prospectivo de dos años para evaluar la inclusión de CTCs además del tamaño de los CAMLs antes y después de la inducción de una nueva línea de terapia. Se reclutaron n=91 pacientes totales: mama (n = 14), 35 esófago (n = 23), NSCLC (n = 23), próstata (n = 21) y cáncer de pulmón microcítico (SCLC) (n = 10) en la enfermedad de Estadio III (n = 53) o Estadio IV (n =38). Se tomó una muestra de sangre en el punto inicial (BL) antes de la inducción de una nueva terapia y se tomó un único seguimiento (FU) después del inicio de la terapia sistémica (~30 días). La sangre se filtró mediante filtración CellSieve. Las cantidades y subtipos de CTCs & CAMLs se analizaron basándose 40 en las relaciones de riesgo de OS (HRs) mediante análisis univariable & multivariable censurado.

La **Figura 7** muestra que las CTCs eran raras en pulmón (6%), esófago (4%) y próstata (24%), pero comunes en mama (79%). Las CAMLs fueron comunes en todos los cánceres, encontradas en el 92% de las muestras en BL y el 98% de las muestras en FU, siendo ambos tiempos pronósticos para la OS.

45 Las CTCs se identificaron en el 21% de los pacientes en BL, con una única CTC como pronóstico para OS (HR = 2,4 95%CI = 1,1-5,1, p = 0,048). Además, se encontraron CTCs en el 23% de las muestras en FU y también como pronóstico para OS (HR = 3,1 95%CI = 1,4-6,9, p = 0,013). Sin embargo, las CTCs eran raras en cánceres de pulmón (6%), esófago (4%) y próstata (24%), pero comunes en mama (79%). Por el contrario, se encontraron CAMLs en el 92% en BL, siendo las CAMLs $\geq 50 \mu\text{m}$ un pronóstico para OS (HR = 3,0, 95%CI = 1,6-5,7, p = 0,001). En el FU, se encontraron CAMLs en el 98% de las muestras en FU, el valor pronóstico para OS de CAMLs $\geq 50 \mu\text{m}$ aumentó (HR = 3,5 95%CI = 1,9-6,6, p = 0,001). Además, después de la inducción de la terapia sistémica, la presencia de ambas, 50 CTC >1 o una CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ fue 75 % precisa para predecir la supervivencia de los pacientes en 24 meses, con OS

HR = 3,7 95%CI = 2,0-7,0, p = 0,001.

En FU, una única CTC (**Figura 8A**) se asoció con una OS más pobre (curva inferior (roja)); una única CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ (**Figura 8B**) también se asoció con una OS más pobre (curva inferior (roja)). Se presenta la OS de medición simultánea tanto de CTCs como CAMLs mediante análisis de sangre en la **Figura 8C** con la CAML y CTC únicas mostradas como la curva inferior (roja).

Estos datos sugieren que la medición simultánea tanto las CTCs y como el tamaño de CAML puede aumentar el valor pronóstico de los diagnósticos basados en sangre y puede ser predictivo del beneficio de terapias posteriores.

Estos datos sugieren que el tamaño de CAML y los cambios del tamaño de CAML son aplicables para predecir la respuesta al tratamiento, o la progresión de la enfermedad para tumores sólidos principales.

Ejemplo 2

Vacuna contra el cáncer

Las vacunas contra el cáncer pueden administrarse a un sujeto en forma de células que expresan los marcadores previstos como dianas de vacuna. Las células pueden estar en forma de células cancerosas, virus modificados y otros tipos de células modificadas. Después de que el sujeto recibe la vacuna, el sistema inmunitario del cuerpo produce células T que reconocen y atacan antígenos expresados por la vacuna así como células cancerosas.

Los datos para respaldar el concepto de utilizar las CAMLs para monitorizar y/o predecir la respuesta al tratamiento del paciente para una vacuna contra el cáncer se basan en diez pacientes con cáncer de mama tratados con la vacuna SV-BR-1-GM. Se tomaron 7,5 mL de sangre y se analizaron en diferentes puntos de tiempo. Los datos presentados en las **Figuras 10** y **Figura 11** muestran los datos de CAML para pacientes que expresan al menos un alelo de HLA (curvas continuas) y pacientes que no expresan ningún alelo de HLA (curvas discontinuas).

La **Figura 10** muestra el número de CAMLs durante el tratamiento. Los pacientes que expresan al menos un alelo de HLA tienen un número reducido o menor de CAMLs durante el tratamiento, lo que indica una respuesta positiva. Para un paciente, el paciente con un punto de datos a los 200 días, la metástasis de pulmón y de tejido blando se eliminó completamente. Los pacientes que no expresan alelos HLA no parecen beneficiarse de la vacuna y se encontró que los números de CAML estaban aumentados.

La **Figura 11** muestra el tamaño de las CAMLs durante el tratamiento. Todos los pacientes excepto uno que expresan al menos un alelo de HLA mostraron una reducción en el tamaño de CAML durante el tratamiento. Sin embargo, los tamaños de CAML para la mayoría de los pacientes eran todavía mucho mayores de $50 \mu\text{m}$, lo que indica la presencia de un cáncer agresivo. La obtención de imágenes de los pacientes demostró que todos todavía tenían cáncer (datos no mostrados).

El cambio en el número de CAML es aplicable a otros tratamientos y otros cánceres además de vacunas, especialmente para cánceres que normalmente tienen más de cinco CAMLs en sujetos que tienen cáncer en Estadio IV.

Ejemplo 3

Las CAMLs son células estromales circulantes comunes en la sangre periférica de pacientes con cáncer que se supone que son un mecanismo en la patogénesis del cáncer. En la presente memoria se presentan los resultados de un estudio prospectivo en pacientes con cáncer de pulmón sin tratamiento previo antes de la inducción y directamente después de la finalización de la radioterapia definitiva para determinar si las CAMLs son predictivas de la respuesta al tratamiento y la progresión del cáncer.

Métodos: se llevó a cabo un estudio prospectivo ciego simple de dos años, ensayando la relación de CAMLs agrandadas ($\geq 50 \mu\text{m}$) a la supervivencia libre de progresión (PFS) de pacientes con cáncer de pulmón antes y después de la inducción de la terapia de radiación definitiva. Para lograr un 95 % de potencia de 2 colas ($\alpha = 0,05$), se reclutaron un conjunto de entrenamiento de 55 pacientes, todos con cáncer de pulmón patológicamente confirmado: Estadio I (n=13), Estadio II (n=7), Estadio IIIa (n=10), Estadio IIIb (n=18) & Estadio IV (n=7). Se tomaron muestras de sangre en el punto inicial (BL) antes comenzar la terapia. Si fue posible, se tomó una segunda muestra de sangre (T1) después de completar la radioterapia (~60 días), n= 46 pacientes. La sangre se filtró mediante filtración CellSieve™ y se cuantificaron las CAMLs. Se usó el análisis por tamaño de CAML de $<50 \mu\text{m}$ o $\geq 50 \mu\text{m}$ para evaluar las relaciones de riesgo de PFS (HRs) mediante análisis univariable & multivariable censurados.

Resultados (datos no mostrados): se encontraron CAMLs en el 93 % de las muestras en BL que tenían un promedio de 3,2 CAMLs/7,5 mL. Los pacientes con al menos una CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ tenían PFS reducido (HR=2,9, 95%CI 1,4-6,0, p=0,010). 46 pacientes aceptaron una extracción de sangre de seguimiento. 13 de los 46 pacientes tuvieron un aumento del tamaño de CAML a $\geq 50 \mu\text{m}$, pero 3 pacientes tuvieron una disminución a $<50 \mu\text{m}$, dando como resultado un aumento de la PFS (HR=7,7, 95%CI 2,6-12,5, p<0,001). Combinado, el 90% de los pacientes con una CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ en BL progresaron en 2 años frente al 46% de los pacientes con CAMLs $< 50 \mu\text{m}$. Las CAMLs agrandadas en T1

5 fueron más predictivas de la progresión, con 92% de pacientes con una progresión de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ frente a 21% de pacientes con CAML $< 50 \mu\text{m}$. Notablemente, el 100 % de los pacientes que tenían una CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ tanto en BL como en T1 progresaron. En comparación, sólo el 11% de los pacientes con CAMLs $< 50 \mu\text{m}$ tanto en BL como en T1 progresaron. En un análisis multivariante, el tamaño de CAML fue el indicador más significativo de PFS y OS, independiente de todas las demás variables clínicas, incluyendo el estadio.

Estos datos sugieren que para pacientes con cáncer de pulmón sometidos a terapia de radiación definitiva, la presencia de CAMLs agrandadas parece predecir pacientes que son resistentes al tratamiento. Además, estas células estromales circulantes parecen útiles para la monitorización secuencial de pacientes que pueden pronosticar quienes es probable que progresen después del tratamiento.

10 **Citas**

1. Adams, D., et al., Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. PNAS 2014, 111(9):3514-3519.
2. Solicitud de patente internacional n.º de publicación WO 2013/181532, fechada el 5 de diciembre de 2013.
3. Adams, D. L., et al., Cytometric characterization of Circulating Tumor Cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch® CTC test. Cytometry Part A 2015; 87A: 137-144.
- 15 4. Adams DL, et al. The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfiltrates. RSC Adv 2014, 4:4334-4342.
5. Solicitud de patente internacional n.º de publicación WO 2013/078409, fechada el 30 de mayo de 2013.
6. Solicitud de patente internacional n.º de publicación WO 2016/33103, fechada el 3 de marzo de 2016.
- 20 7. Adams D.L., et al., Mitosis in Circulating Tumor Cells stratifies highly aggressive breast carcinomas, Breast Cancer Research 2016; 18:44.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las células circulantes asociadas al cáncer de tipo macrófagos (CAMLs) en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene cáncer, y hacer una predicción basada en las mismas, en donde cuando cada CAML en la muestra tiene menos de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el cáncer no progresa, y en donde cuando al menos una CAML en la muestra tiene aproximadamente 50 μm o más de tamaño, se predice que el cáncer progresa.
2. Un método para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene un cáncer que comprende determinar el tamaño de las CAMLs en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda muestra y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer,
- en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer no progresa en el sujeto; o
- en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer progresa en el sujeto; o
- en donde cuando el tamaño de al menos una CAML en la primera muestra es de aproximadamente 50 μm o más, y el tamaño de cada célula en la segunda y las muestras adicionales opcionales es menor de aproximadamente 50 μm , se predice que el cáncer no progresa; o
- en donde cuando el tamaño de cada CAML en la primera muestra es menor de aproximadamente 50 μm , y cuando al menos una CAML en la segunda y las muestras adicionales opcionales es mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el cáncer progresa.
3. Un método para predecir la progresión del cáncer en un sujeto que tiene un cáncer que comprende determinar el número de CAMLs en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda muestra y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el número de CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer no progresa, y en donde cuando el número de CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el número de CAMLs en la primera muestra, se predice que el cáncer progresa.
4. Un método para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las CAMLs en una muestra biológica obtenida del sujeto, y hacer una predicción basada en la misma, en donde cuando cada CAML en la muestra tiene menos de aproximadamente 50 μm de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento, y en donde cuando al menos una CAML en la muestra tiene aproximadamente 50 μm o más de tamaño, se predice que el sujeto no responde al tratamiento.
5. Un método para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las CAMLs en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y
- en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales disminuye en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto responde al tratamiento;
- en donde cuando el tamaño promedio de las CAMLs en la segunda y las muestras adicionales opcionales se mantiene o aumenta en comparación con el tamaño promedio de las CAMLs en la primera muestra, se predice que el sujeto no responde al tratamiento;
- en donde cuando el número de CAMLs mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento; o
- en donde cuando el número de CAMLs mayor de aproximadamente 50 μm de tamaño disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento; o

en donde cuando el tamaño de cada CAML en la segunda o siguiente muestra disminuye en comparación con la primera muestra, y en donde el tamaño de cada CAML en la segunda o muestra adicional opcional es menor de aproximadamente 50 µm, se predice que el sujeto responde al tratamiento y potencialmente cura al cáncer.

5 6. Un método para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar la ausencia de cualquier CAMLs mayor de aproximadamente 50 µm en una muestra biológica del sujeto y predecir que el sujeto está respondiendo al tratamiento.

10 7. Un método para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el tamaño de las CAMLs en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene cáncer, en donde la muestra se obtiene del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, y en donde cuando cada CAML tiene aproximadamente 50 µm o menos de tamaño, se predice que el sujeto responde al tratamiento.

15 8. Un método para predecir la respuesta al tratamiento de un sujeto que tiene cáncer que comprende determinar el número de CAMLs en una primera y segunda muestra biológica, y muestras biológicas adicionales opcionales, obtenidas de un sujeto que tiene cáncer, en donde la primera muestra se obtiene del sujeto antes o durante el tratamiento contra el cáncer, en donde la segunda y las muestras adicionales opcionales se obtienen del sujeto después de al menos un tratamiento contra el cáncer, en donde cuando el número de CAMLs disminuye de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto responde al tratamiento, y en donde cuando el número de CAMLs se mantiene o aumenta de la primera a la segunda y las muestras adicionales opcionales, se predice que el sujeto no responde al tratamiento.

20 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las CAMLs tienen las siguientes características:

(a) múltiples núcleos individuales y/o uno o más núcleos fusionados que tienen un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;

(b) tamaño celular de aproximadamente 20-300 µm de tamaño; y

(c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husillo, renacuajo, redonda, oblonga, dos patas, más de dos patas, patas delgadas y amorfa, y

25 en donde las CAMLs tienen una o más de las siguientes características adicionales:

(d) fenotipo positivo para CD14;

(e) expresión de CD45;

(f) expresión de EpCAM;

(g) expresión de la vimentina;

30 (h) expresión de PD-L1;

(i) expresión del marcador monocítico CD11C;

(j) expresión del marcador endotelial CD146;

(k) expresión del marcador endotelial CD202b;

(l) expresión del marcador endotelial CD31; y

35 (m) expresión del marcador de células epiteliales cancerosas CK8, 18 y/o 19.

40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el tamaño de la muestra biológica está entre 5 y 15 mL, y en donde la fuente de la muestra biológica es una o más de sangre periférica, sangre, ganglio linfático, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido, orina, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y PBMCs crioconservadas y en donde cuando la muestra biológica es sangre, la sangre es sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior, sangre de la vena femoral, sangre de la vena porta o sangre de la vena yugular.

45 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el cáncer es un tumor sólido, cáncer en Estadio I, cáncer en Estadio II, cáncer en Estadio III, cáncer en Estadio IV, carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de esófago u otro cáncer de tumor sólido.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde las CAMLs se aíslan de la muestra biológica usando uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, captura de células multivalentes mediada por dendrímeros, captura de superficie basada en afinidad, captura de recubrimientos superficiales biomiméticos, captura de superficies recubiertas con selectina, otras capturas

de superficies funcionalizadas, chips de enfoque inercial, lisis de glóbulos rojos, disminución de glóbulos blancos, separación de FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo, levitación magnética y diversos chips microfluídicos, o una combinación de los mismos.

- 5 13. El método de la reivindicación 12, en donde las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando metodología de exclusión por tamaño que comprende usar un microfiltro, en donde el microfiltro tiene un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 20 μm , en donde los poros del microfiltro tienen una forma de poro redonda, de pista de carrera, ovalada, cuadrada y/o rectangular.
- 10 14. El método de la reivindicación 12, en donde las células circulantes se aíslan usando un chip microfluídico mediante clasificación física basada en tamaño, clasificación hidrodinámica basada en tamaño, agrupamiento, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas basadas en el tamaño.
- 15 15. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto está sometido a tratamiento, en donde el tratamiento es uno o más de quimioterapia, fármaco único, combinación de fármacos, inmunoterapia, terapia de radiación, quimiorradiación, radiación combinada con fármaco único o múltiple, quimiorradiación combinada con fármacos únicos o múltiples, vacuna contra el cáncer y terapia celular.
- 15 16. El método de la reivindicación 15, en donde el tratamiento es una vacuna contra el cáncer y el sujeto expresa al menos un alelo de HLA.

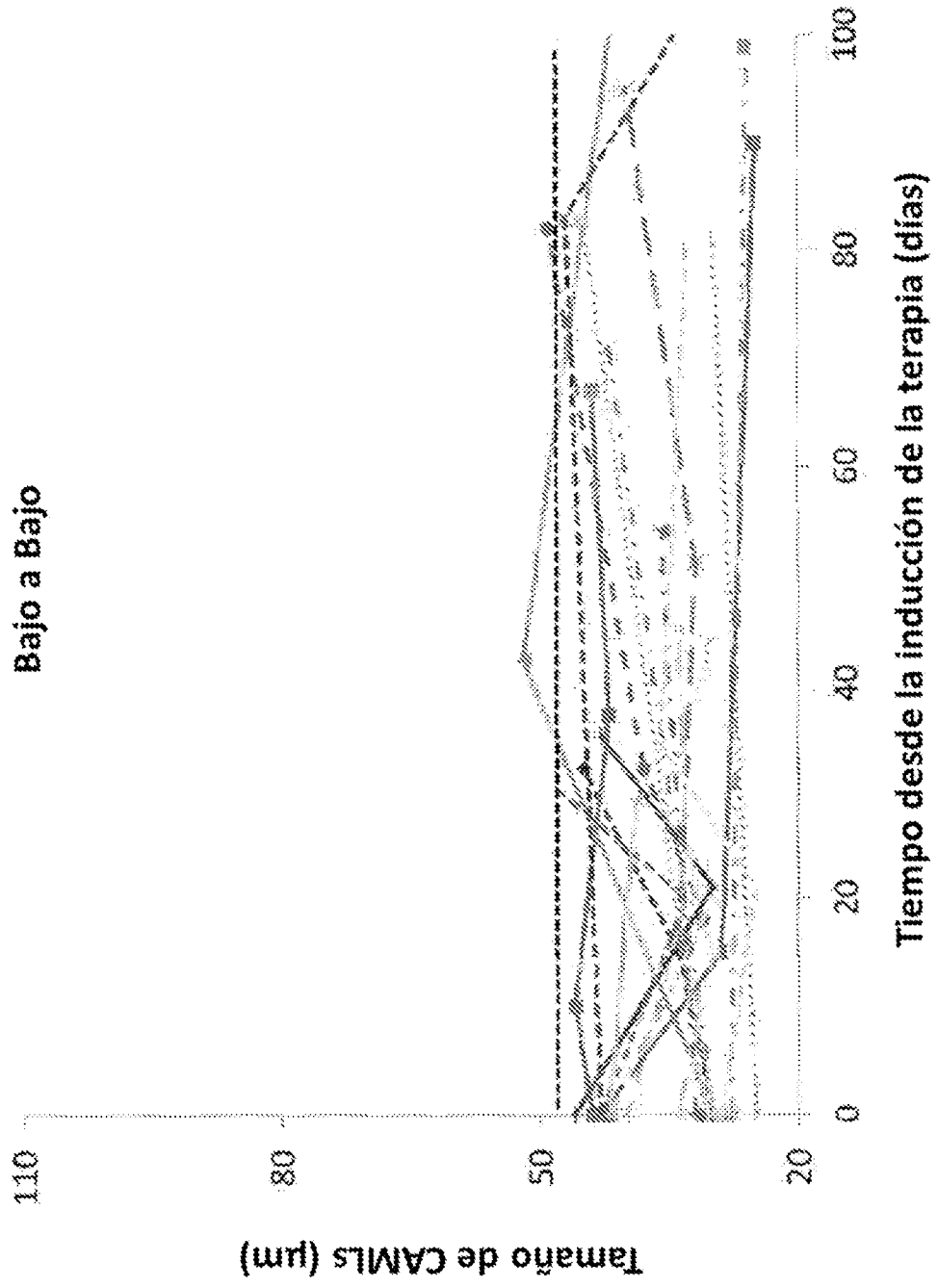


Figura 1A

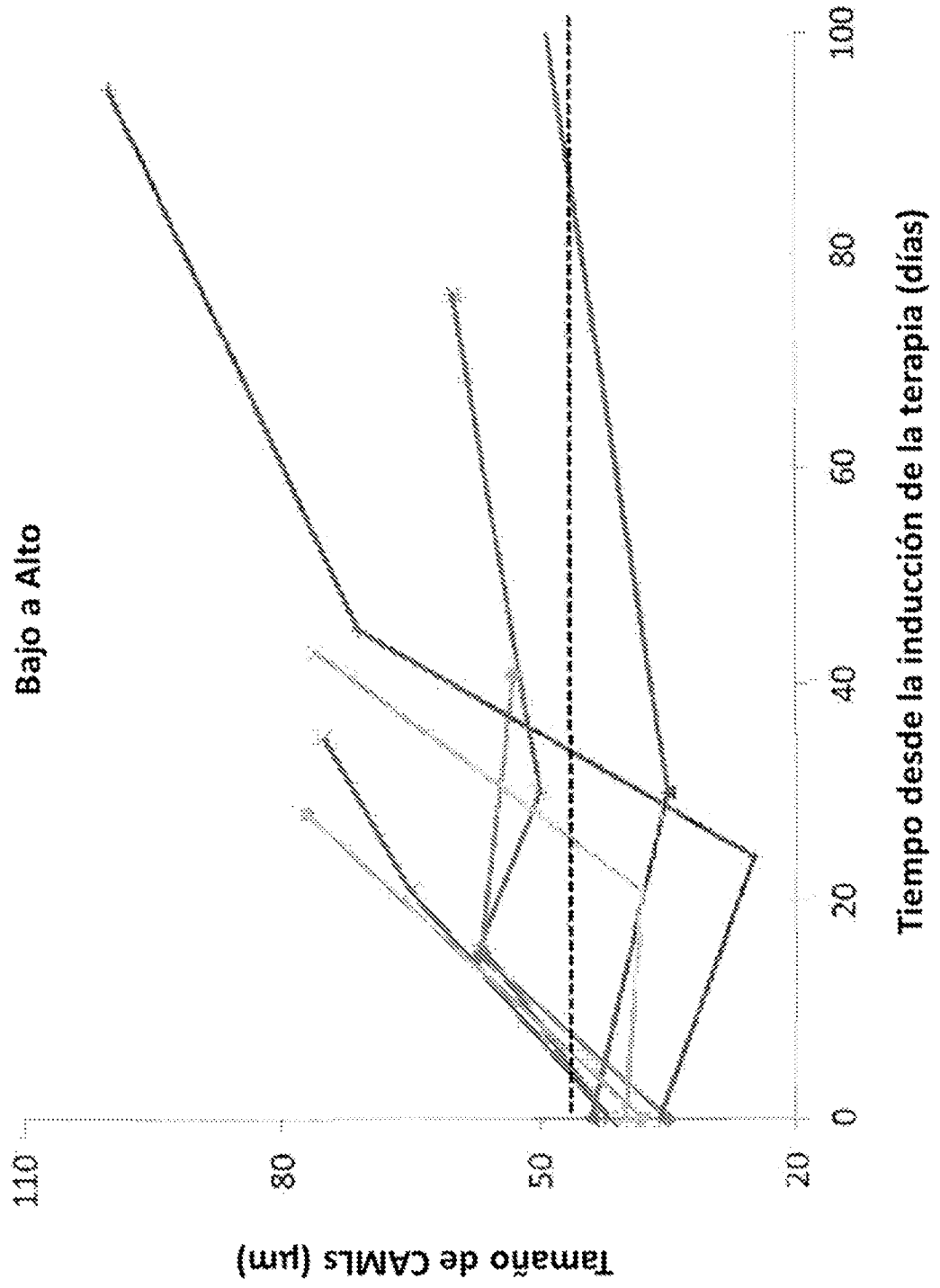
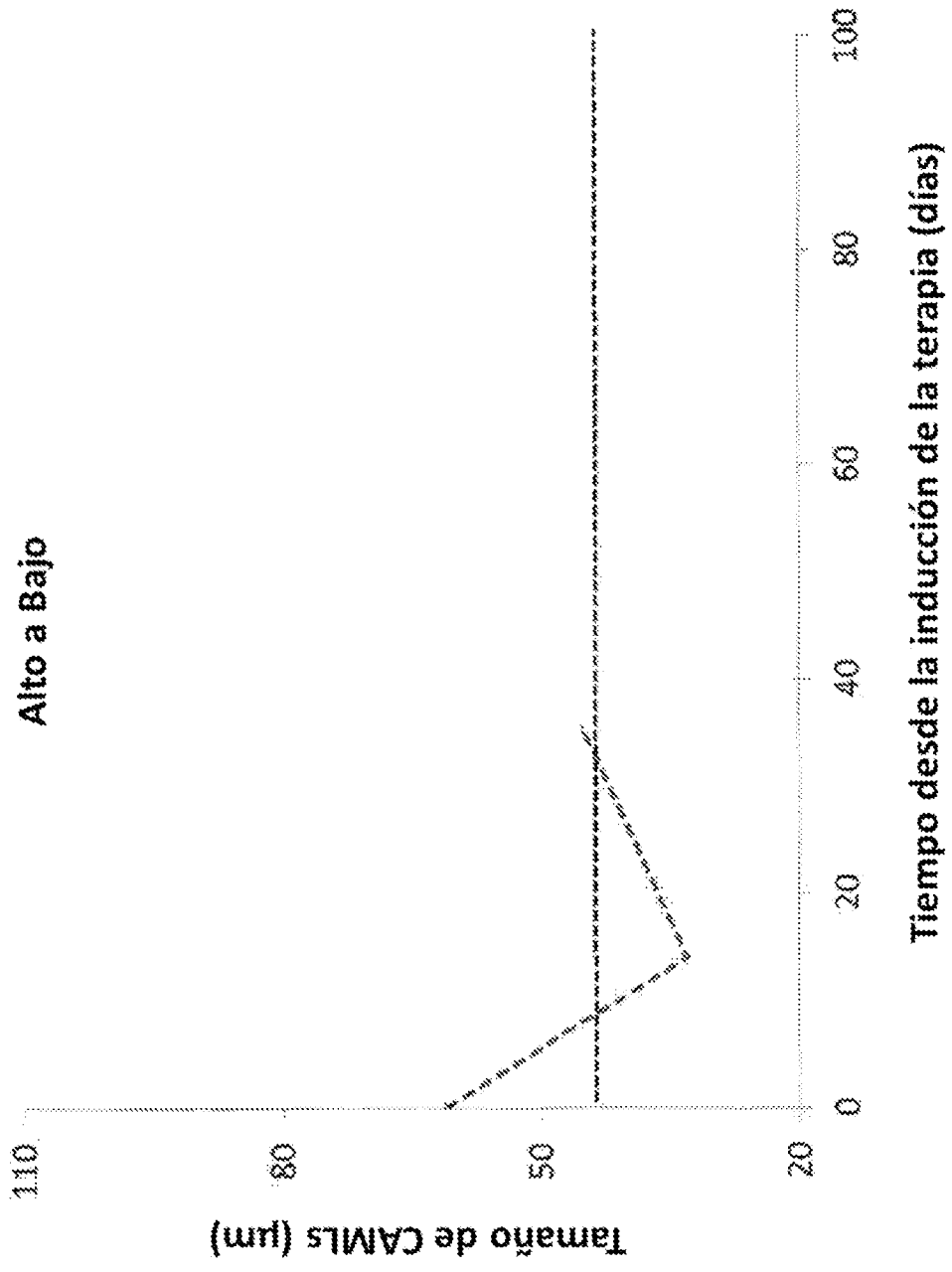


Figura 1B

Figura 1C



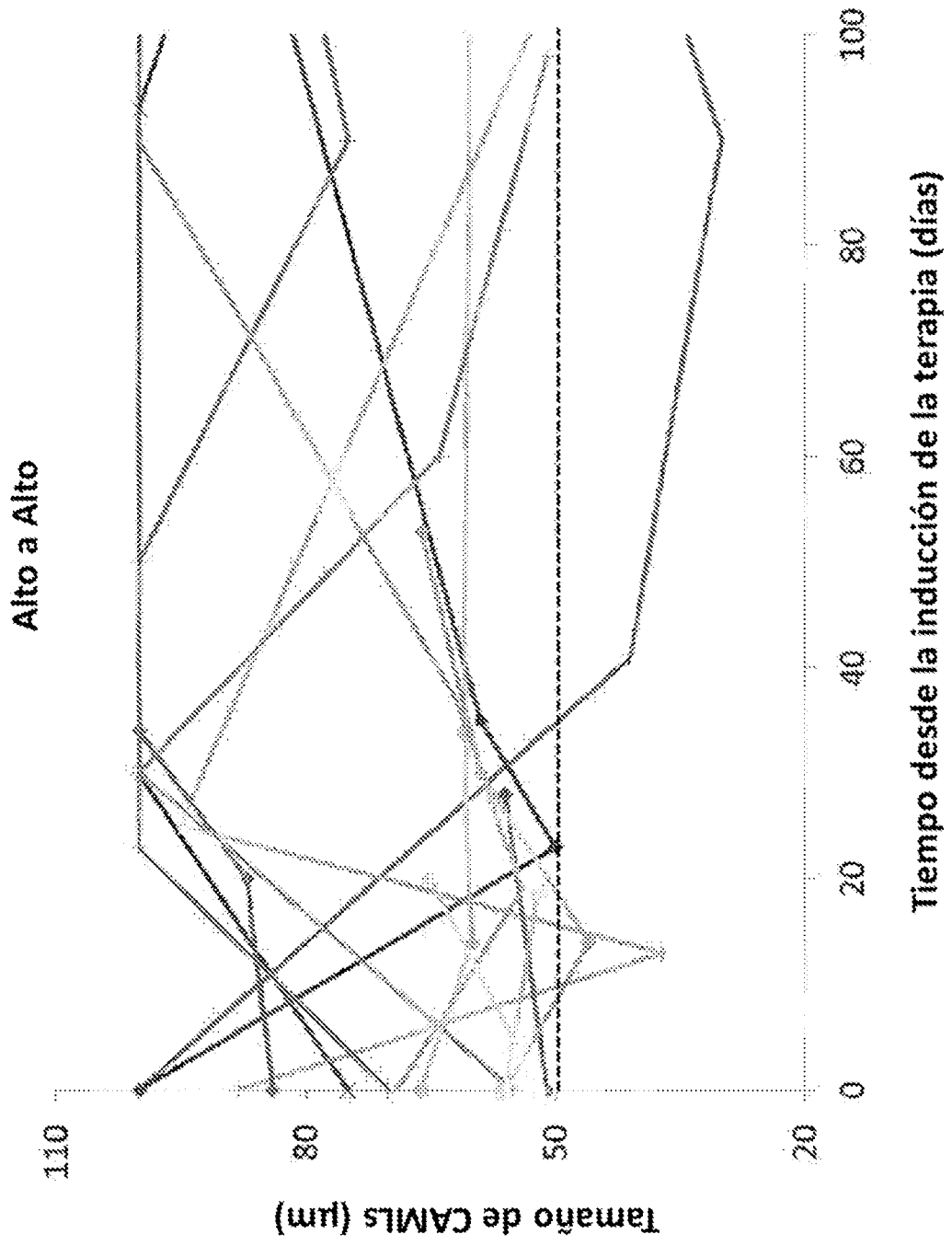


Figura 1D

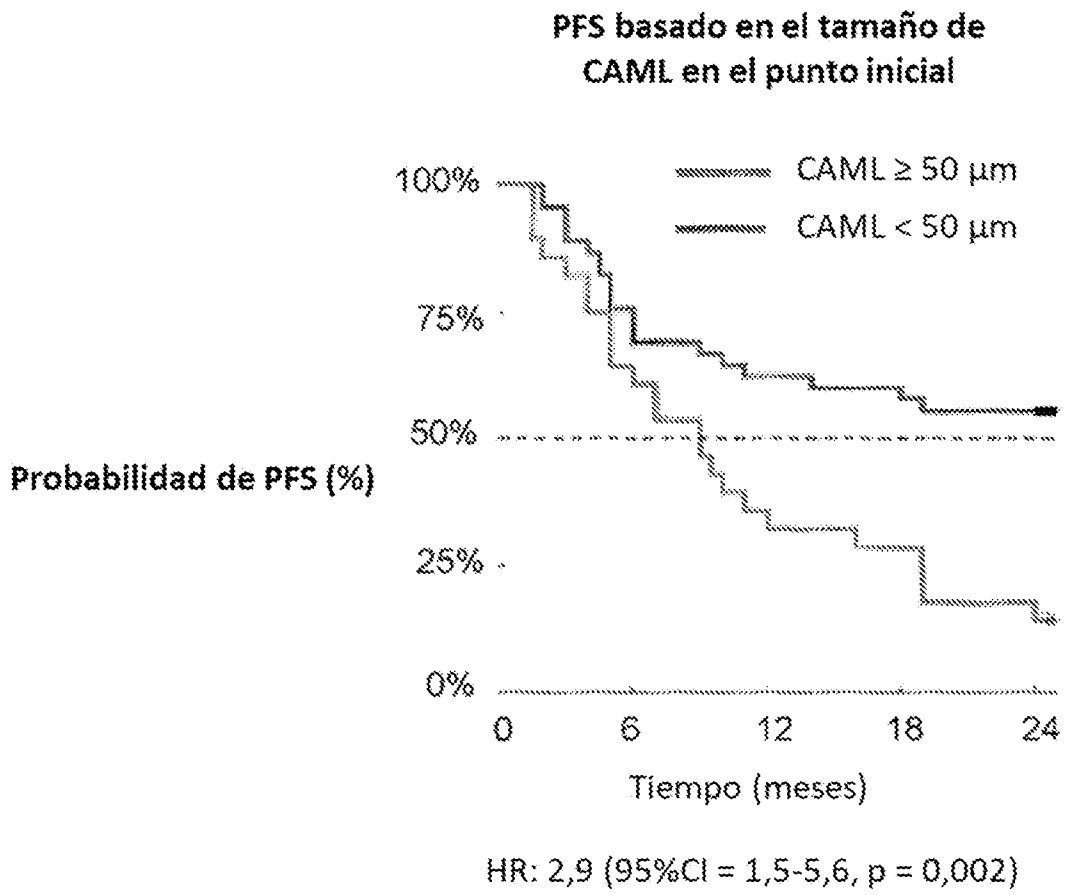


Figura 2A

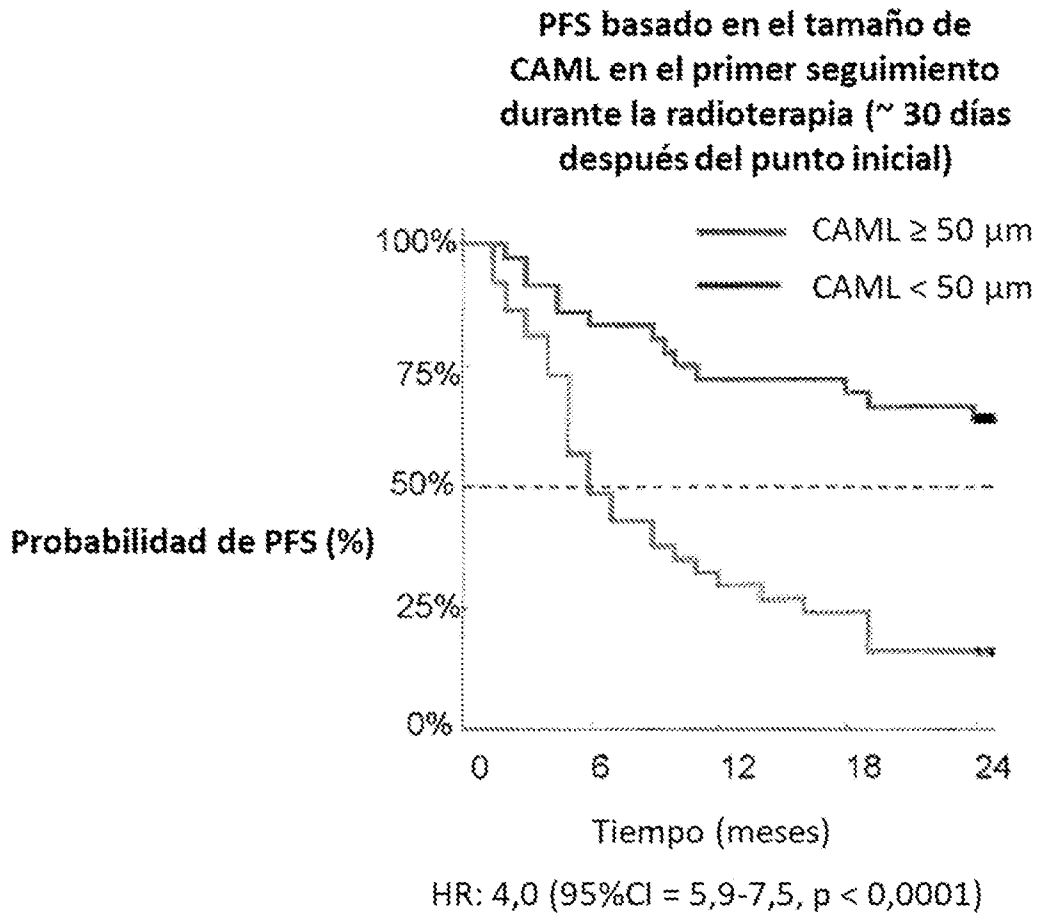


Figura 2B

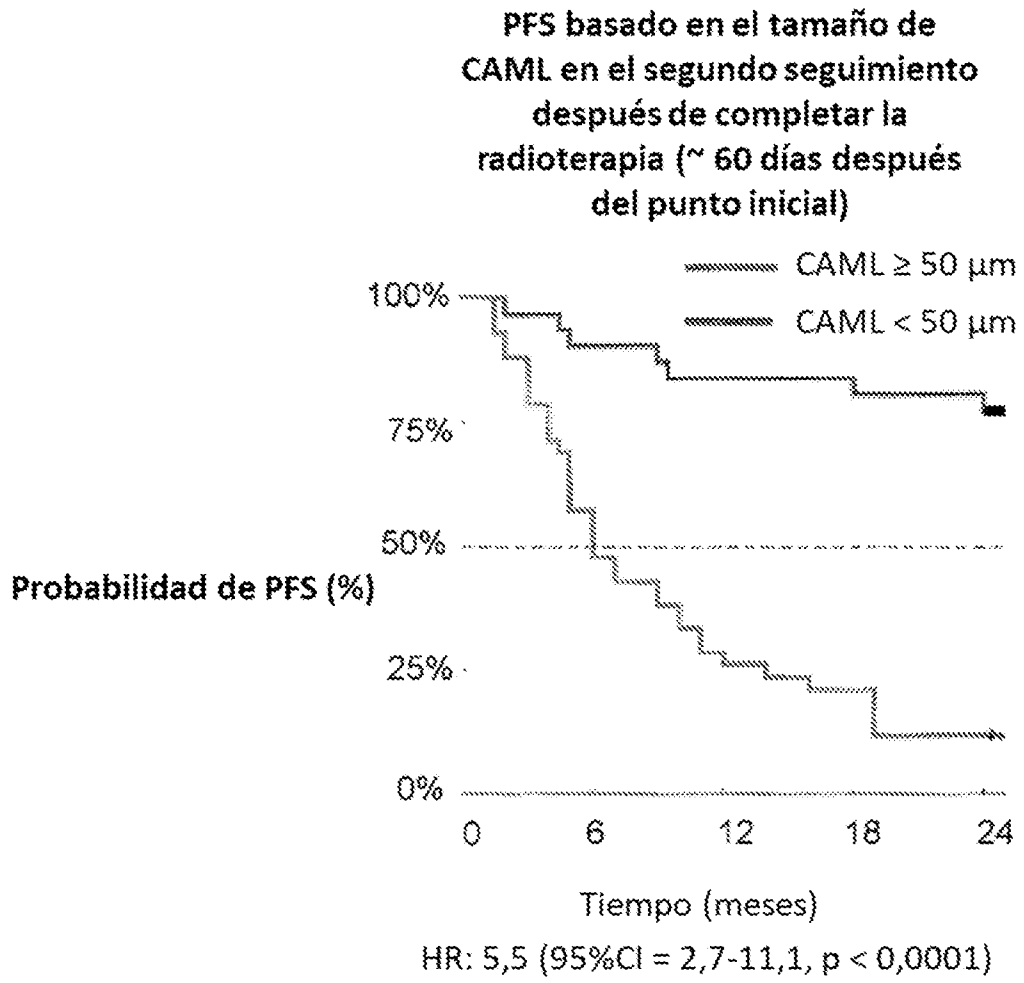


Figura 2C

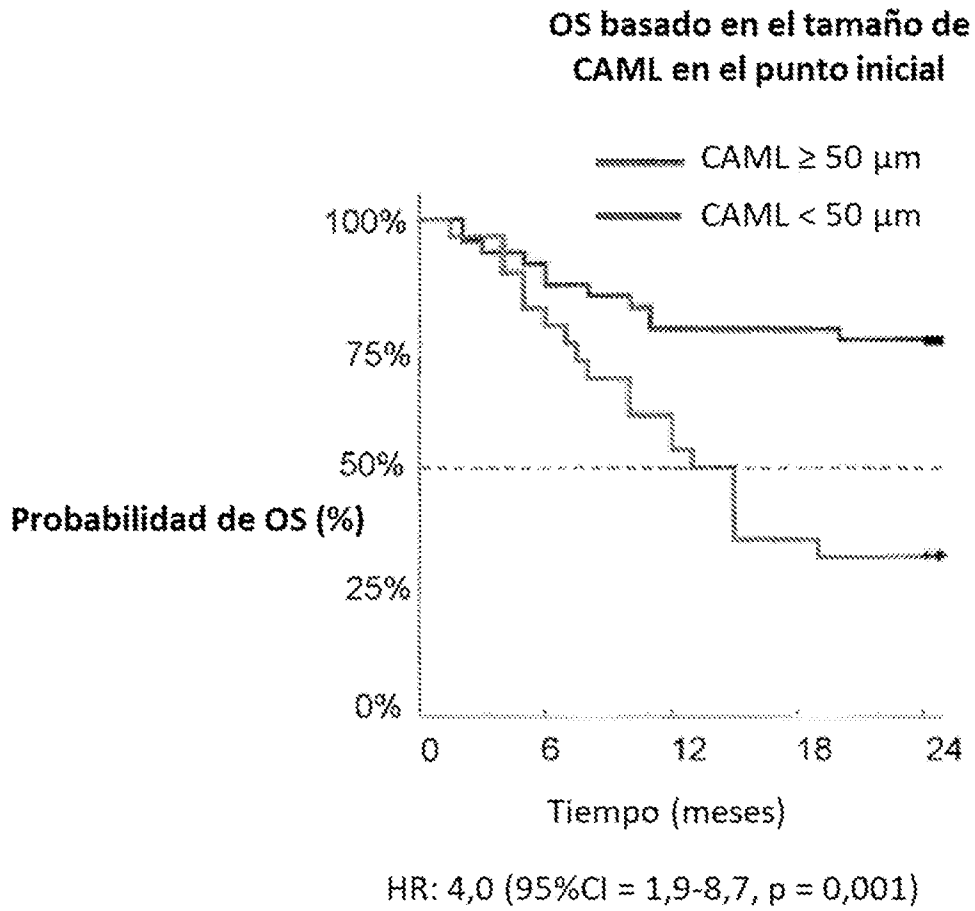


Figura 3A

OS basado en el tamaño de CAML en el primer seguimiento durante la radioterapia (~ 30 días después del punto inicial)

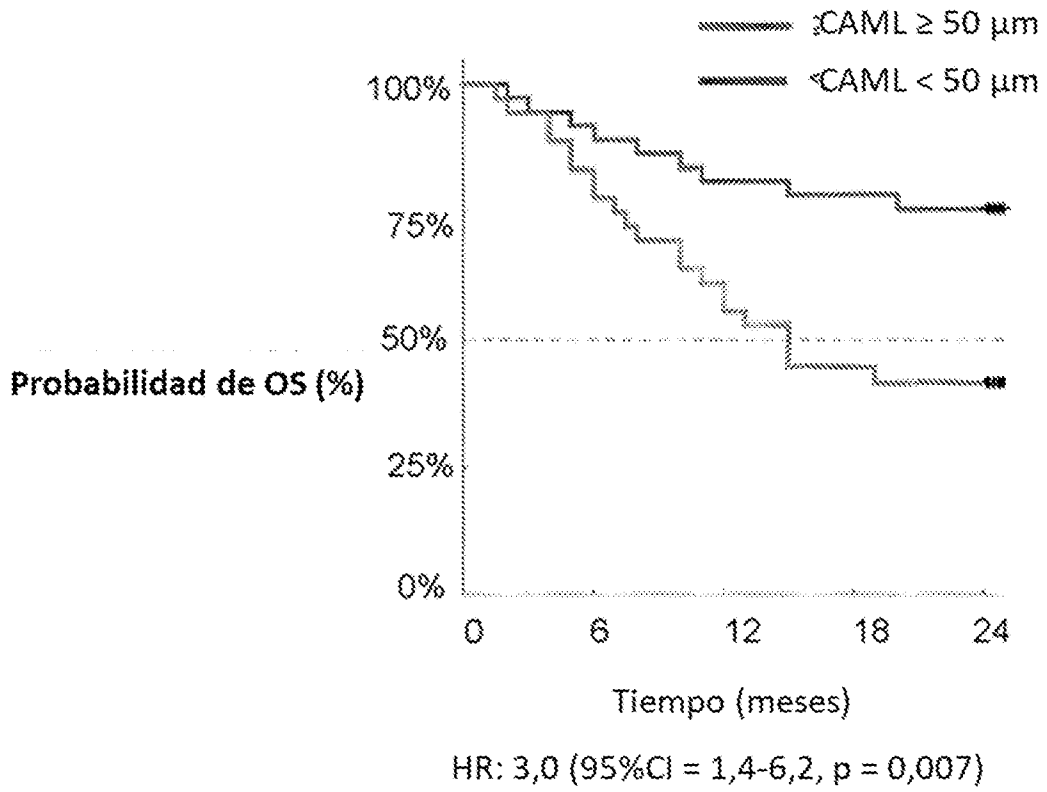


Figura 3B

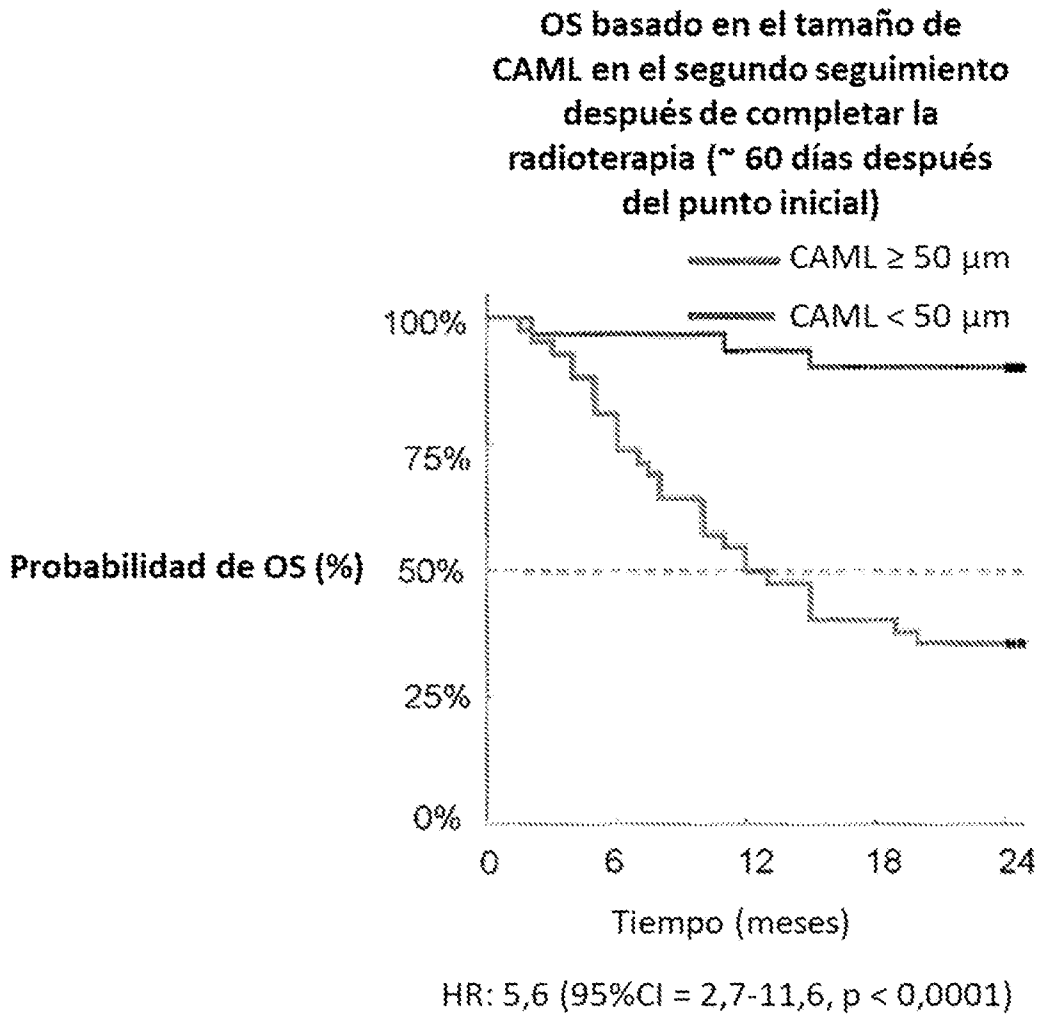


Figura 3C

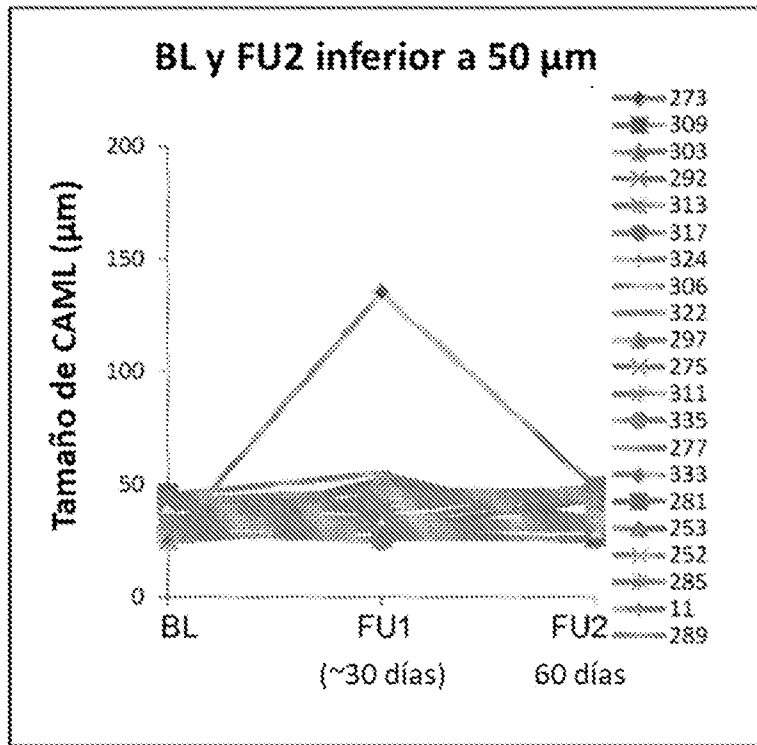


Figura 4A

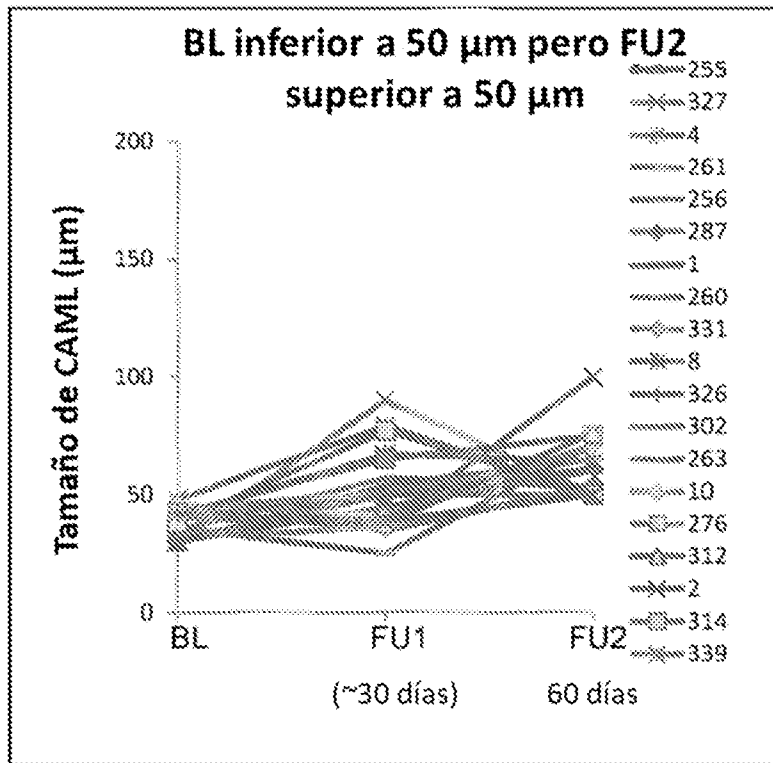


Figura 4B

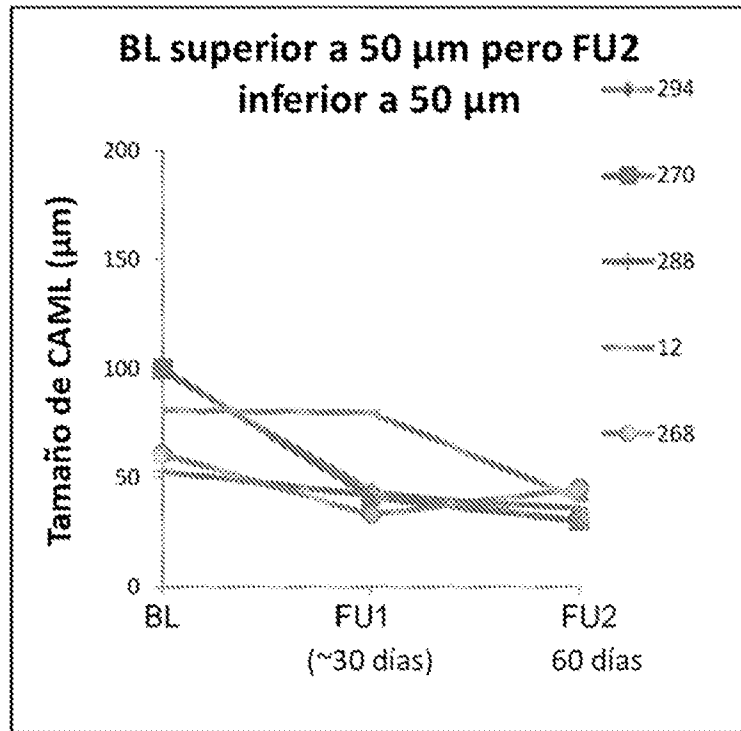


Figura 4C

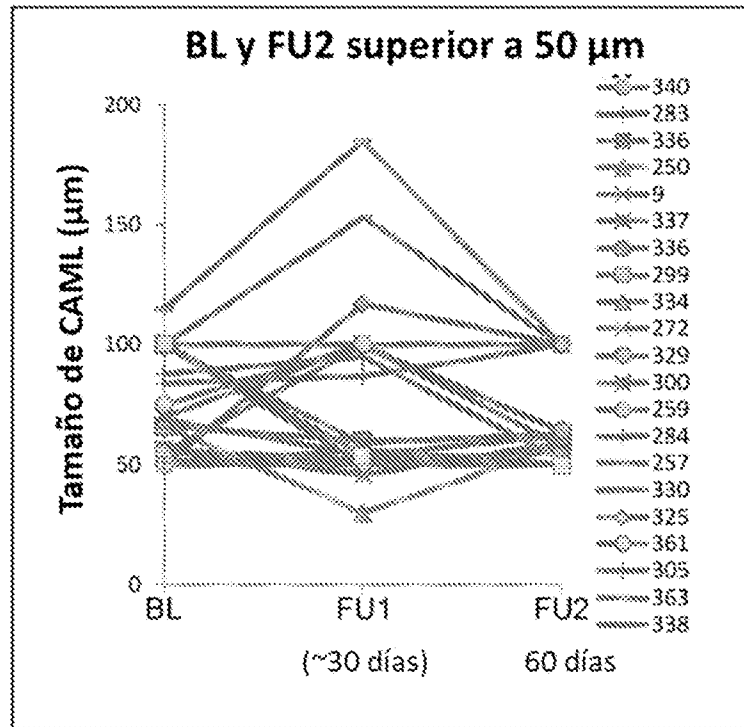


Figura 4D

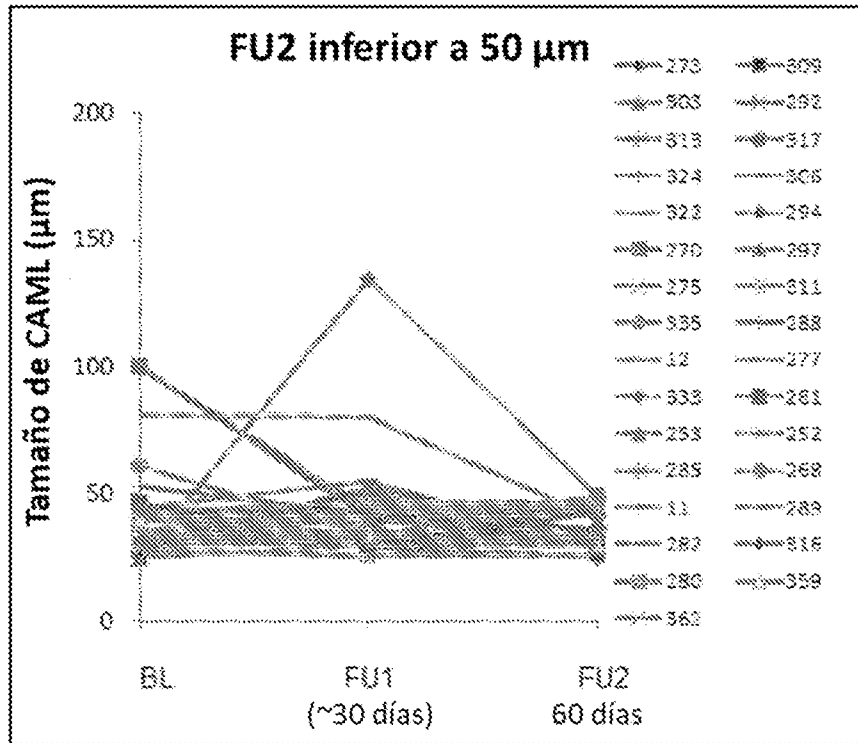


Figura 4E

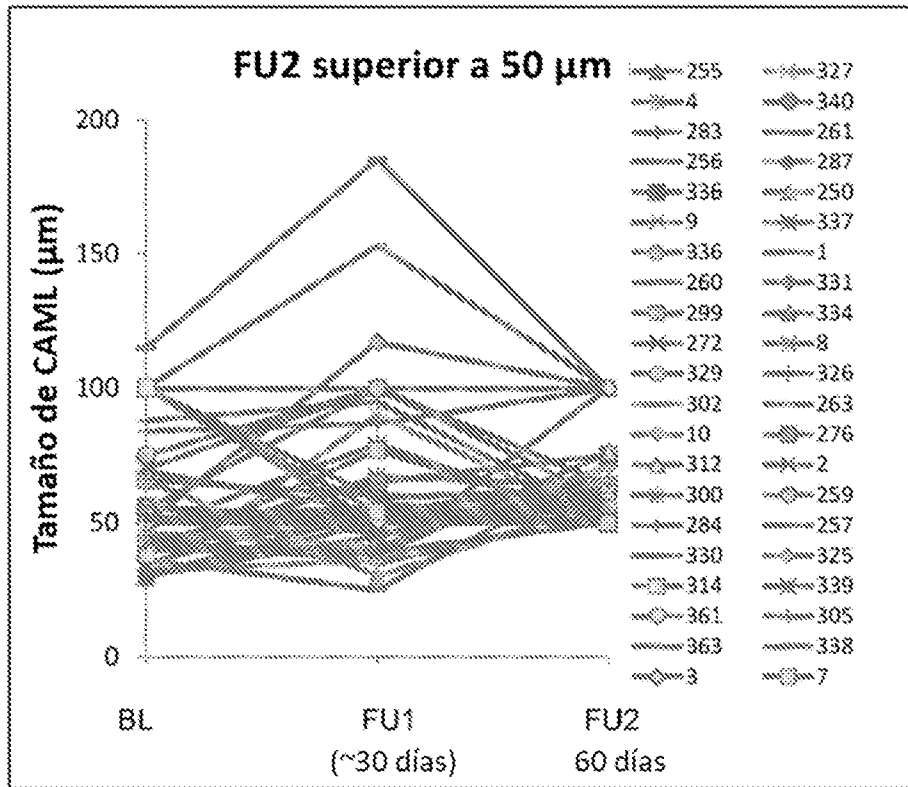


Figura 4F

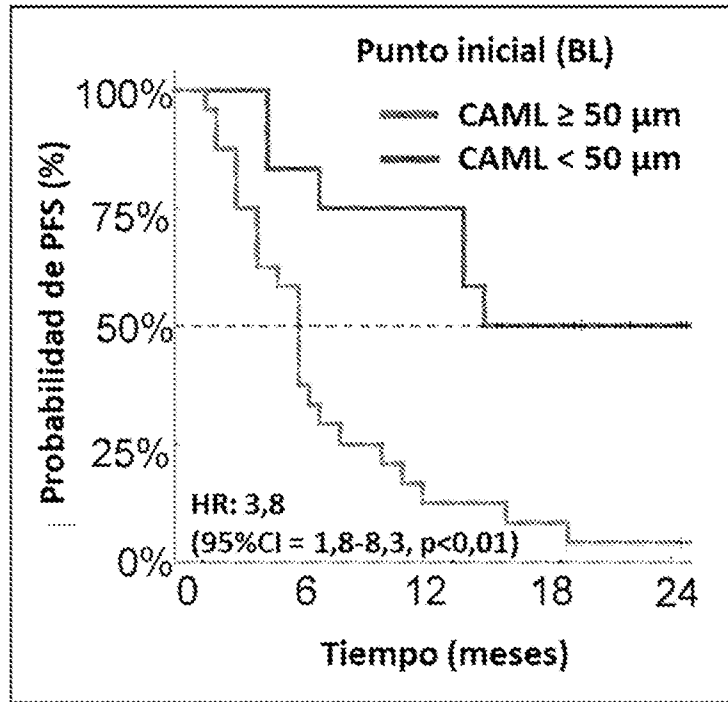


Figura 5A

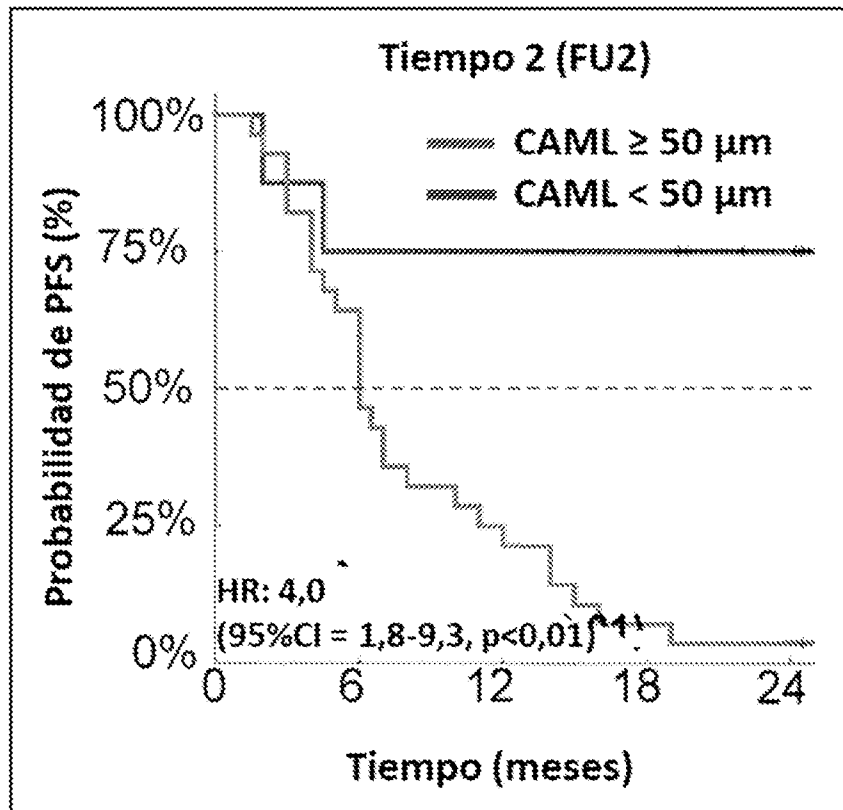


Figura 5B

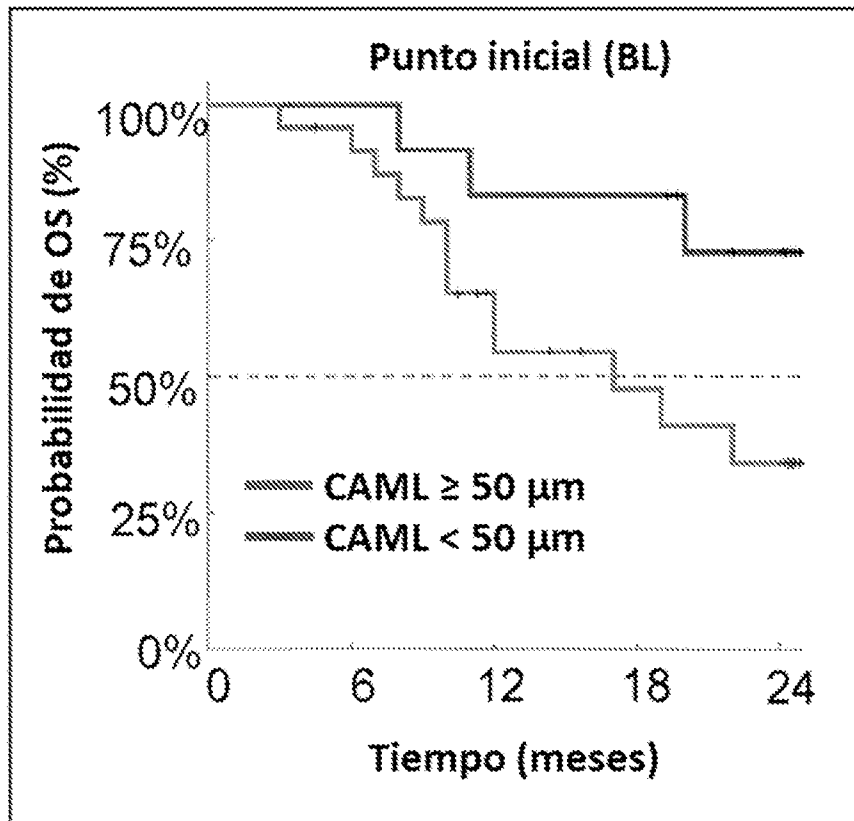


Figura 6A

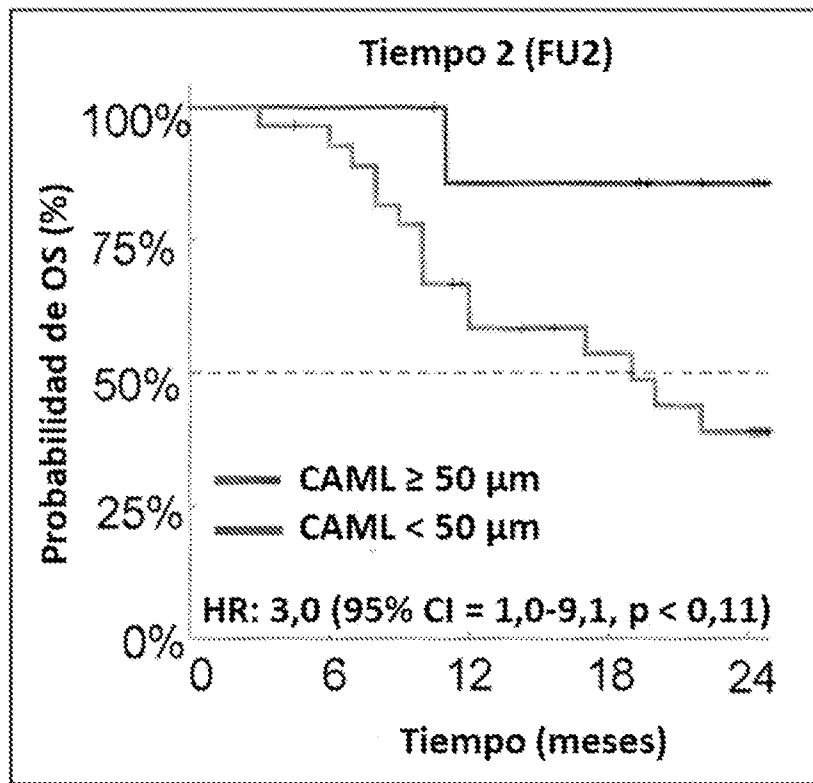


Figura 6B

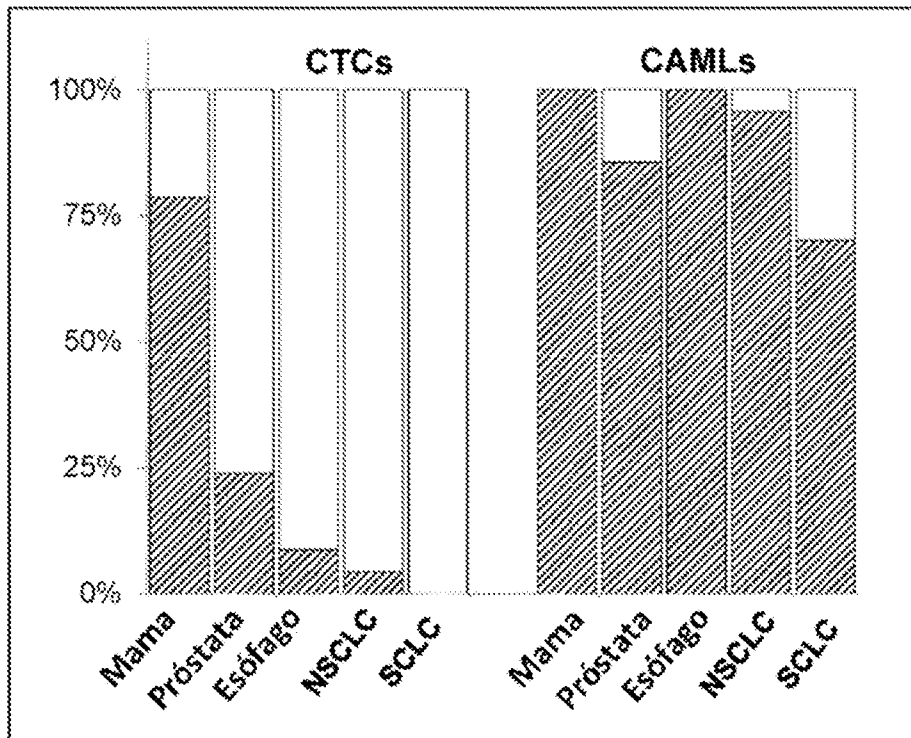


Figura 7

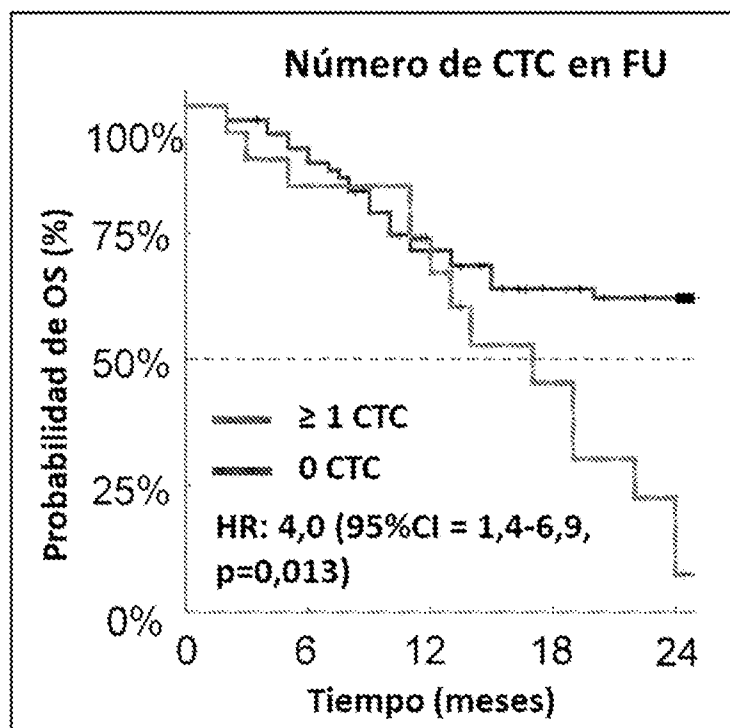


Figura 8A

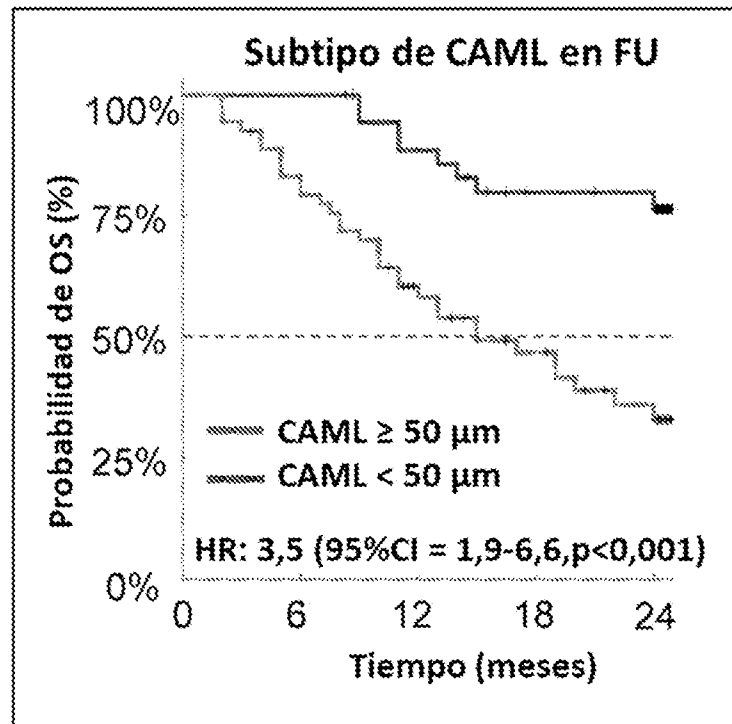


Figura 8B

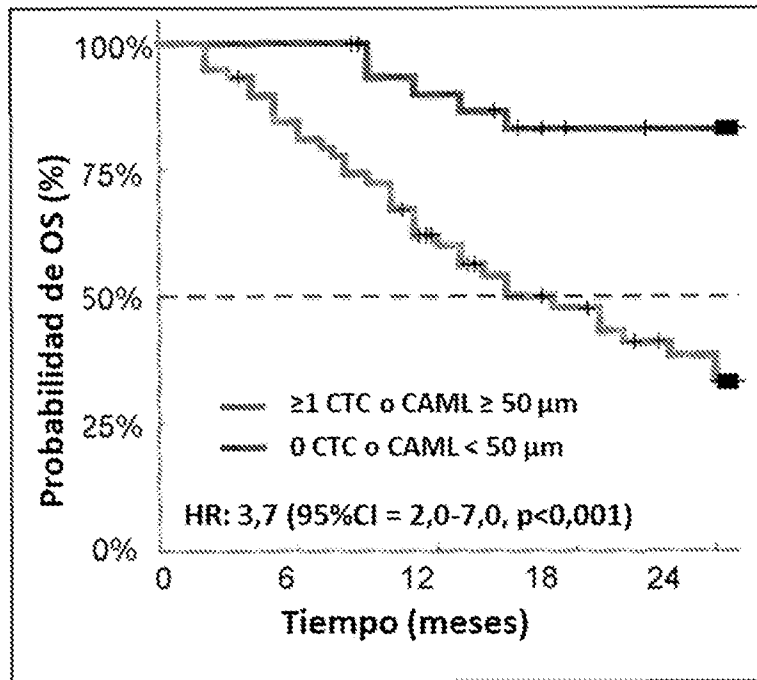


Figura 8C

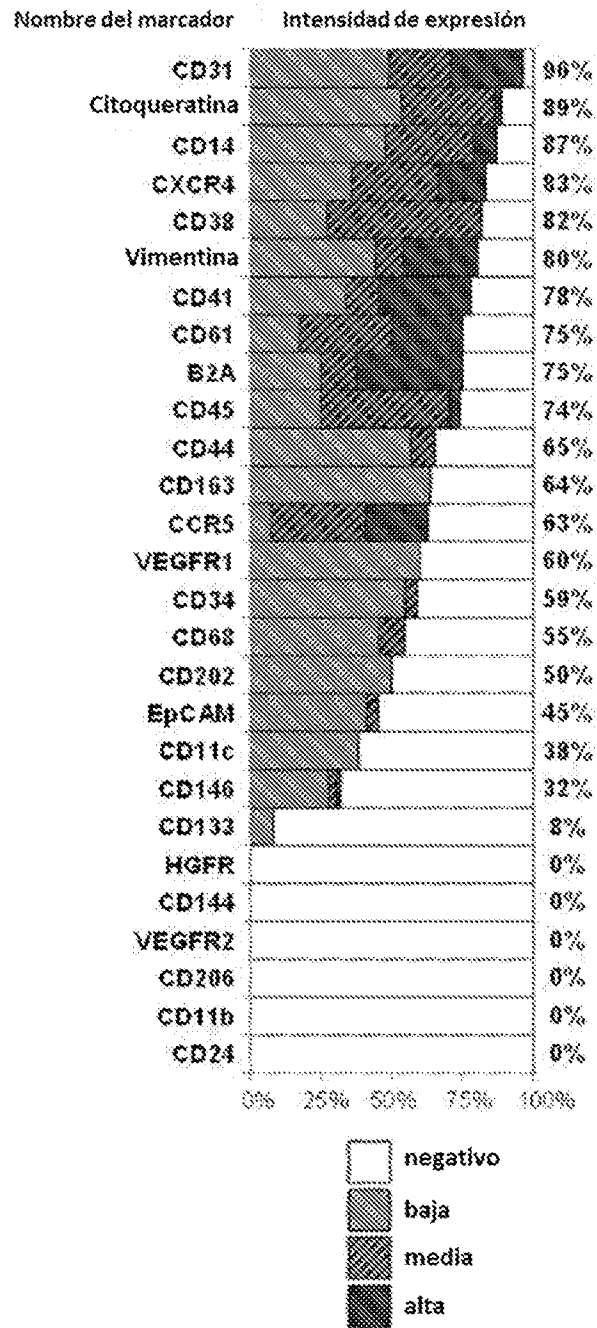


Figura 9

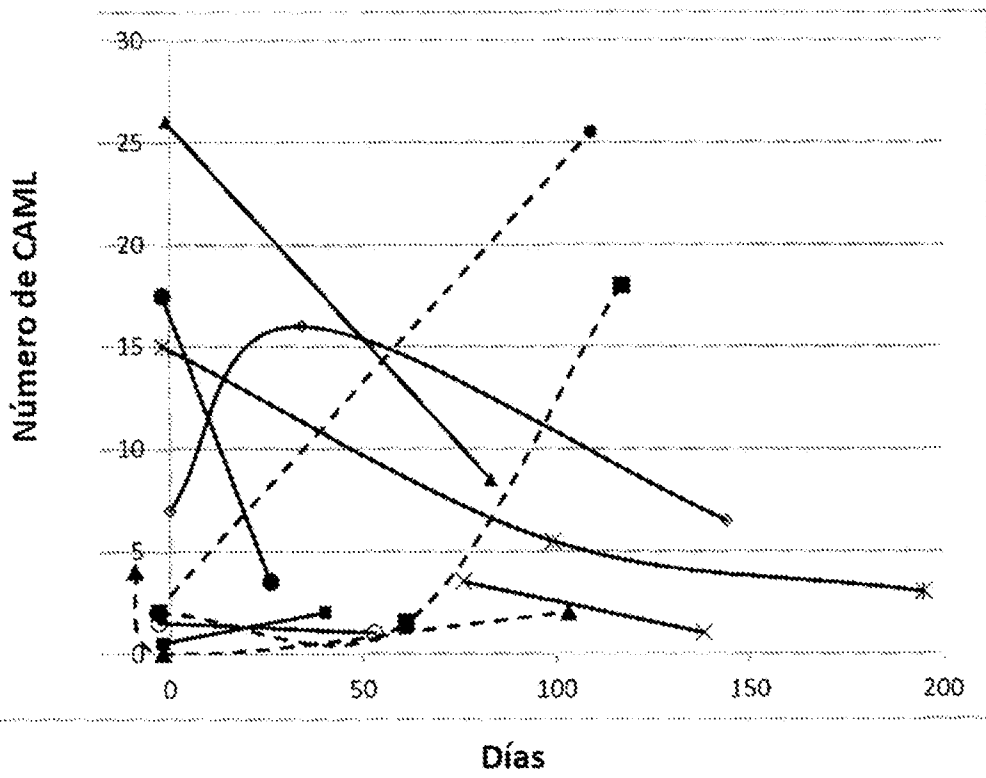


Figura 10

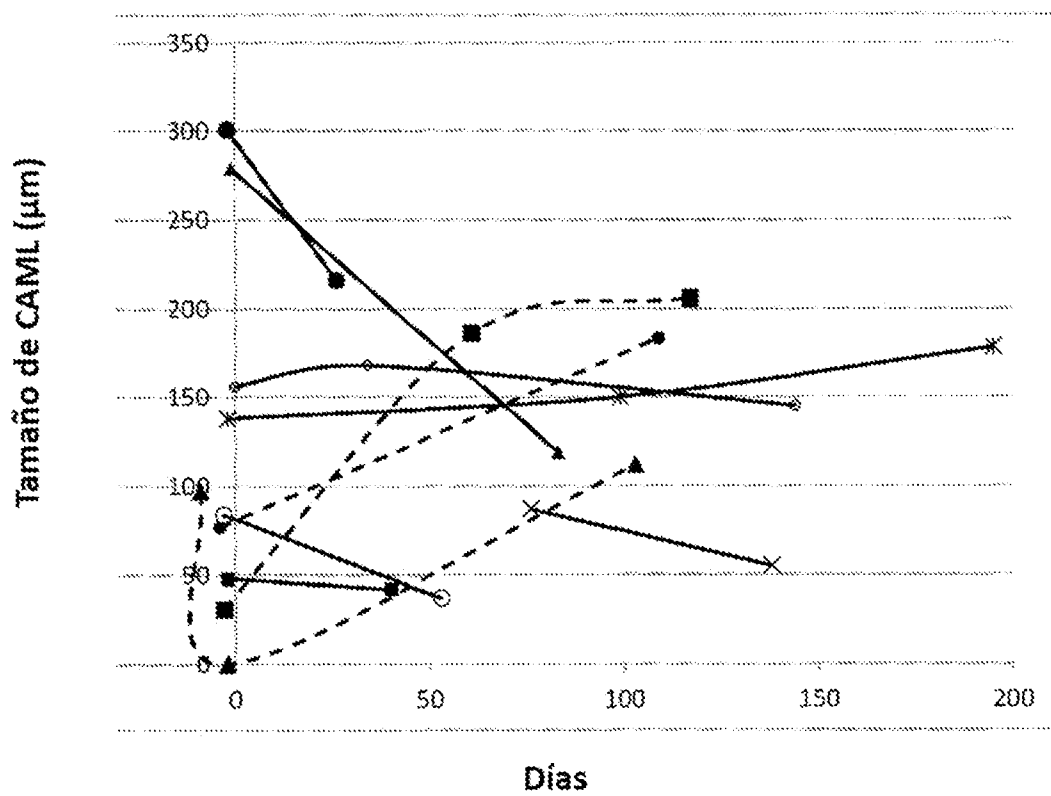


Figura 11