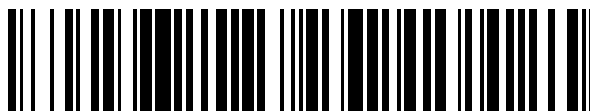


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 453**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07825055 .2**
96 Fecha de presentación: **04.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2064552**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2009**

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES CANCEROSAS UTILIZANDO CITOQUERATINAS LIBERADAS COMO MARCADORES PARA DICHAS CÉLULAS.**

30 Prioridad:
07.09.2006 US 842902 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-
EPPENDORF
MARTINISTRASSE 52
20246 HAMBURG, DE y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
MONTPELLIER - FRANCE**

72 Inventor/es:
**PANABIERES, Catherine;
PANTEL, Klaus y
VENDRELL, Jean-Pierre**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 375 453 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de células epiteliales cancerosas utilizando citoqueratinas liberadas como marcadores para dichas células

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la detección y caracterización de células derivadas de tejidos epiteliales, incluidos tumores epiteliales.

10

ANTECEDENTES

Células epiteliales presentes en órganos mesenquimales (p. ej. sangre, médula ósea o nódulos linfáticos) se pueden detectar mediante la expresión y/o liberación de proteínas del citoesqueleto específicas para el epitelio, denominadas citoqueratinas. Por ejemplo, células de tumores epiteliales derivadas de carcinomas tales como cánceres de mama, próstata, pulmón o colon se pueden detectar en el nivel de célula simple utilizando citoqueratinas (Pantel K, Brakenhoff RH, 2004, *Nat Rev Cancer* 4:448-56; Alix-Panabières C. *et al.*, 2007, *Clin Chem* 53:537-9).

15

20

Las citoqueratinas constituyen el subgrupo de proteínas de los filamentos intermedios más amplio, y representan una familia multigen con más de 20 tipos diferentes de polipéptidos que se dividen en queratinas de tipo I de carácter relativamente ácido (CK9-CK20) y de tipo II de carácter básico (CK1-CK8) (Moll R, *et al.*, 1982, *Cell*, 31:11-24). Células de epitelio normal expresan al menos una queratina de tipo I y una de tipo II. Las citoqueratinas forman el citoesqueleto de células epiteliales, y su función principal consiste en mantener la integridad de las células epiteliales. La expresión de citoqueratinas varía con el tipo de células epiteliales y, habitualmente, se mantiene en células de tumores epiteliales (p. ej., cáncer de mama, colon, próstata, etc.) (Steinert *et al.*, 1988, *Annu Rev Biochem* 57:593-625; Chu *et al.*, 2002, *Histopathology* 40:403-39), a pesar de que pueden producirse cambios en el modelo de expresión de proteínas individuales del citoesqueleto en células de carcinoma de mama humano (Willipinski *et al.*, 2005, *Clin Cancer Res* 11:8006-8014). Las citoqueratinas extracelulares se detectan en forma de fragmentos de proteínas sencillos, parcialmente degradados, en forma de pequeños complejos o en forma de grandes complejos proteínicos poliméricos (Rydlander *et al.*, 1996, *Eur J Biochem* 241:309-14). Se han sugerido múltiples mecanismos que incluyen una mitosis anormal, el desbordamiento de polipéptidos de citoqueratina monoméricos procedentes de células en división, la degradación proteolítica de citoqueratina en células apoptóticas y/o la neovascularización. Además, fragmentos de citoqueratinas extra-celulares se pueden encontrar circulando en la sangre debido a la infección.

25

30

35

CK19, una de las tres queratinas principales con CK8 y CK18, se encuentra en el epitelio simple o estratificado y en carcinomas, y se ha demostrado que se expresa de forma estable y abundante en tumores epiteliales primarios tales como de mama, colon, pulmón y células cancerígenas hepatocelulares, pero no en células hematopoyéticas mesenquimales. Varios estudios han demostrado que, tras el estrés de la célula inducido por la apoptosis, citoqueratinas tipo I se convierten en sustratos para las proteasas caspasa 3 y, específicamente, la proteólisis de CK19 de longitud completa por parte de caspasa 3 para producir el fragmento soluble de CK19, CYFRA 21-1, que se libera en el sobrenadante de células cultivadas y en el suero de pacientes de cáncer de pulmón. (Fuchs *et al.*, 1994, *Annu Rev Biochem* 63:345-82; Coulombe, PA, 1993, *Curr Opin Cell Biol* 5:17-29; Ku NO *et al.*, 1997, *J Biol Chem* 272:33197-203; Dohmoto *et al.*, 2001, *Int J Cancer* 91:468-373; Sheard *et al.*, 2002, *J Cell Biochem* 85:670-677). Además de ello, Ding *et al.*, (2004, *Mol Cell Proteomics* 3:73-81) demostraron que la sobre-expresión de CK19 intracelular en carcinoma hepatocelular está relacionada con el comportamiento metastásico. Sin embargo, no se ha informado sobre la liberación de la proteína CK19 de longitud completa (intacta).

40

45

50

La medición de CYFRA 21-1 en la circulación ha sido establecida para vigilar a pacientes con cánceres de pulmón y en cánceres de cabeza y cuello (Bodenmuller *et al.*, 1994, *Int J Biol Markers* 9:75-81; Nisman *et al.*, 1988, *Cancer* 82:1850-9; Pujol *et al.*, 1993, *Cancer Res* 53:61-6). CK19 intracelular también se ha utilizado como un marcador para la detección de células cancerígenas micrometastásicas en la médula ósea, los nódulos linfáticos y la sangre periférica mediante inmunocitoquímica (ICC – siglas en inglés) y RT-PCR (Braun *et al.*, 2000, *N Engl J Med* 2000, 342:525-533; Schoenfeld *et al.*, 1997, *Eur J Cancer* 33:854-861). Matouskova *et al.*, 2000, *Breast Cancer Research and Treatment* 60(3): 241-249 describe el cultivo de células epiteliales procedentes de muestras de tejido de mama y señala que las células de carcinomas invasivos son, en la mayoría de los casos, positivas para queratina 19, que en el epitelio mamario normal es una característica de la célula luminal totalmente diferenciada. Sin embargo, estos métodos no son capaces de distinguir entre células viables y apoptóticas, y no son adecuados para detectar proteínas marcadoras secretadas.

55

60

Existe la necesidad de un método para detectar células epiteliales viables que liberen una citoqueratina de longitud completa. También se necesita un método para detectar una citoqueratina liberada, de longitud completa, en calidad de un marcador de células epiteliales diseminadas presentes en una muestra no epitelial para indicar la presencia de células tumorales.

5

BREVE SUMARIO

En un aspecto de la presente invención se ha desarrollado un método para detectar células epiteliales diseminadas viables en una muestra que comprende células procedentes de un paciente, que normalmente no están asociadas a células epiteliales. El método incluye cultivar las células en la muestra durante un tiempo suficiente para que un marcador específico para la célula epitelial sea liberado de las células en los casos en los que el marcador sea una citoqueratina esencialmente de longitud completa. El método incluye, además, detectar el marcador liberado. La detección del marcador indica la presencia de células epiteliales diseminadas.

En otro aspecto de la presente invención, el método para detectar células epiteliales diseminadas viables en una muestra que comprende células procedentes de un paciente, no asociadas normalmente con células epiteliales, incluye, además, cultivar las células durante un tiempo suficiente para que el marcador epitelial sea liberado de las células, en el que el marcador es un polipéptido esencialmente de longitud completa que tiene un sitio de escisión enzimática dentro del polipéptido de longitud completa. El método incluye, además, detectar una porción del polipéptido de longitud completa, encontrándose la porción en posición 5' con respecto al sitio de escisión enzimática. La detección de la porción 5' identifica al polipéptido de longitud completa, en donde la porción 5' comprende una secuencia de polipéptidos esencialmente idéntica a SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 15.

Ventajas de la presente invención resultarán más evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la presente invención que han sido mostradas y descritas a modo de ilustración. Como se reconocerá, la invención es susceptible de otras y diferentes realizaciones, y sus detalles son susceptibles de modificación en diversos aspectos. Por consiguiente, los dibujos y la descripción han de considerarse como ilustrativos por naturaleza y no como restrictivos.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se describirán ahora a modo de ejemplo realizaciones de la presente invención con referencia a los dibujos que se acompañan, en los que:

35

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de CK19 que ilustra los sitios de unión de los anticuerpos anti- citoqueratina y el sitio de escisión de caspasa 3:

La FIG. 2 A es la secuencia de aminoácidos de CK19 de longitud completa (SEQ ID NO: 1) que muestra el péptido tríptico único que distingue a CK19 de longitud completa de CYFRA 21-1 subrayada (SEQ ID NO: 2); y

40

La FIG. 2B, el espectro MS/MS del péptido específico para CK19 ($[M+2H]^{2+}$; m/z 1007,86), que muestra la serie de iones y de este péptido con la secuencia parcial inversa 'ASDVEVSVQ' (SEQ ID NO: 15) que demuestra que CK19 de longitud completa fue detectada en el sobrenadante exento de células de células MCF-7; y

45

La FIG. 3 ilustra análisis de Kaplan-Meier realizados con pacientes de cáncer de mama investigados durante una media de 6 años. Pacientes con células epiteliales que segregaban CK19 en su médula ósea tenían un resultado clínico desfavorable, indicando que estas células podrían ser células tumorales capaces de formar metástasis manifiestas en los huesos y otros órganos secundarios tales como hígado, pulmón o cerebro. Así, estos datos proporcionan evidencia del potencial maligno de células de tumores epiteliales diseminadas que segregan CK19.

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a métodos para detectar células de tumores epiteliales diseminadas y circulantes en una muestra que comprende células de un paciente que no están normalmente asociadas a células epiteliales. Los métodos pueden incluir detectar marcadores que están no escindidos, proteínas intactas, proteínas escindidas o proteínas modificadas de otro modo, liberadas de células mediante derramamiento, secreción u otros mecanismos. Los métodos se refieren también a detectar células epiteliales diseminadas en muestras no epiteliales, incluidos tejidos mesenquimales tales como sangre o médula ósea. El término "diseminado" tal como se utiliza en esta memoria en referencia a una célula significa una célula que se encuentra en un lugar en el cuerpo

60

que es diferente de su sitio de origen o localización normal en el cuerpo. Células cancerígenas que han sido metastatizadas son células diseminadas, debido a que se han propagado desde su sitio o tejido de origen a un sitio diferente del cuerpo. Una célula diseminada también puede ser una célula que ha comenzado a expresar de manera inapropiada proteínas, lo cual puede ser indicativo de un estado patológico. A modo de ejemplo no limitante, una célula epitelial encontrada en la sangre periférica o médula ósea sería una célula diseminada, debido a que su sitio de origen o localización normal es distinto del tejido mesenquimal.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de inmunología, virología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica. Técnicas de este tipo se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, p.ej., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I y II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames y Higgins, eds., 1984); Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (2000); Glover, ed., DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I y II; Colowick y Kaplan, eds., Methods in Enzymology, Academic Press; Weir y Blackwell, eds., Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Pubs. (1986); Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. (2000); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984).

Aislamiento de muestras de células

La presente invención se refiere a una muestra de células de un paciente. Las células se pueden derivar de cualquier fuente en el paciente. En algunos aspectos, las células se pueden derivar de la sangre, médula ósea, nódulos linfáticos, fluido peritoneal, orina y otras fuentes conocidas por un experto en la técnica. Preferiblemente, las células se derivan de la sangre, médula ósea o nódulos linfáticos. Por ejemplo, células procedentes de la sangre pueden haber sido previamente aisladas de un paciente por técnicas rutinarias (tal como la centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque de linfocitos de la sangre periférica). Células procedentes de la médula ósea pueden haber sido previamente aisladas utilizando técnicas de aspiración con aguja comúnmente conocidas en la técnica. Se pueden haber utilizado perlas inmunomagnéticas revestidas con anticuerpos monoclonales específicos contra marcadores de las células superficiales o complejos de anticuerpos tetraméricos para primero enriquecer o seleccionar positivamente células tales como células tumorales circulantes, en una muestra. Se han podido utilizar diversos kits comercialmente disponibles, incluidos Dynabeads™ Epithelial Enrich (DynaL Biotech, Oslo, Noruega), StemSep™ (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC), y RosetteSep™ (StemCell Technologies). Un artesano experto reconocerá que se pueden también utilizar otras metodologías y kits para enriquecer o seleccionar positivamente poblaciones deseadas de células. Células aisladas se pueden lavar y re-suspender en medios y disponer en cultivo estéril *in vitro*. Las células aisladas se pueden cultivar durante un tiempo suficiente para que las células liberen citoqueratinas en los medios de cultivo.

Enriquecimiento de poblaciones de células dentro de una muestra

En algunas realizaciones de la presente invención, las células aisladas pueden ser desprovistas de poblaciones específicas de células para enriquecer adicionalmente las células epiteliales circulantes. Por ejemplo, células CD-45⁺ pueden ser agotadas mediante FACS o utilizando un kit comercial tal como RosetteSep™, incluido un anticuerpo anti-CD45 para reticular y separar células CD-45⁺ tal como linajes de células hematopoyéticas residuales. Otras poblaciones de células pueden ser agotadas utilizando técnicas similares conocidas por un experto en la técnica.

Citoqueratinas liberadas en calidad de células epiteliales de marcadores

En algunas realizaciones, el marcador epitelial se utiliza para evaluar la presencia de células epiteliales diseminadas encontradas en tejidos normalmente no asociados con células epiteliales tales como en tejidos mesenquimales (p. ej. sangre, médula ósea) con el fin de evaluar el estado del progreso del tumor (en particular la detección temprana de metástasis) en pacientes de cáncer.

En algunas realizaciones, los marcadores epiteliales pueden ser citoqueratinas seleccionadas de citoqueratinas CK1-CK20. Las citoqueratinas CK1-CK20 se han descrito en la bibliografía, por ejemplo, véase Moll R, *et al.*, 1982, *Cell* 31:11-24, que se incorpora como referencia en su totalidad en esta memoria. En algunas realizaciones, las citoqueratinas se pueden liberar a partir de las células. Las citoqueratinas se pueden escindir y se puede liberar una parte del polipéptido de longitud completa, tal como el extremo carboxi. Por ejemplo, el extremo carboxi de CK-19 se puede liberar después de la escisión con caspasa 3 tal como se muestra en la Fig. 1. Las citoqueratinas se

pueden liberar en forma de polipéptidos sustancialmente intactos y de longitud completa que no han sido escindidos o degradados de otra manera. Citoqueratinas intactas de longitud completa se pueden liberar por parte de células viables y que no han sido escindidas, por ejemplo, por una enzima apoptótica. En algunas realizaciones, la citoqueratina utilizada como un marcador de células epiteliales puede ser citoqueratina 19 y, además, puede ser citoqueratina 19 que es liberada de las células viables tales como un polipéptido esencialmente de longitud completa.

La expresión “esencialmente de longitud completa”, en el contexto de un marcador epitelial liberado, se refiere a un porcentaje de residuos aminoácidos que son liberados de la célula en comparación con la secuencia de longitud completa (es decir, al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%).

También se pueden utilizar marcadores epiteliales adicionales conocidos por un experto en la técnica.

15 **Detección de marcadores de células epiteliales**

La presente invención permite la detección de marcadores de células epiteliales que han sido liberados a partir de células aisladas. En algunas realizaciones, la detección de marcadores de células epiteliales se realiza en una población de células mixtas tales como células epiteliales y tejidos mesenquimales, en donde las células epiteliales pueden ser células tumorales diseminadas. Por ejemplo, los marcadores de células epiteliales se pueden detectar en una población de células mesenquimales que no incluyen normalmente células epiteliales, en que el marcador de la célula epitelial indica células de tumores epiteliales diseminadas. En algunas realizaciones, la detección de marcadores de células epiteliales se realiza dentro de una población de células normales.

Los métodos para detectar la expresión de marcadores epiteliales, en particular la expresión de citoqueratina, comprenden el intervalo completo de métodos de diagnóstico convencionales. Ejemplos de los mismos son métodos microscópicos, inmuno-citológicos/inmuno-citoquímicos, bioquímicos y/o de biología molecular. Por ejemplo, métodos para detectar proteínas de marcadores epiteliales liberadas pueden incluir, pero no se limitan a ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas, ensayos ELISPOT, transferencia Western, radioinmunoensayo, micro-disposiciones ordenadas de proteínas y ensayos proteómicos, incluida la espectrometría de masas.

Inmunoensayos adecuados para la detección de los marcadores epiteliales incluyen, típicamente, poner en contacto una muestra de ensayo con un anticuerpo que se une específicamente a o que reconoce de otra manera a un marcador, y detectar la presencia de un complejo del anticuerpo unido al marcador en la muestra. Se pueden utilizar anticuerpos policlonales o monoclonales. El anticuerpo se puede fijar a un soporte sólido antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra de ensayo para facilitar el lavado y el subsiguiente aislamiento del complejo de anticuerpo/marcador de proteínas. Ejemplos de soportes sólidos incluyen, por ejemplo, vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microtitulación. Los anticuerpos también se pueden unir al sustrato de la sonda tal como disposiciones ordenadas de proteínas.

Después de incubar la muestra de ensayo con el anticuerpo, la mezcla se lava y se puede detectar el complejo anticuerpo-marcador. La detección se puede conseguir incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección y observando, por ejemplo, el desarrollo de un color u otro indicador. Se puede utilizar cualquier marcador detectable. El reactivo de detección puede ser, por ejemplo, un segundo anticuerpo que está marcado con un marcador detectable. Marcadores detectables a modo de ejemplo incluyen perlas magnéticas (p. ej. DYNABEADS™), colorantes fluorescentes, radiomarcadores, enzimas (p. ej. peróxido de rábano picante, fosfatasa alcalina y otros comúnmente utilizados en procesos de inmunoensayo enzimáticos) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal, vidrio coloreado o perlas de plástico.

Alternativamente, el marcador en la muestra se puede detectar utilizando un ensayo indirecto en donde, por ejemplo, se utiliza un anticuerpo marcado para detectar el complejo marcador-anticuerpo específico unido y/o en un ensayo de competición o inhibición en donde, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo distinto del marcador se incuba simultáneamente con la mezcla. La cantidad de un complejo de anticuerpo-marcador se puede determinar comparando con un patrón.

En algunas realizaciones, el marcador epitelial liberado se puede utilizar utilizando un anticuerpo dirigido contra una porción 5' de un polipéptido que se encuentra aguas arriba de un sitio de escisión conocido para detectar un marcador epitelial liberado, de longitud esencialmente completa. Por ejemplo, el anticuerpo 5' puede encontrarse aguas arriba de un sitio de escisión apoptótico tal como un sitio de un miembro de la familia de la caspasa. También se puede utilizar un anticuerpo dirigido contra una porción 3' de un polipéptido, preferiblemente junto con el anticuerpo 5', para detectar marcadores epiteliales liberados, de longitud esencialmente completa.

Ensayos de este tipo son bien conocidos por el artesano experto y se describen, por ejemplo, más a fondo en *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) por Harlow y Lane; *Immunoassays: A Practical Approach*, Oxford University Press, Gosling, J. P. (ed.) (2001) y/o *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al.) que se actualizan de forma regular y periódica.

5 Los marcadores epiteliales identificados en el ensayo se pueden utilizar para identificar células de tumores diseminadas derivadas de tumores sólidos. Ejemplos de tumores sólidos que pueden identificarse por parte de los marcadores epiteliales incluyen, pero no se limitan a lo siguiente: carcinoma, adenoma, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, carcinoma esofágico, carcinoma de tiroides, ganglioblastoma, sinovioma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, carcinoma del conducto biliar, melanoma, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, retinoblastoma, carcinoma rectal, cáncer del tiroides, cáncer de cabeza y cuello y cáncer del endometrio.

La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos que pretenden elaborar varias realizaciones de la presente invención. Estos ejemplos no pretenden o no han de interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de establecer, utilizando no más de una experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a las sustancias y procesos específicos descritos en esta memoria. Equivalentes de este tipo pretenden quedar abarcados por el alcance de las reivindicaciones que siguen a los ejemplos que figuran a continuación

Ejemplos

25 Preparación de células

Pacientes y controles de salud. Después de haber obtenido un consentimiento informado por escrito 10 pacientes de cáncer de colon metastásico, 13 pacientes de cáncer localizado y 11 pacientes que presentaban una enfermedad colorrectal benigna fueron incluidos en este estudio en el Departamento de Gastroenterología de Cirugía en el Hospital Saint-Eloi de Montpellier, así como 14 voluntarios exentos de cáncer. Ninguno de los pacientes había recibido quimioterapia ni radioterapia durante los meses que precedían al estudio. Además, se incluyeron 57 pacientes de cáncer de mama en diferentes fases (20 pacientes de cáncer de mama metastásico y 37 de cáncer de mama localizado) en la Clínica Val D'Aurelle de Montpellier, así como 11 pacientes con un linfoma en calidad de grupo control negativo.

Con el fin de explorar las células mamarias normales en la leche, se reclutaron a 3 mujeres lactantes sanas con la ayuda del Banco de Leche Humana del Hospital Universitario de Montpellier, Francia.

40 *Proceso de agotamiento de células hematopoyéticas.* Muestras de sangre recogidas en tubos de EDTA fueron desprovistas de células hematopoyéticas utilizando el proceso RosetteSep[®] (RosetteSep Circulating Epithelial Tumor Cell Extensive Enrichment Cocktail, StemCell, Vancouver, Canadá), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, las células se crioconservaron en nitrógeno líquido antes de testarlas con el ensayo CK19-EPISPOT (descrito más abajo).

45 *Aislamiento de células mamarias primarias normales de muestras de leche.* Leche entera se centrifugó a 1200 x g durante 15 min a 4°C para separar fracciones acelulares y lipídicas.

Sedimentos de células de leche de mama (BMC – siglas en inglés) se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS – siglas en inglés) suplementada con FCS al 5%. Después, las células se resuspendieron en el medio DMEM completo descrito más abajo para células MCF-7. Células no hematopoyéticas se aislaron a partir de partes alícuotas de BMC de controles de mujeres lactantes mediante selección negativa utilizando un proceso de roseteo. En síntesis, glóbulos rojos se aislaron de 5 ml de sangre entera procedente de donantes sanos mediante centrifugación de la muestra durante 10 min a 50 x g para separar células mononucleares de la sangre periférica (PBMC – siglas en inglés). Los glóbulos rojos se lavaron tres veces en PBS-FCS al 2% y se resuspendieron en 1 ml de PBS-FCS al 2%. Después se añadieron cien microlitros de los glóbulos rojos a 3 ml de la suspensión de BMC. Después, células CD45⁻ se separaron de BMC utilizando un cóctel de enriquecimiento de células CD45 negativas Rosette Sep[™] que incluían complejos tetraméricos con anticuerpos (Abs – siglas en inglés) dirigidos contra receptores de la membrana de células hematopoyéticas humanas (CD2, CD16, CD19, CD36, CD38, CD66b y CD45) y de glóbulos rojos (glicoforina A) (Stemcell Technologies, Meylan, Francia). En síntesis, BMC y glóbulos rojos se incubaron durante 20 min a la temperatura ambiente con el cóctel de enriquecimiento de

anticuerpos, y luego se estratificaron en gradiente de densidad de ficoll-hypaque mediante centrifugación durante 20 min a 1200 x g. Células CD45⁺ no hematopoyéticas en reposo enriquecidas se recuperaron a partir de la interfase de ficoll/plasma, se lavaron tres veces en PBS-FCS al 2% y se resuspendieron en el medio DMEM completo con FCS y antibióticos.

5 *Preparación de células a partir de tejido de colon normal y tumoral.* Probetas de tejido de colon normal y tumoral humano fueron recibidas de los quirófanos en tubos que contenían DMEM con FCS al 10% y fármacos antibióticos y se mantuvieron en hielo hasta la desagregación. Los autores de la invención examinaron 2 carcinomas de colon primarios y 2 tejidos de colon normales. El tejido de colon se desagregó mecánicamente por medio de un
10 desagregador de tejido automatizado Medimachine (DAKO, Hamburgo, Alemania). Para este fin, tejido tumoral se cortó en trozos pequeños y se colocó en una cámara de desagregación desechable (Medicon; DAKO) junto con 1,5 ml de medio de invasión exento de suero (DMEM con 2 mmol/L de 1-glutamina, fármacos antibióticos y albúmina de suero bovino (BSA; Sigma) al 0,1%). El Medicon se insertó en la unidad de motor de la máquina y se hizo funcionar durante 2 minutos a una velocidad rotacional prefijada de aproximadamente 80 rpm. Una parte alícuota de la
15 suspensión de células que contenía células sencillas y racimos de células se contó en un hematocitómetro con portaobjetos Kovacs, con tinción por exclusión con colorante azul tripano.

Líneas celulares

20 Líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal (HT-29, Caco-2 y HCT 116) y mamario (MCF-7) se utilizaron como controles positivos para la optimización del ensayo CYFRA 21-1 y CK-19-EPISPOT. Líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello (SCC-14C y SCC-22A) fueron amablemente proporcionadas por el Dr R. H. Brakenhoff (Dept. Otolaryngology/Head-Neck Surgery, Amsterdam, Holanda). Las líneas celulares de cáncer de
25 tiroides ML-1 y C643 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. D. Grimm (Departamento de Medicina Nuclear, Universidad de Regensburg, Alemania) y por el Dr. N-E Heldin (Departamento de Genética y Patología, Hospital Universitario de Uppsala, Uppsala, Suecia), respectivamente. Las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC3 también se utilizaron en el desarrollo de este ensayo.

30 Células HT-29 y HCT 116 se mantuvieron en medio de Mc Coy 5A (Invitrogen, Leiden, Holanda) suplementado con glutamax al 1% (Life Technologies, Paisley, Escocia), suero de ternero fetal al 10% (FCS, Life Technologies), 500 U/mL de penicilina y 500 µg/mL de estreptomina (Life Technologies) en una incubadora humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C. Células Caco-2 y C643 se mantuvieron en medio esencial mínimo (Eurobio) suplementado con glutamax al 1% (Life Technologies), FCS al 20% (Life Technologies), 500 U/mL de penicilina y 500 µg/mL de
35 estreptomina (Life Technologies). Células MCF-7, ML-1, SCC-14, SCC-22, PC3 y LNCaP se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Biochrom KG, Berlín, Alemania) suplementado con glutamax al 1% (Life Technologies, Paisley, Escocia), FCS al 10%, (Life Technologies), 500 U/mL de penicilina y 500 µg/mL de estreptomina (Life Technologies) en una incubadora humidificada que contenía 5% de CO₂ a 37°C.

Ensayos

40 *Medición de CYFRA 21-1.* CYFRA 21-1 se midió mediante el ensayo inmunométrico de CYFRA 21-1 (B.R.A.H.M.S., Hennigsdorf, Alemania) en sobrenadantes de cultivos. El umbral de detección de este ensayo era 0,05 ng/mL. Los valores se expresan como media ± DE de 3 determinaciones separadas.

45 *Ensayos EPISPOT.* Placas de 96 pocillos de membranas Immobilon-P (MAIPN450, Millipore Corporation, Bedford, MA) se revistieron durante una noche a 4°C con el mAb (anticuerpo monoclonal) Ks19.1 anti-CK 19 (6 µg/mL) (Progen Biotechnik GMBH, Heidelberg, PA). El mAb no ligado se separó mediante lavado tres veces con PBS. Después, las placas se bloquearon con PBS suplementado con FCS al 5% (Sigma, Chemical Co., Saint Louis, Missouri) durante 1 h a la temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Para bloquear la síntesis de
50 proteínas, las líneas celulares se incubaron con 50 µg/mL de cicloheximida durante el ensayo EPISPOT. Subsiguientemente, células viables se recontaron en un portaobjetos Kovacs con tinción por exclusión con colorante azul tripano y finalmente se extendieron en placas en tres pocillos de réplica a diferentes concentraciones (1 x 10⁵, 1 x 10⁴, 1 x 10³, 1 x 10², 10 y 1 células). Además, 5 x 10⁴ a 1 x 10⁵ de células CD45⁺ enriquecidas (i) procedentes de sangre y de la médula ósea de pacientes de cáncer de colon y de mama, respectivamente, (ii) procedentes de la leche de mujeres lactantes sanas (células mamarias primarias normales) o (iii) procedentes de tejidos de colon normal y tumoral, se sembraron en diferentes pocillos de las placas. Después de 24-48 h del cultivo de las células a 37°C en 5% de CO₂, las células se retiraron mediante lavado seis veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,2% y tres veces con PBS solo, después se añadieron el mAb Ks19.2 anti-CK19 conjugado con Alexa⁴⁸⁸ (3 µg/mL) (Progen Biotechnik GMBH) y/o el mAb AE1 anti-CK 19 conjugado con Alexa⁵⁵⁵ (3 µg/mL)
55 (Chemicon International, Temecula, CA, EE.UU.) (100 µl/pocillo) y las placas se incubaron durante una noche a

4°C. Las manchas verdes fluorescente y rojas fluorescente representaban células secretoras de CYFRA 21-1 y la proteína CK 19 de longitud completa intacta, respectivamente. Las inmunotransferencias se recontaron mediante imágenes de videocámara y análisis asistido por ordenador (KS ELISPOT, Carl Zeiss Vision, Halbermoos, Alemania). Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado. Se efectuó un control de calidad bajo condiciones del ensayo EPISPOT estandarizado, incluyendo en cada experimento un control positivo (5 x 10² células MCF-7 por triplicado) y tres controles negativos (pocillos sin células y pocillos sin la adición de los mAbs de revestimiento o los mAbs secundarios).

Para el ensayo CK 19/MUCI-EPISPOT fluorescente dual, membranas de placas de 96 pocillos se revistieron durante una noche a 4°C con una mezcla del mAb Ks19.1 anti-CK19 (6 µg/mL) y el mAb 115D8 anti-MUCI (5 µg/mL) (Centocor, Malvern, PA). La etapa de revelación se realizó con una mezcla del mAb Ks19.2 anti-CK19 conjugado con Alexa⁴⁸⁸ (3 µg/mL) y el mAb DF3 anti-MUCI (1/3000) (Centocor) (100 µl/pocillo) y las placas se incubaron durante una noche a 4°C.

El marcaje de la totalidad de los mAbs monoclonales utilizados en este estudio se realizó utilizando el kit de marcaje de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor⁴⁸⁸ o Alexa Fluor⁵⁵⁵ (Molecular Probes, Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Experimentos de citometría de flujo. El porcentaje de líneas celulares CK19-positivas se determinó mediante citometría de flujo (aparato FC 500; Beckman-Coulter, Villepinte, Francia). La tinción intra-citoplásmica de CK-19 se realizó utilizando el mAb Ks 19.2 anti-CK19 humano monoclonal conjugado con Alexa⁴⁸⁸ o Alexa⁵⁵⁵ (Progen, Biotechnik GMBH), y el kit de reactivos de permeabilización IntraPrepTM de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (BeckmanCoulter).

Preparación de citospina y doble tinción inmunocitoquímica. Todas las líneas celulares (líneas celulares de cáncer de mama, próstata, tiroides y colorrectal) se inmunotñeron con el mAb anti-CYFRA 21-1 conjugado con Alexa⁴⁸⁸ según se describe antes para los experimentos de citometría de flujo. Después de esta etapa, las células se sembraron sobre portaobjetos de vidrio utilizando una centrífuga Cytospin 4 (Shandon, Runcorn, Inglaterra). Finalmente, los portaobjetos se montaron en reactivo anti-decoloración ProLong Gold con DAPI (Molecular Probes) y se analizaron mediante imágenes de videocámara y análisis asistido por ordenador (Axio Imager M1 con el software AxioVision, Carl Zeiss Vision, Halbermoos, Alemania).

Para algunos experimentos, células MCF-7 se incubaron con o sin vincristina 20 µM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Las células se recuperaron al cabo de 5, 16, 24, 36 y 48 horas y se realizó una inmunotinción dual utilizando (i) la fluoresceína M30 CytoDEATHTM (Peviva, Bromma, Suecia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y luego (ii) el mAb Ks19.2 anti-CYFRA 21-1 conjugado con Alexa⁵⁵⁵ descrito anteriormente. Células rojas y verdes, correspondientes a la tinción con CYFRA 21-1 y a la tinción con M30 CytoDEATH, respectivamente, se analizaron mediante microscopía. Cada compartimiento nuclear se tiñó en azul con DAPI.

Para otros experimentos, se realizó una inmunotinción doble en células MCF-7 utilizando el mAb Ks19.2 anti-CYFRA 21-1 conjugado con Alexa⁴⁸⁸ y el mAb DF3 anti-MUCI conjugado con Alexa⁵⁵⁵. Las células verdes y rojas correspondían a la tinción con CYFRA 21-1 y a la tinción con MUC1 para células de mama, respectivamente. Cada uno de los compartimientos nucleares se tiñó en azul con DAPI.

Transferencia Western. Para detectar la presencia de CK19 en líneas celulares, células de un matraz de 75 cm² se lisaron en 5 mL de tampón de lisis Triton-DOC durante 5 min. Después de centrifugación durante 1 min a 10.000 rpm, el sobrenadante se recogió y analizó mediante transferencia Western. Después, las muestras se mezclaron con un volumen igual de tampón 2 x Laemmli, se hirvieron durante 5 min y luego se cargaron en un gel de poliacrilamida al 12%. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas Immobilon y CK19 se detectó utilizando el anticuerpo anti-CK19 Ks19.2 Alexa⁴⁸⁸. La membrana Immobilon se escaneó con Phosphorimageur (Typhoon).

Preparación de las muestras de proteínas para el análisis con espectrometría de masas. Células MCF-7, PC3 y C643 se cultivaron en medio exento de FCS y se testaron con el ensayo ELISPOT para confirmar que se seguía pudiendo detectar CK19 de longitud completa. Como control negativo se utilizó medio sin FCS. Cinco mL de cada uno de los sobrenadantes del cultivo celular se concentraron utilizando unidades de filtro centrífugo de corte de 5 kDa (Millipore, Amsterdam, Holanda). Los sobrenadantes concentrados se diluyeron con bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8) en un volumen total de 50 µL y se digirieron con 1 µg de tripsina a 37°C durante 15 h. Proteínas hidrófobas fijadas a la unidad de filtro centrífugo se digirieron con 1 µg de tripsina en 50 µL de acetonitrilo al 10% (v/v) en bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8) a 37°C durante 4 h. Las muestras se liberaron de sales utilizando puntas STAGE (Rappsilber, J., al. 2003. *Anal Chem* 75:663-670).

Análisis por LC-MS/MS e identificación de proteínas. Se realizó un LC-MS/MS a nanoescala acoplado un sistema LC de la serie Agilent 1100 a un espectrómetro de masas con trampa cuadrupol del ion LTQ XL™ (Finnigan, San Jose, CA). Mezclas de péptidos se concentraron y desalaron utilizando una columna de trampa en línea C18 (DO 375 µm, DI 100 µm, empaquetada con 20 mm de partículas AQUA C18, RP de 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA)) y la separación ulterior se consiguió mediante elución por gradiente de péptidos sobre una columna de fase inversa C18 (DO 375 µm, DI 50 µm, empaquetada con 15 cm de partículas C18, Reprosil RP de 3 µm (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Alemania)). La detección por MS en el LTQ se consiguió rociando directamente el eluyente de la columna en la fuente de ionización por electroproyección del espectrómetro de masas a través de un emisor de ionización de nano-electroproyección conectado en un extremo (New Objective, Woburn, MA). Tampones de fase móvil eran A: ácido acético 0,1 M, y B: acetonitrilo al 80%, ácido acético 0,1 M. Se aplicó un gradiente lineal durante 30 min (0-50% de B) para la elución de los péptidos en el MS a un caudal final de 100 nl/min. El tiempo de análisis total era de 1 h por cada muestra. El LTQ se hizo funcionar en el modo de ion positivo y los péptidos se fragmentaron de un modo dependiente de los datos. Una exploración por zoom de supervivencia en la espectrometría de masas fue seguida por tres exploraciones MS/MS dependientes de los datos.

Para identificar las proteínas, la totalidad de los espectros de cada una de las tandas de LC-MS se fusionaron en un único expediente que se investigó utilizando la máquina de búsqueda Mascot (Matrix Science) frente a la base de datos de proteínas NCBI-nr humana con carbamidometil-cisteína como modificación fija, y metionina oxidada como modificación variable. Tripsina se especificó como la enzima proteolítica, y se permitió un máximo de una escisión perdida. La tolerancia de masa del péptido se estableció en 0,5 Da, y la tolerancia de MS/MS en 0,9 Da.

Resultados

Enumeración de células liberadoras de CYFRA 21-1. Un fragmento soluble de CK19, denominado CYFRA 21-1 se puede medir utilizando dos anticuerpos anti-CK19 monoclonales de ratón, los clones Ks19.1 (que reconoce los aminoácidos desde 311 a 335) y Ks19.2 (que reconoce los aminoácidos desde 346 a 368) (Fig. 1). Los anticuerpos Ks19.1 y Ks19.2 y diferentes líneas celulares cancerígenas (líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y colorrectal HT-29, HCT116, Caco-2) se utilizaron para optimizar un ensayo CYFRA 21-1^(Alexa488)-EPISPOT. En total, 21,5% (intervalo 19,8-25), 88,2% (intervalo 73-100), 55,6% (intervalo 40-67,5) y 17% (intervalo 11,4-23) de células HT-29, HCT 116, Caco-2 y MCF-7, respectivamente, liberaron CYFRA 21-1 después de 24 horas de cultivo celular (n = 4). Para determinar la sensibilidad de este ensayo EPISPOT, se testaron diluciones en serie de las líneas celulares HT-29, HCT 116, Caco-2 y MCF-7 [1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10 y 1 células por pocillo]. En paralelo, CYFRA 21-1 se midió mediante un ensayo inmunométrico en los correspondientes sobrenadantes (Tabla 1). Cuando se sembraron 1×10^4 células HT-29, HCT 116, Caco-2 y MCF-7 por pocillo, los puntos eran tan numerosos que no podían ser contados por el lector automatizado, sino que $21,9 \pm 12,9$, $24,3 \pm 9,8$, $163,3 \pm 63,4$ y $156,2 \pm 10,8$ ng/mL de CYFRA 21-1 se cuantificaron en sobrenadantes del cultivo, respectivamente. A una concentración de 10 de células HT-29, HCT 116, Caco-2 y MCF-7 por pocillo, se contaron $2,0 \pm 0,0$, $7,3 \pm 1,8$, $5,5 \pm 0,5$ y $2,0 \pm 0,7$ puntos de células liberadoras (RC – siglas en inglés) de CYFRA 21-1, mientras que CYFRA 21-1 liberada no se detectó en los correspondientes sobrenadantes del cultivo. Estos datos demuestran que la sensibilidad del ensayo CYFRA 21-1-EPISPOT es dos órdenes de magnitud mayor en comparación con la cuantificación de estas proteínas en los sobrenadantes exentos de células. Considerados conjuntamente, estos resultados indican que el ensayo CYFRA 21-1-EPISPOT permitía la enumeración de un número muy pequeño de RC de CYFRA 21-1.

Además, se realizaron experimentos con células de próstata (LNCaP), escamosas de cabeza y cuello (UM-SCC-22A, UM-SCC-14C) y de tiroides (ML-1, C643) que no expresan la CK19 y, por consiguiente, no se observaron RC de CYFRA 21-1. La expresión de CK19 se midió en estas líneas celulares mediante citometría de flujo, inmunocitoquímica (ICC) y experimentos de transferencia Western (WB – siglas en inglés). También se estudio la línea celular de próstata PC3. Estas células expresaban débilmente la CK19 tal como se muestra por la citometría de flujo, la ICC y los experimentos de WB, pero no se observó liberación alguna de CK19 por parte de células PC3 según se demuestra por el ensayo CYFRA 21-1-EPISPOT y el ensayo inmunométrico CYFRA 21-1. Excepto las líneas celulares de cáncer de próstata, tiroides y escamosas de cabeza y cuello, todas las otras células cancerígenas epiteliales testadas (células de tumores de mama y colon) liberaban CYFRA 21-1 en sus sobrenadantes tal como se demuestra por la medida de esta proteína en los sobrenadantes exentos de células.

Enumeración de células que liberan la proteína CK19 de longitud completa intacta. Varios grupos expusieron la hipótesis de que la liberación de CYFRA 21-1 se produce cuando CK19 es escindida por caspasa 3 durante la apoptosis (Dohmoto, K., et al. 2001, *Int J Cancer* 91:468-473; Wu, F., et al. 2002, *Int J Oncol* 21:441-445). Para demostrar que la proteína detectada era la proteína CK19 de longitud completa y esencialmente intacta y no su fragmento soluble, se desarrolló un ensayo

CK19^(Alexa 555)-EPISPOT en paralelo del ensayo CYFRA 21-1^(Alexa 488)-EPISPOT. Para el ensayo de CK19 de longitud completa, se utilizaron las mismas líneas celulares que las citadas anteriormente, así como el mismo anticuerpo Ks19.1 anti-CK19 de revestimiento que reconoce un epítipo en el fragmento CYFRA 21-1 de la CK19 (reconociendo los aminoácidos desde 311 a 335) (Figura 1). Para la etapa de revelación de este ensayo CK19-EPISPOT se utilizó otro anticuerpo, AE1, que reconoce la CK19 en un epítipo diferente, localizado en el lado 5' del lado de corte de la caspasa 3 (reconoce los aminoácidos desde 145 a 227) (Figura 1). Se detectaron porcentajes similares de RC de CK19 en comparación con los observados con el ensayo CYFRA 21-1-EPISPOT. Se utilizó un ensayo dual fluorescente CYFRA 21-1^(Alexa 488)/CK19^(Alexa 555)-EPISPOT, permitiendo la enumeración de células que liberaban una o las dos proteínas: el fragmento soluble CYFRA 21-1 y/o la proteína CK19 de longitud completa. Este ensayo EPISPOT fluorescente dual demostraba claramente que sólo se observaron inmunotransferencias dual^(amarillo), confirmando que las inmunotransferencias son las huellas de células que liberan sólo una proteína: la proteína CK19 intacta de longitud completa, detectada tanto por los Abs anti-CK19 (AE1^(Alexa 555)), específico de la proteína CK19 de longitud completa y Ks19.2^(Alexa 488), localizado en el fragmento CYFRA 21-1 de la proteína CK19.

Enumeración de células viables. Según se describe arriba, se ha informado que la CK19 fue liberada por parte de células apoptóticas o necróticas. Se realizaron experimentos con cicloheximida, un inhibidor de la traducción de proteínas, en cultivos celulares durante la etapa de incubación del ensayo CK19-EPISPOT. La adición de cicloheximida condujo a una disminución en el tamaño y en el número de puntos, confirmando la síntesis *de novo* de la proteína CK19 por parte de células epiteliales viables.

Además de ello, experimentos con células PC3 demostraron la expresión, pero nunca la liberación de CK19. Estos experimentos demostraron que las células eran viables y que no se habrían detectado inmunotransferencias de CK19 apoptótica, incluso para estas células que expresan pero que no liberan CK19.

Enumeración de células viables que liberan simultáneamente MUC1 y CK19. Además, dado que células MCF-7 viables ya fueron demostradas como células liberadoras de MUC1 (Alix-Panabières, C., et al., 2005, *J Immunol Methods* 299:176-188), se optimizó un ensayo MUC1^(Alexa 555)/CK19^(Alexa 488)-EPISPOT dual fluorescente para verificar si estas células eran capaces de liberar a las dos proteínas simultáneamente. Una mayoría de las inmunotransferencias obtenidas después de 24 horas de cultivo celular observadas tenían una tinción amarilla, resultando en una mezcla equivalente de las proteínas MUC1 y CK19 liberadas y confirmando que estas RC eran células viables, capaces de sintetizar de nuevo *in vitro* MUC1 y CK19.

Localización intracelular de CK19 en células no apoptóticas. La expresión de CK19 se investigó mediante experimentos de ICC en diferentes líneas celulares. Células LNCap no se inmunotñeron para CK19, mientras que MCF-7 expresaba la proteína CK19. Incluso después de una incubación de las células con vincristina, un inductor de la apoptosis, algunas de las células MCF-7 seguían siendo viables y mostraban una inmunotinción para CK19 en vesículas intra-citoplásmicas sin tinción con el anticuerpo M30 CytoDEATH[™] que reconoce un neo-epítipo formado después de la escisión con caspasa de citoqueratina 18 en Asp396 (neo-epítipo CK18Asp396-NE M30) (Leers, M.P., et al. 1999, *J Pathol* 187:567-572) durante y después de la apoptosis. Dado que M30 CytoDEATH[™] no une CK18 nativa de células normales, es una herramienta muy fiable y conveniente para demostrar la apoptosis en células sencillas. En experimentos adicionales, se demostró que células MCF-7 viables tenían vesículas de CK19 con una expresión periférica de MUC1 en la membrana celular, confirmando los resultados obtenidos con el ensayo MUC1^(Alexa 555)/CK19^(Alexa 488)-EPISPOT dual fluorescente.

Liberación de CK19 por parte de células primarias mamarias. El aislamiento de células no hematopoyéticas purificadas a partir de muestras de sangre tratadas con EDTA se adaptó a muestras de leche de mama. Células mamarias normales se purificaron a partir de células de la leche de mama (BMC) de tres mujeres lactantes sanas y luego se analizaron mediante citometría de flujo y ensayo EPISPOT. Tal como se ha descrito previamente, las células CD45-negativas es la población principal en la BMC (media = 93,5%, intervalo 88,5-97,9) (Petitjean, G., et al., 2007, *J Clin Virol* 39:1-8). Se encontró que más del 72,4% de estas células expresaban el marcador de la membrana EpCAM y se definían como células epiteliales mamarias. Cuando se analizaron 550.000 células CD45-negativas mediante el ensayo CK19-EPISPOT, se detectaron 320 RC de CK19 (0,06%), demostrando que un pequeño subconjunto de estas células mamarias normales eran viables al liberar la proteína CK19 de longitud completa.

Liberación de CK19 por parte de células normales y cancerígenas a partir de tejido de colon. Células extraídas de la mucosa tumoral y de la mucosa normal de tres pacientes con un cáncer colorrectal liberaron CK19 según se observa con los experimentos de ensayo CK19-EPISPOT (datos no mostrados).

Detección de RC de CK19 añadidas a sangre procedente de donantes sanos. Cuando el ensayo EPISPOT se

realizó en células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) procedentes de 14 donantes sanos, no se detectaron células que liberaran CK19. Tal como se describe previamente para células cancerígenas de mama y de próstata (Alix-Panabieres, C., et al., 2005, *Clin Chem* 51:1538-1541) cuando 100 y 10 células HT-29 se dispersaban en 10 ml de sangre humana normal y desprovista de células hematopoyéticas, la eficacia para la recuperación de células HT-29 liberadoras de CK19 dispersadas en la sangre control era de 41,9% y 88,2%, respectivamente. La combinación del proceso de preparación de células y el ensayo CK19-EPISPOT se encontró que era más eficaz para las bajas densidades de células HT-29.

Liberación de CK19 por parte de CTC/DTC en pacientes de cáncer de colon. Células no hematopoyéticas se aislaron de muestras de sangre recogidas en tubos de EDTA (15 ml), y se realizó el ensayo CK19-EPISPOT sencillo fluorescente según se describe arriba. RC de CK19 se detectaron en la sangre periférica del 40% de los pacientes con cáncer de colon metastásico (n = 10) y el 15,3% de los pacientes con cáncer de colon localizado (n = 13) mientras que no se encontraron células de este tipo en la sangre de pacientes con una enfermedad de colon benigna (n =11) ni en HC (n = 14). Entre las muestras positivas, la frecuencia mediana de RC era de 3 (intervalo 1-6) y de 2 (intervalo 1-3) para pacientes de cáncer de colon metastásico y localizado, respectivamente. El hallazgo de que RC de CK19 estaban presentes en pacientes con un cáncer de colon metastásico o localizado y no en pacientes con una enfermedad de colon benigna ni en controles sanos sugiere que estas células son células tumorales circulantes viables liberadas a partir del tumor primario.

Resultados en muestras procedentes de pacientes de cáncer de mama

En las Tablas 1A y 1B se muestran los resultados del ensayo CK19-ELISPOT en muestras de pacientes de cáncer de mama (5 ml de la médula ósea). La enumeración de SC de CK19 permitió la detección de células tumorales diseminadas en un 70% y 45,9% de pacientes M1 y M0, respectivamente. Además de ello, el número de células tumorales diseminadas por muestra era considerablemente menor en los pacientes M0 en comparación con los pacientes M1. En contraposición, no se detectó CK19-SC en la médula ósea del grupo control (pacientes con linfoma), sugiriendo fuertemente que SC de CK19 en los pacientes con cáncer de mama representaban probablemente células derivadas del tumor primario y son las células tumorales diseminadas, como ya se ha señalado (Allard *et al.*, 2004, *Clin Cancer Res* 10:6897-6904).

Con estos pacientes de cáncer de mama se realizaron análisis de Kaplan-Meier, investigados durante una media de 6 años (Fig. 3). Las curvas de supervivencia mostraban una diferencia significativa entre los pacientes de cáncer de mama con y sin SC de CK19 en su médula ósea ($p = 0,025$, test de rango logarítmico). Estos resultados demuestran que SC de CK19 es un subconjunto importante y biológico activo de células tumorales diseminadas.

Tabla 1A. Ensayo CK19-ELISPOT en muestras de médula ósea de 20 pacientes con cáncer de mama metastásico (pacientes M1)

Pacientes- M1	CK19 ⁺ -SC ¹
1	1
2	6
3	0
4	49
5	57
6	271
7	102
8	168
9	0
10	0
11	0
12	8
13	768
14	9
15	19
16	0
17	142
18	0
19	2
20	1
Total en DTC²	1593

SC¹: Células secretoras

DTC²: Células tumorales diseminadas

5 **Tabla 1B.** Ensayo CK19-ELISPOT en muestras de médula ósea de 37 pacientes con cáncer de mama localizado (pacientes M0) **(a)** y de 10 pacientes con un linfoma, el grupo control **(b)**.

a.

	Pacientes-M0	CK19⁺-SC¹
10	21	254
	22	1
	23	92
	24	0
	25	0
	26	159
15	27	0
	28	0
	29	0
	30	0
	31	3
20	32	1
	33	0
	34	0
	35	0
	36	0
25	37	0
	38	0
	39	2
	40	0
	41	1
30	42	0
	43	28
	44	2
	45	11
	46	23
35	47	6
	48	1
	49	0
	50	7
	51	0
40	52	0
	53	0
	54	6
	55	0
	56	2
45	57	0
	Total en DTC²	599

b.

50	Grupo control (n=10)	0
----	-----------------------------	----------

SC¹: Células secretoras

DTC²: Células tumorales diseminadas

55 *Detección de la CK19 de longitud completa con espectrometría de masas en tándem.* La secreción de la proteína CK19 de longitud completa (400 aminoácidos; FIGS 2A y 2B, SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 15) por parte de células MCF-7, PC3 y C643 se investigó también con la secuenciación de péptidos utilizando la espectrometría de masas en tándem por cromatografía líquida en fase inversa a nanoescala (análisis LC MS/MS). La proteína CK19 sólo se identificó en la muestra de sobrenadante exenta de células MCF-7, y no en las muestras de sobrenadante exentas de células PC3 y C643. La CK19 solamente se detectó en un bajo nivel en la citometría de flujo y los experimentos

60

de ICC, que pueden explicar la carencia de detección con el método LC MS/MS de menor sensibilidad. Como se puede ver por la Tabla 2, CK19 en el sobrenadante exento de células MCF-7 se detectó con péptidos que oscilaban desde el aminoácido 254 al 381. Esto puede referirse a CK19 intacta, así como al producto CYFRA 21-1 (Figura 8A), ya que CYFRA 21-1 comparte los residuos 238-400 con CK19. A la inversa, no se detectó el péptido del fragmento tríptico 'DSAPGTDLAK' (SEQ. ID. NO: 3) que aparecería si la proteína identificada fuese CYFRA 21-1, lo que sugiere que sólo estuviera presente en la muestra la proteína CK19 entera. Es sabido que la CK19 intacta es más bien insoluble; por lo tanto, también se analizó con espectrometría de masas la fracción que contenía las proteínas hidrófobas. En esta última fracción, se detectaron péptidos que oscilaban desde los aminoácidos 8 a 398 de CK19, lo que demostraba que CK19 de longitud completa estaba presente en el sobrenadante exento de células (FIG. 2, Tabla 2). De manera importante se detectó el péptido 'GQVGGQVSVEVDSAPGTDLAK' (aminoácidos 227-247) (SEQ. ID. NO: 2) y se secuenció parcialmente con LC MS/MS (FIG. 2B, SEQ. ID. NO: 15), que únicamente puede emerger de la proteína CK19 entera.

Tabla 2. Péptidos de CK19 detectados con la espectrometría de masas en tándem

Sobrenadante de la muestra exenta de células	Péptidos de CK19 detectados con la espectrometría de masas en tándem	
	Fracción 1 ^A	
MCF-7	SQYEVMAEQNR (254-264) ^C DAEAWFTSR (266-274) ^C SEVTDLRR (294-301) ^C LEQEIATYR (373-381) ^C	SEQ. ID. NO: 4 SEQ. ID. NO: 5 SEQ. ID. NO: 6 SEQ. ID. NO: 7
C643	nd ^D	
PC3	nd ^D	
Medio de cultivo	nd ^D	
	Fracción 2 ^A	
MCF-7	QSSATSSFGGLGGGSVR (8-24) ^C LTMQNLNDR (82-90) ^C IVLQIDNAR (151-159) ^C GQVGGQVSVEVDSAPGTDLAK (227-247) ^C SQYEVMAEQNR (254-264) ^C EVAGHTEQLQMSR (281-293) ^C LEQEIATYR (373-381) ^C SLLEGQEDHYNNLSASK (382-398) ^C	SEQ. ID. NO: 8 SEQ. ID. NO: 9 SEQ. ID. NO: 10 SEQ. ID. NO: 2 SEQ. ID. NO: 11 SEQ. ID. NO: 12 SEQ. ID. NO: 13 SEQ. ID. NO: 14
C643	nd ^D	
PC3	nd ^D	
Medio de cultivo	nd ^D	

15

^A La Fracción 1 contiene las proteínas solubles

^B La Fracción 2 contiene las proteínas hidrófobas

^C Los números de aminoácidos se refieren a la secuencia de CK19 de longitud completa

^D Los péptidos de CK19 no se detectaron con la espectrometría de masas en tándem

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Alix-Panabières, Catherine
Vendrell, Jean-Pierre
Pantel, Klaus
- <120> CITOQUERATINAS LIBERADAS EN CALIDAD DE MARCADORES PARA CÉLULAS EPITELIALES
- 5 <130> 12103-12
- <150> US 60/842,902
- <151> 07-09-2006
- <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Ser Tyr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Ala Thr Ser Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Gly Gly Ser Val Arg Phe Gly Pro Gly Val Ala Phe Arg
 20 25 30

Ala Pro Ser Ile His Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Ser
 35 40 45

Ser Ala Arg Phe Val Ser Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Gly
 50 55 60

Tyr Gly Gly Val Leu Thr Ala Ser Asp Gly Leu Leu Ala Gly Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Met Gln Asn Leu Asn Asp Arg Leu Ala Ser Tyr Leu Asp
 85 90 95

10

ES 2 375 453 T3

Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val Lys Ile
100 105 110

Arg Asp Trp Tyr Gln Lys Gln Gly Pro Gly Pro Ser Arg Asp Tyr Ser
115 120 125

His Tyr Tyr Thr Thr Ile Gln Asp Leu Arg Asp Lys Ile Leu Gly Ala
130 135 140

Thr Ile Glu Asn Ser Arg Ile Val Leu Gln Ile Asp Asn Ala Arg Leu
145 150 155 160

Ala Ala Asp Asp Phe Arg Thr Lys Phe Glu Thr Glu Gln Ala Leu Arg
165 170 175

Met Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Glu
180 185 190

Leu Thr Leu Ala Arg Thr Asp Leu Glu Met Gln Ile Glu Gly Leu Lys
195 200 205

Glu Glu Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Asn His Glu Glu Glu Ile Ser Thr
210 215 220

Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Gln Val Ser Val Glu Val Asp Ser Ala
225 230 235 240

Pro Gly Thr Asp Leu Ala Lys Ile Leu Ser Asp Met Arg Ser Gln Tyr
245 250 255

Glu Val Met Ala Glu Gln Asn Arg Lys Asp Ala Glu Ala Trp Phe Thr
260 265 270

Ser Arg Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Gly His Thr Glu Gln
275 280 285

ES 2 375 453 T3

Leu Gln Met Ser Arg Ser Glu Val Thr Asp Leu Arg Arg Thr Leu Gln
290 295 300

Gly Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala Ala Leu
305 310 315 320

Glu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Phe Gly Ala Gln Leu Ala
325 330 335

His Ile Gln Ala Leu Ile Ser Gly Ile Glu Ala Gln Leu Ala Asp Val
340 345 350

Arg Ala Asp Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp
355 360 365

Ile Lys Ser Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Ser Leu Leu
370 375 380

Gly Gly Gln Glu Asp His Tyr Asn Asn Leu Ser Ala Ser Lys Val Leu
385 390 395 400

<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Gln Val Gly Gly Gln Val Ser Val Glu Val Asp Ser Ala Pro Gly
1 5 10 15

Thr Asp Leu Ala Lys
20

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ser Ala Pro Gly Thr Asp Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Gln Tyr Glu Val Met Ala Glu Gln Asn Arg
1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Glu Ala Trp Phe Thr Ser Arg
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Glu Val Thr Asp Leu Arg Arg
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Ser Ser Ala Thr Ser Ser Phe Gly Gly Leu Gly Gly Gly Ser Val
1 5 10 15
Arg

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Thr Met Gln Asn Leu Asn Asp Arg
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Val Leu Gln Ile Asp Asn Ala Arg
1 5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Gln Tyr Glu Val Met Ala Glu Gln Asn Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Val Ala Gly His Thr Glu Gln Leu Gln Met Ser Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Leu Leu Glu Gly Gln Glu Asp His Tyr Asn Asn Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Lys

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Val Ser Val Glu Val Asp Ser Ala
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para detectar células epiteliales diseminadas viables en una muestra que comprende células procedentes de un paciente normalmente no asociadas con células epiteliales, comprendiendo el método:
- 10 cultivar las células en dicha muestra durante un tiempo suficiente para que un marcador específico para la célula epitelial sea liberado a partir de las células, comprendiendo el marcador una citoqueratina esencialmente de longitud completa;
detectar el marcador liberado;
en el que la detección del marcador indica la presencia de células epiteliales diseminadas.
- 15 2.- El método de la reivindicación 1, en el que la muestra se deriva de sangre, médula ósea o nódulos linfáticos.
- 3.- El método de la reivindicación 1, en el que la muestra está desprovista de células CD-45⁺.
- 20 4.- El método de la reivindicación 1, en el que el marcador comprende una citoqueratina 19 esencialmente de longitud completa.
- 5.- El método de la reivindicación 4, en el que el marcador comprende una secuencia que es al menos 90% idéntica a un polipéptido de longitud completa de SEQ. ID. NO: 1.
- 6.- El método de la reivindicación 1, en el que la detección del marcador liberado comprende unir el marcador liberado con un participante en la unión.
- 25 7.- El método de la reivindicación 6, en el que el participante en la unión comprende un anticuerpo.
- 8.- El método de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo reconoce un epítipo en el marcador 5' con respecto al sitio de escisión enzimática en el marcador.
- 30 9.- El método de la reivindicación 1, en el que la detección del marcador liberado comprende utilizar espectrometría de masas.
- 10.- El método de la reivindicación 9, en el que la secuencia del marcador liberado detectado mediante espectrometría de masas comprende una secuencia de polipéptidos esencialmente idéntica a SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 8, SEQ. ID. NO: 9, SEQ. ID. NO: 10 o SEQ. ID. NO: 15.
- 35 11.- El método de la reivindicación 1, comprendiendo el método:
- 40 cultivar las células durante un tiempo suficiente para que el marcador epitelial sea liberado a partir de las células, comprendiendo el marcador un polipéptido esencialmente de longitud completa que contiene un sitio de escisión enzimática dentro del polipéptido de citoqueratina de longitud completa;
detectar una porción del polipéptido de longitud completa a partir liberado de las células, encontrándose la porción en posición 5' con respecto al sitio de escisión enzimática;
en el que la detección de la porción 5' identifica al polipéptido de longitud completa, y
45 en el que la porción 5' comprende una secuencia de polipéptidos esencialmente idéntica a SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 8, SEQ. ID. NO: 9, SEQ. ID. NO: 10 o SEQ. ID. NO: 15.
- 12.- El método de la reivindicación 11, en el que la porción 5' se detecta utilizando un anticuerpo o utilizando espectrometría de masas.
- 50 13.- El método de la reivindicación 11, en el que el polipéptido esencialmente de longitud completa comprende citoqueratina 19.
- 14.- El método de la reivindicación 11, en el que la identificación del marcador de longitud completa en una muestra normalmente no asociada con células epiteliales indica la presencia de una célula de un tumor epitelial diseminado.
- 55 15.- El método de la reivindicación 1, en el que las células se aíslan a partir de tejido de mama.

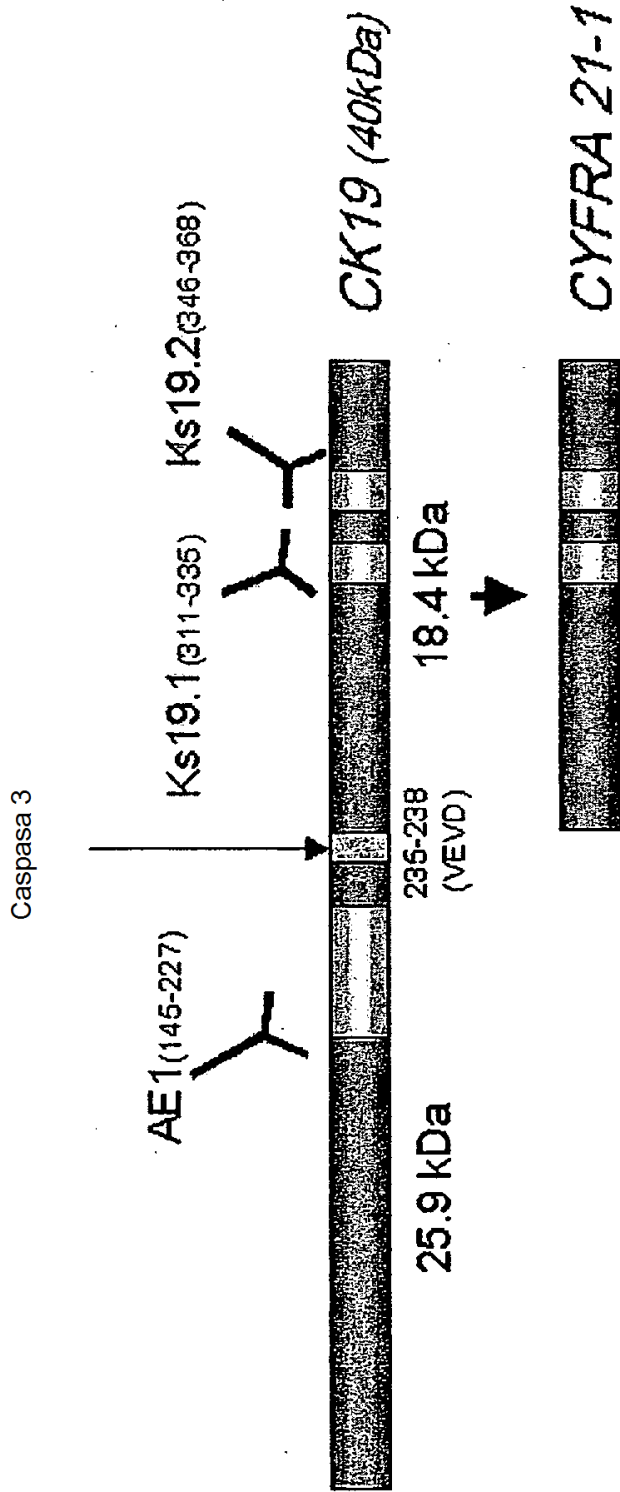


FIG. 1

FIG. 2A

1 MTSYSYRQSS ATSSFGLGG GSVRFGPGVA FRAPSIHGS GGRGVSVSSA
 51 RVSSSSSSGG YGGYGGVLT ASDGLLAGNE KLTMQNLNDR LASYLDKVR
 101 LEAANGELEV KIRDWYQKQG PGPSRDYSHY YTTIQDLROK ILGATIENSR
 151 IVLQIDNARL AADDFRTKFE TEQALRMSVE ADINGLRRVL DELTLARTDL
 201 EMQIEGLKEE LAYLKKNHEE EISTLRQVG QVSVEVDSA PGTDLAKILS
 251 DMRSQYEVMA EQNRKDAEAW FTSRTEELNR EVAGHTEQLQ MSRSEVTDLR
 301 RTLQGLEIEL QSQLSMKAAL EDTLAETEAR FGAQLAHIQA LISGIEAQLA
 351 DVRADSERQN QEYORLMDIK SRLEQEIATY RSLLEGQEDH YNNLSASKVL

FIG. 2B

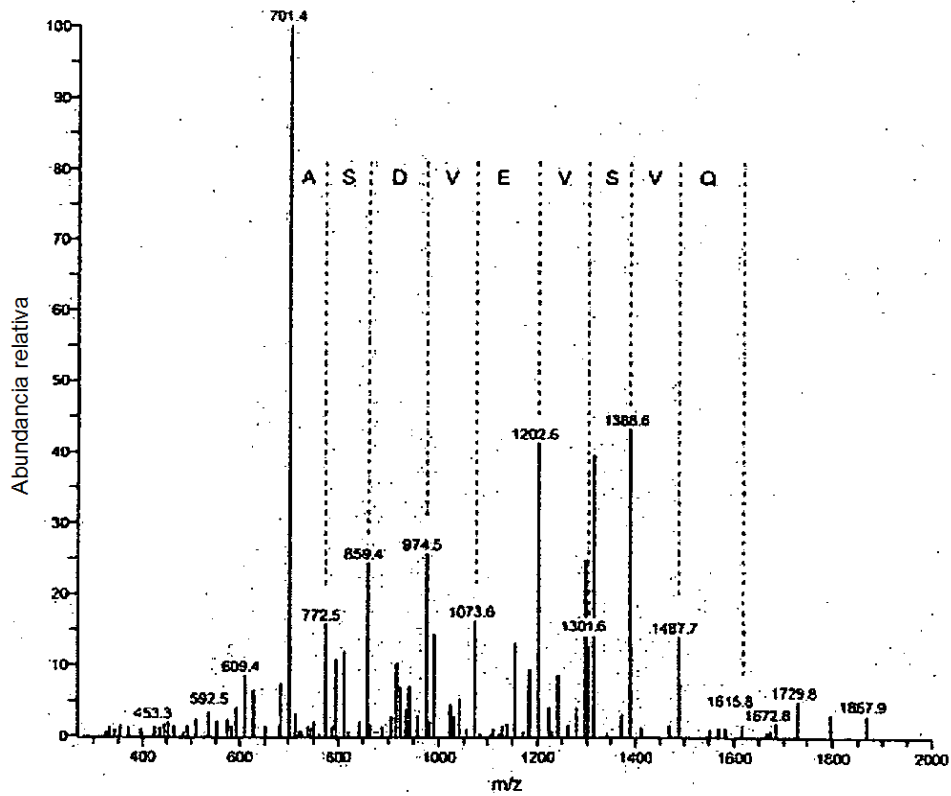


FIG. 3

