

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 963**

21 Número de solicitud: 201031698

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **18.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.06.2012

71 Solicitante/s:
**FUNDACION DE LA COMUNIDAD VALENCIANA
HOSPITAL GENERAL PARA LA INVESTIGACION
BIOMEDICA, DOCENCIA Y DESARROLLO DE
LAS CIENCIAS DE LA SALUD
Av. Tres Cruces, 2
46010 Valencia, ES**

72 Inventor/es:
MIÑANA GIMÉNEZ, María Dolores

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE NEOANGIOGÉNESIS TUMORAL**

57 Resumen:

Método para la detección de neoangiogénesis tumoral.

La presente invención se refiere a un método para la detección de neoangiogénesis tumoral. La presente invención también se refiere a un inmunoensayo para la detección de neoangiogénesis tumoral; así como a un kit para la detección de la neoangiogénesis tumoral y a la utilización del nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en una muestra de sangre aislada como biomarcador para la detección de la neoangiogénesis tumoral. En particular dicha neoangiogénesis tumoral está asociada con CRC.

ES 2 382 963 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de neoangiogénesis tumoral.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la detección de la neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con el cáncer colorrectal.

Antecedentes

10 La neoangiogénesis es necesaria para el crecimiento de tumores sólidos. Son muchas las evidencias que indican que, además del crecimiento por brotes, la angiogénesis tumoral está sustentada por la movilización y la incorporación de células progenitoras derivadas de la médula ósea. El estudio de las células progenitoras endoteliales (EPCs) ha generado un considerable interés y controversia ya que la contribución de las EPCs a la vasculatura tumoral varía considerablemente entre modelos de ratón y tipo de tumor. De este modo, se ha descrito una contribución significativa, aunque variable, de las EPCs a la vasculatura tumoral, variando desde aproximadamente un 90% en linfomas (1) a un 10% en el sarcoma de Ewing (2). Sin embargo, en otros modelos, las EPCs no contribuían al crecimiento tumoral (3), sólo se requerían en la fase tardía de los tumores (4) o inducían la angiogénesis indirectamente (5-7). También se ha investigado la implicación de las EPCs en la vascularización tumoral humana. De este modo, mediante hibridación in situ por fluorescencia con sondas específicas para los cromosomas sexuales, se observó que la contribución de las EPCs al endotelio tumoral variaba desde aproximadamente un 1% hasta un 12% (8). Por otro lado, se ha descrito que en ciertos cánceres los niveles de las EPCs están elevados (9) e incluso se han propuesto como biomarcadores de valor pronóstico y para evaluar los efectos de la terapia antiangiogénica (10-13).

25 Recientemente, se ha dirigido una mayor atención a las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea reclutadas al microentorno tumoral por factores angiogénicos. Estas células permanecen próximas a los nuevos vasos sanguíneos, contribuyendo al proceso angiogénico (14). Además, los macrófagos asociados al tumor están infiltrados en los tumores (15, 16) y en ratones, los monocitos que expresan Tie-2 se sitúan en los tumores, donde son requeridos para la angiogénesis (17, 18). Adicionalmente, se ha descrito que el reclutamiento de las células hematopoyéticas es necesario y suficiente para restaurar la angiogénesis tumoral (1, 19). Aunque la evidencia sustancial indica que la angiogénesis tumoral está sustentada por las células hematopoyéticas, existen pocos reportes en la literatura que apoyen el papel de estas células en tumores sólidos humanos.

30 El cáncer colorrectal (CRC), que incluye el cáncer de colon y el cáncer de recto, es responsable de medio millón de muertes anuales en el mundo. Existen aproximadamente un millón de nuevos casos diagnosticados anualmente, convirtiéndolo en el tercer cáncer más común en el mundo. La detección temprana, el diagnóstico preciso y la vigilancia intensiva son importantes para mejorar más el pronóstico del paciente y la respuesta a la terapia.

35 Existen una serie de métodos que los doctores utilizan para detectar el CRC que incluyen, la sigmoidoscopia, la colonoscopia y el enema de bario. Algunas técnicas más recientes que se están investigando para la detección eficaz y el seguimiento del paciente con CRC son la colonografía CT (colonografía tomográfica computerizada) y los biomarcadores moleculares.

40 Los marcadores tumorales se utilizan durante el tratamiento del cáncer a efectos de hacer un seguimiento de la eficacia de una terapia y de evaluar cómo el paciente puede estar respondiendo al tratamiento. Si disminuyen los niveles de un biomarcador tumoral, puede significar que el cáncer está respondiendo al tratamiento. Si los niveles permanecen igual o aumentan después del tratamiento puede ser una indicación de que la terapia no está funcionando. La monitorización continuada de los niveles de los biomarcadores tumorales después del tratamiento se puede utilizar para comprobar la reaparición del cáncer.

45 En la detección temprana o screening de pacientes de CRC, se utilizan ampliamente los marcadores en heces. Se han estudiado marcadores en tejidos como posibles marcadores de pronóstico o predictivos de la enfermedad, mientras que los biomarcadores de CRC en suero (sangre) se utilizan principalmente para la vigilancia postoperatoria de pacientes.

Marcadores tisulares

50 Los marcadores tisulares se han investigado como posibles marcadores de pronóstico y predictivos de respuesta a un tratamiento. De entre los genes candidatos como biomarcadores en CRC

cabe destacar el gen de la timidilato sintasa, el p53 y el proto-oncogen K-ras, entre otros. La timidilato sintasa (TS) es una enzima clave en la biosíntesis de pirimidinas, esencial para la síntesis de ADN. La actividad de la enzima TS es inhibida por el 5-fluorouracilo (5-FU) y se ha estudiado como un marcador predictivo de respuesta a la quimioterapia con 5-FU y 5-fluorodesoxiuridina (para una revisión adicional sobre TS, véase Popat S, Matakidou A, Houlston RS. *J Clin Oncol* 2004; 22:529-536; Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoué F et al. *Clin Cancer Res* 2004;10:5880-5888; Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J et al. *J Clin Oncol* 2001; 19:4298-4304). El gen p53 codifica para un factor de transcripción que se une a las secuencias reguladoras de un número de genes diana para iniciar la programación de la parada del ciclo celular y reparación del ADN. La pérdida de función de p53 es crítica en la tumorigénesis, siendo frecuentes las alteraciones en este gen en el CRC (para una revisión adicional sobre p53, véase Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F et al. *The Oncologist* 2010;15:390-404; Braun MS, Richman SD, Quirke P et al. *J Clin Oncol* 2008; 26:2690-2698).

El proto-oncogén K-ras se asocia a menudo con el cáncer, ya que se han hallado alteraciones en este gen en muchos tumores. Las vías de señalización mediadas por K-ras regulan la proliferación celular. Las mutaciones de K-ras están relacionadas con aproximadamente la mitad de todos los CRCs y se ha observado que son importantes en las etapas iniciales de la enfermedad. Ciertos estudios han identificado una asociación entre las mutaciones de K-ras y una mala evolución de la enfermedad en pacientes con CRC. Para más detalles sobre mutaciones de K-ras, véase Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D et al. *Cancer Res* 2006; 66:3992-3995; Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ et al. *N Engl J Med* 2008; 359:1757-1765.

Marcadores en heces

La prueba de sangre oculta en heces (FOBT) es la prueba de screening más utilizada habitualmente para el CRC. Existen dos tipos principales de FOBT, la prueba con guaiac y la prueba inmunológica. Ambas pruebas detectan proteínas que pueden ser indicadoras de CRC.

Las ventajas de la FOBT para el CRC son que las pruebas son simples y asequibles, no invasivas, requieren muy poca preparación del paciente y tienen la capacidad de examinar todo el tracto colorrectal. Sin embargo, presentan una especificidad y sensibilidad relativamente bajas tanto para los adenomas precancerosos como para el CRC.

Las pruebas de ADN fecal se utilizan en el screening de CRC y se basan en que el ADN es excretado por las células despreñidas de las lesiones cancerosas. Las pruebas utilizan normalmente un panel de marcadores de ADN con el fin de identificar genes mutados. Los marcadores de ADN pueden proporcionar una prueba más precisa que la FOBT y no existen restricciones en la dieta o la medicación. Sin embargo, la prueba es bastante laboriosa, cara y carece de especificidad. Algunos ejemplos de marcadores de ADN en heces incluyen K-ras, APC (adenomatous polyposis coli ó poliposis adenomatosa coli) y p53.

Marcadores séricos

Los marcadores séricos para el CRC se utilizan principalmente para el seguimiento de los pacientes después de la extirpación quirúrgica de tumores malignos. A los pacientes se les hace un seguimiento regular después de la intervención quirúrgica con el fin de detectar cualquier recidiva o metástasis. Como hasta un 50% de los pacientes desarrollan una enfermedad recurrente o metástasis después de la intervención quirúrgica, éste es un aspecto importante en el tratamiento del CRC. El CEA (antígeno carcinoembrionario) fue el primer marcador en suero utilizado en pacientes con CRC y aunque es el más antiguo, aún sigue siendo el más ampliamente utilizado. El CEA se utiliza principalmente para el seguimiento de los pacientes después de la intervención quirúrgica de un CRC primario. Una serie de estudios han demostrado que un seguimiento intensivo después de la resección del cáncer está asociado con una mejora en el resultado final si se tomaban mediciones regulares del CEA. Otros biomarcadores tumorales en suero utilizados para CRC incluyen CA-19-9, TPA (Antígeno polipéptido de tejido), TPS (Antígeno específico de polipéptido de tejido) y TIMP-1 (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) (Rhee JS, Diaz R, Korets L, Hodgson JG, Coussens LM. *Cancer Res* 2004; 64:952-961)

En el estado de la técnica existen diversos documentos que utilizan biomarcadores relacionados con el CRC.

Por ejemplo, en el documento de Hua Xue et al "Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach", *J Proteome Res* 2010; 9: 545-555, se describe la aplicación de la cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masa en tándem

(LC/MS/MS) para el análisis diferencial del secretoma de una línea celular primaria SW480 y la línea celular SW620 obtenida a partir del nódulo metastático del mismo paciente con CRC.

5 En el documento de Sudhir Srivastava et al. "Biomarkers for early detection of colon cancer", Clin Cancer Res 2001; 7:1118-1126, se describe que los principales avances en la comprensión del CRC incluyen la identificación e implicación de APC, p53 y Ki-ras en el desarrollo y progresión de la enfermedad, la identificación de focos crípticos aberrantes como una lesión preinvasiva inicial y su relación con el desarrollo del cáncer.

10 En el documento de DG Ward et al, "Identification of serum biomarkers for colon cancer by proteomic analysis", Br J Cancer 2006; 94: 1898-1905, se describen nuevos biomarcadores para la detección precoz del CRC. En particular, utilizaron la tecnología SELDI (Desorción-Ionización por láser de superficie) para investigar el proteoma sérico de 62 pacientes con CRC e identificaron proteínas (complemento C3a des-arg, α 1-antitripsina y transferrina) con potencial diagnóstico.

15 En el documento de Marielena Mata and Match Raponi "Circulating tumor cells: utility for predicting response to anti-EGFR therapies?", Expert Rev Mol Diagn 2009; 9(2): 115-19, se describe el desarrollo de una plataforma tecnológica para la captura de células tumorales circulantes en el marco clínico proporcionando así la posibilidad de caracterizar el tumor utilizando biopsias no invasivas en sangre periférica.

20 Una posible ventaja de la caracterización molecular de las células tumorales circulantes es que se puede utilizar para diseñar una medicina personalizada, ya que muchos tumores primarios, negativos para algunos marcadores, se vuelven positivos en el momento de la metástasis. La enumeración de las células tumorales circulantes ha demostrado ser útil como marcador pronóstico de los cánceres de mama, colorrectal y próstata. Sin embargo, se ha descrito que las células tumorales circulantes se detectaron en sólo el 40% de pacientes con CRC (Sastre J, Maestro ML, Puente J, et al. "Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables", Ann Oncol 2008; 19: 935-938).

25 En el documento EP 05772471, se describe un método para detectar el adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal basado en la determinación del nivel de C3a, utilizándose entonces como biomarcador. También se describe un método para discriminar entre adenoma colorrectal y carcinoma colorrectal, así como un método para el seguimiento de la evolución del adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal y/o el tratamiento del adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. También se describe un sistema de análisis y un "array" para su uso en estos métodos.

30 También debe mencionarse el uso de microARNs en suero que se utilizan actualmente como potenciales biomarcadores para CRC. Por ejemplo, Chajut A, Kundel Y, Levi A, et al. en el "Gastrointestinal Cancers Symposium 2009; categoría de colon y recto; subcategoría de prevención, diagnóstico y screening" propusieron los microARNs, una familia de pequeños ARNs reguladores no codificantes, implicados en el desarrollo humano y en la patología, como una clase emergente de marcadores en suero eficaces. Los autores demostraron que ciertos microARNs se hallan en diferentes cantidades en el suero de pacientes con CRC en comparación con controles sanos.

35 Según los párrafos anteriores, un primer objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para detectar neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con el CRC, que proporciona la siguiente lista de ventajas:

- 40
- a) Es un método no invasivo.
 - b) Sólo es necesaria una cantidad no superior a 8 ml de una muestra de sangre.
 - 45 c) No existe un riesgo asociado con la morbilidad/mortalidad (sucesos que ocurren en por ejemplo las colonoscopias)
 - d) Sería útil para evaluar el sistema hematopoyético durante la quimioterapia y/o radioterapia
 - e) No hay necesidad de determinar el nivel o concentración de moléculas o citoquinas en suero o plasma, ni el nivel de otras proteínas, aunque sí se considera apropiado se puede determinar, ya que el plasma obtenido se puede conservar congelado.
 - 50 f) No hay necesidad de determinar la cantidad de células tumorales circulantes, lo cual hace que el presente método sea más sencillo y disponible para todos los hospitales.

g) Modo sencillo de detección mediante citometría de flujo, disponible en todos los hospitales.

Un segundo objeto de la invención es proporcionar un inmunoensayo a utilizar en dicho método.

5 Un tercer objeto de la presente invención es proporcionar un kit para detectar neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con el CRC.

Un cuarto objeto de la presente invención es la utilización de diversos parámetros como biomarcadores para la detección de la neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con el CRC.

Descripción resumida de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para la detección de neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con el CRC, que comprende las etapas de:

- a) Proporcionar una muestra de sangre aislada de un individuo;
- b) Obtener células nucleadas de la muestra de sangre aislada;
- 15 c) Determinar el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en las células nucleadas de la muestra de sangre aislada;
- 20 d) Comparar la proporción entre el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes dividido por el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes con respecto al porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) determinados en c) con los valores obtenidos para individuos control o individuos sanos.

La presente invención también se refiere a un inmunoensayo para la detección de neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con CRC, en una muestra de sangre aislada de un individuo, que comprende:

- 25 a) un anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano que se une al antígeno de las células hematopoyéticas CD45⁺ circulantes;
- b) por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-humano que se une al antígeno de los monocitos CD14⁺ circulantes, al antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y al antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143), preferiblemente dicho por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-humano se selecciona del grupo de anticuerpos monoclonales anti-humanos que consisten en anti-CD34, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD31, anti-CD146, anti-CXCR4/CD184, anti-ACE/CD143, anti-CD133/2, anti-receptor de angiopoyetina Tie-2 y anti-VEGFR-2/KDR;
- 30 c) un recipiente para mezclar reactivos y células;
- d) por lo menos un reactivo para la detección de dicha unión entre anticuerpos y antígenos.

35 La presente invención se refiere además a un kit para la detección de la neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con CRC.

40 La presente invención se refiere adicionalmente a la utilización del nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en una muestra de sangre aislada como biomarcador para la detección de la neoangiogénesis tumoral, en particular asociada con CRC.

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1. Visión general esquemática del protocolo de citometría de flujo para la enumeración de las CPCs (células progenitoras circulantes). Se muestran las ventanas ("gates") usadas para seleccionar y analizar las células CD34⁺. Se muestran imágenes citométricas representativas en las que se observa la expresión de los antígenos CD31, CD133, CD184/CXCR4 y BB9/CD143 en las células CD34⁺ seleccionadas y sus correspondientes controles isotópicos. Las células en el "gate" R3 se utilizaron para analizar las dos subpoblaciones de células CD34⁺, las CD34⁺CD45⁻ y las CD34⁺CD45^{dim}. R1, R2, R3 y

R4 indican los “gates” de selección utilizados en el análisis. Se utilizó la 7-amino-actinomicina D (Sigma) para detectar y excluir las células no viables en el análisis.

5 Figura 2. Identificación de monocitos humanos y células endoteliales circulantes en sangre periférica. Se seleccionaron las MNCs (células mononucleadas) para identificar las subpoblaciones celulares CD45^{neg} y CD45⁺. Se utilizó la expresión de CD146 y CD31 en las células CD45^{neg} para identificar las CECs (células endoteliales circulantes). Las células CD45⁺ se seleccionaron para enumerar y analizar los monocitos CD14⁺. Se determinó la expresión de CD16 y Tie-2 en las células CD14⁺. Se muestran los correspondientes controles isotópicos.

10 Figura 3. Correlaciones entre células hematopoyéticas y parámetros angiogénicos. Se calculó la proporción de CD14⁺/CD34⁺ dividiendo el número de células CD14⁺ circulantes/mL por el número de células CD34⁺ circulantes/mL. Los valores en plasma del VEGF, PIGF e IL-6, expresados en fg/mL, se dividieron por el número de células CD34⁺ circulantes/mL. La proporción CD16⁺/CD34⁺ se calculó dividiendo el número de células CD14⁺CD16⁺/mL por el número de células CD34⁺ circulantes/mL. Se indican el coeficiente de correlación de Pearson o de Spearman y el valor de *P*. (●) grupo control, n: 25 a 32; (○) grupo con cáncer, n: 54. En el panel F, (●,○) corresponden a los valores de CD14⁺/CD34⁺, y (▲, Δ) a los valores de CD16⁺/CD34⁺.

20 Figura 4. El nivel de las HPCs (células progenitoras hematopoyéticas) CD34⁺CXCR4⁺ circulantes se correlaciona con la concentración en plasma de los factores angiogénicos por célula CD34⁺. Los valores correspondientes a las proporciones VEGF/CD34⁺ y PIGF/CD34⁺ se calcularon tal como se describe en la figura 3. Los valores en plasma de la MMP-9 se expresaron en (ng/mL) x 100, y se dividieron por el número de células CD34⁺ circulantes/mL. Se indican el coeficiente de correlación de Pearson y el valor de *P*. (●) grupo control, n: 15 a 18; (○) grupo con cáncer, n: 34 a 37.

25 Figura 5. La capacidad de las HPCs CD34⁺ para diferenciarse en monocitos se correlaciona con el porcentaje de HPCs CD34⁺BB9⁺ circulantes en pacientes con cáncer colorrectal. Los valores correspondientes a las proporciones VEGF/CD34⁺ y PIGF/CD34⁺ se calcularon tal como se describe en la figura 3. El % de células CD34⁺BB9⁺ representa el porcentaje de células CD34⁺ que expresan el antígeno BB9. Se indican el coeficiente de correlación de Pearson o de Spearman y el valor de *P*. (●) grupo control, n: 15 a 18; (○) grupo con cáncer, n: 34 a 37.

Descripción detallada de la invención

30 1.- Definiciones

El término “cáncer colorrectal” o “cáncer de colon” o “cáncer de intestino grueso” o “CRC”, tal como se utilizan aquí, incluye crecimientos cancerosos en el colon, recto y apéndice.

35 El término “biomarcador”, tal como se utiliza aquí, sigue la definición proporcionada por los NIH (National Institutes of Health), es decir una característica que se mide y evalúa de manera objetiva como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. En la presente invención, dichos biomarcadores son el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en una muestra de sangre aislada.

40 El término “individuo”, tal como se utiliza aquí, significa un ser humano.

45 El término “monocitos CD14⁺ circulantes”, tal como se utiliza aquí, significa el número de células hematopoyéticas que expresan los antígenos CD45 y CD14, también denominados monocitos, en sangre periférica y se puede expresar como el número de monocitos CD14⁺ por ml de sangre o el número de monocitos CD14⁺ por ml de células nucleadas, obtenidas después de la centrifugación en gradiente de la sangre, o como el porcentaje de células nucleadas positivas para el antígeno CD14.

50 El término “células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes”, tal como se utiliza aquí, significa el número de células hematopoyéticas con una expresión débil o negativa de CD45 y que expresan el antígeno CD34, un marcador de células progenitoras hematopoyéticas en sangre, expresado como el número de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ por ml de sangre o el número de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ per ml de células nucleadas, obtenidas después de una centrifugación en gradiente de la sangre, o como el porcentaje de células nucleadas positivas para el antígeno CD34 con una expresión débil o negativa del antígeno CD45.

El término “células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno

ACE/BB9 (CD143)", tal como se utiliza aquí, significa el número de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ positivas para CD143 (BB9) por ml de sangre o el número de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ positivas para CD143 (BB9) por ml de células nucleadas, obtenidas después de la centrifugación en gradiente de la sangre, o como el porcentaje de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ que expresan el antígeno CD143 (BB9).

A menos que se indique lo contrario, todas las células circulantes a las que se hace referencia en la presente invención son células humanas.

2.- Desarrollo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la detección de neoangiogénesis tumoral, preferiblemente asociada con CRC, que comprende las etapas de:

- a) Proporcionar una muestra de sangre aislada de un individuo;
- b) Obtener células nucleadas de la muestra de sangre aislada;
- c) Determinar el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en las células nucleadas de la muestra de sangre aislada;
- d) Comparar la proporción entre el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes dividido por el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes con respecto al porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) determinados en c) con los valores obtenidos para individuos control o individuos sanos.

Los individuos con CRC muestran una fuerte correlación entre la proporción de CD14⁺/CD34⁺ y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ que expresan BB9, mientras que en individuos control o individuos sanos ambos parámetros (CD14⁺: CD34⁺ y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ que expresan BB9) son independientes. Para más detalles véase la sección de ejemplos y la figura 5D.

Dicha determinación se puede llevar a cabo mediante citometría de flujo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un sistema de ensayo para la detección de neoangiogénesis tumoral, preferiblemente asociada con CRC, en una muestra de sangre aislada de un individuo. El sistema de ensayo se basa en la especificidad de un anticuerpo para unirse específicamente a un epítipo o elemento estructural del antígeno o receptor. En particular, dicho sistema de ensayo es un inmunoensayo para la detección de neoangiogénesis tumoral, preferiblemente asociada con CRC, en una muestra de sangre aislada de un individuo, que comprende:

- a) un anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano que se une al antígeno de las células hematopoyéticas CD45⁺ circulantes;
- b) por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-humano que se une al antígeno de los monocitos CD14⁺ circulantes, al antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y al antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143), preferiblemente dicho por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-humano se selecciona del grupo de anticuerpos monoclonales anti-humanos que consisten en anti-CD34, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD31, anti-CD146, anti-CXCR4/CD184, anti-ACE/CD143, anti-CD133/2, anti-receptor de angiopoyetina Tie-2 y anti-VEGFR-2/KDR;
- c) un recipiente para mezclar reactivos y células, preferiblemente dicho recipiente es un tubo.
- d) por lo menos un reactivo para la detección de dicha unión entre anticuerpos y antígenos, seleccionándose preferiblemente dicho reactivo para la detección del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), peridin clorofila (PerCP), PE-cianina 7 (PE-Cy7), alofocianina (APC), APC-cianina 7 (APC-Cy7) y APC-H7.

La lista de anticuerpos y reactivos utilizados en el inmunoensayo anterior no se limita a los mismos, ya que la última generación de citómetros con 3 láseres permiten la visualización de hasta ocho colores y, por tanto, es posible llevar a cabo el presente inmunoensayo de la invención con otro anticuerpo conjugado a fluorocromos adecuados. No obstante, la lista mostrada como preferible hace

referencia a anticuerpos y reactivos utilizados experimentalmente en la presente invención con un citómetro que permite la visualización de seis colores.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit para la detección de neoangiogénesis tumoral, preferiblemente asociada con CRC, que comprende:

- 5 a) por lo menos un medio de recepción para recibir una muestra de sangre aislada del individuo;
- b) por lo menos un medio para analizar la muestra de sangre, preferiblemente mediante el inmunoensayo tal como se describe en la presente invención;
- c) por lo menos un medio para la detección de neoangiogénesis tumoral, preferiblemente asociada con CRC, en el individuo;
- 10 d) instrucciones para la utilización del kit.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la utilización del nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en una muestra de sangre aislada como biomarcador para la detección de neoangiogénesis tumoral, preferiblemente asociada con cáncer colorrectal.

15

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar e ilustrar la presente invención y no pretenden limitar la invención.

Materiales y métodos

20 Sujetos de estudio

Se obtuvo sangre fresca de 65 pacientes recién diagnosticados de CRC antes de la resección del tumor. De éstos, 39 eran hombres y 26 eran mujeres, con una edad promedio de 67 años (intervalo: 25 a 84 años). El 9% de los pacientes se encontraban en estadio I, el 31% en estadio II, el 40% en estadio III y el 20% en estadio IV. El 63% de los tumores se localizaron en el colon y el 37% en el recto. Todos los tumores se clasificaron patológicamente como adenocarcinoma. El tratamiento neoadyuvante se dio al 52% de los pacientes con cáncer rectal antes de la intervención quirúrgica, y consistió en una dosis oral de 825 mg/m² de capecitabina y radioterapia concomitante (11 de 13 pacientes), o sólo radioterapia (2 de 13 pacientes). El grupo control comprendió 32 donantes sanos (18 hombres y 14 mujeres), con una edad promedio de 52 años (intervalo: 25 a 72 años). El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital General de la Universidad de Valencia, Valencia, España. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los pacientes.

25

30

Cuantificación de factores solubles

Se obtuvo sangre periférica con el previo consentimiento informado firmado por parte de los pacientes antes de la intervención quirúrgica. Las muestras de sangre se recogieron en Tubos de Preparación Celular Vacutainer de BD (BD Diagnostics) que contenían citrato y Ficoll. Después de la centrifugación, se obtuvieron asépticamente las células mononucleares (MNCs) y el plasma según las instrucciones del fabricante. Se utilizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para determinar los niveles en plasma del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor de crecimiento derivado de placenta (PIGF), de la metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9) (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Alemania), de la forma soluble del receptor del VEGF tipo 1 (VEGFR-1/Flt1) y tipo 2 (VEGFR-2/KDR), de la Interleuquina-6 (IL-6) y de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (R&D Systems Europe Ltd. Abingdon, Reino Unido).

35

40

Citometría de flujo

Se incubaron un total de 1×10^6 células durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos monoclonales (mAbs): CD45 (2D1, BD Biosciences), CD34 (8G12, BD Biosciences), CD14 (MΦP9, BD Biosciences) y CD16 (3G8, BD Biosciences), CD31 (WM59, BD Pharmingen), CD146 (P1H12, BD Pharmingen), CXCR4/CD184 (12G5, BD Pharmingen), ACE/CD143 (BB9, BD Biosciences); CD133/2 (293C3, Miltenyi Biotec), receptor de la angiopoyetina Tie-2 (83715, R&D Systems) y VEGFR-2/KDR (89106, R&D systems, y 2, Miltenyi Biotec). Los anticuerpos estaban marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), peridín clorofila (PerCP), PE-cianina7 (PE-Cy7), alofocianina

45

50

(APC), APC-cianina7 (APC-Cy7) o APC-H7. Como controles, se utilizaron isotipos marcados con los correspondientes fluorocromos. Se utilizó 7-aminoactinomicina D para descartar las células no viables. Para realizar la enumeración de las HPCs y las EPCs, se adquirieron un mínimo de 200 células CD34⁺. Para analizar las subpoblaciones de monocitos se adquirieron un mínimo de 200.000 células. Se realizaron los análisis por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACSCanto de seis colores (Becton Dickinson) y el software FACSDiva.

Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron con el GraphPad PRISM versión 5.00 para Windows (GraphPad Software). Los datos se expresan como la media \pm SD y en intervalos de confianza (CI) del 95%. La distribución normal de los datos se analizó mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov o de Shapiro-Wilk. Las comparaciones de variables entre los dos grupos se analizaron con el test t de Student o con el test de Mann-Whitney según sea aplicable. Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman o de Pearson para analizar la correlación entre variables. Las diferencias se consideraron significativas si el valor de p era inferior a 0,05.

Resultados

Las HPCs circulantes están disminuidas en pacientes con CRC

Se analizaron las células progenitoras CD34⁺ de sangre periférica humana según el procedimiento internacional para la enumeración de las HPCs humanas (Figura 1). Se sabe que más del 95% de las células progenitoras CD34⁺ coexpresan el CD31, un marcador común de las HPCs y las EPCs, y de este modo la población total de células CD34⁺CD31⁺ se definió como CPCs. Además, la mayoría de estas células CD34⁺ muestra una expresión baja del antígeno pan-leucocitario CD45 y son hematopoyéticos de origen, mientras que las células CD34⁺ restantes no expresan CD45 y están enriquecidas en EPCs y HPCs. Para analizar las diferentes subpoblaciones de células progenitoras, se aprovechó la expresión de CD133, un antígeno limitado al linaje hematopoyético y que disminuye su expresión a medida que proliferan las HPCs (15). Por consiguiente, se fenotiparon las HPCs como CD34⁺CD31⁺CD133⁺ con una expresión débil ("dim") o negativa de CD45; las HPCs comprometidas o proliferantes como CD34⁺CD31⁺CD133⁻CD45^{dim}, y las EPCs como CD34⁺CD31⁺CD133⁻CD45⁻.

El análisis por citometría de flujo puso de manifiesto una disminución, de casi dos veces, en el contenido de CPCs en pacientes con CRC (Tabla 1).

30

	CPCs		HPCs		HPCs proliferantes	
	CD45(dim/neg) CD34+ CD31+	Células/mL	CD45(dim/neg) CD34+ CD31+ CD133+	Células/mL	CD45dim CD34+ CD31+ CD133-	Células/mL
	%MNCs		%CPCs CD34 ⁺		%CPCs CD34 ⁺	
Control	0,139 ± 0,062 (0,113 a 0,166)	1793 ± 801 (1447 a 2140)	70 ± 8 (66,0 a 73,0)	1297 ± 607 (1028 a 1566)	23 ± 8 (20,2 a 26,5)	407 ± 196 (322 a 492)
Cancer	0,078 ± 0,047 (0,062 a 0,094)	980 ± 515 (806 a 1155)	59 ± 14 (54,1 a 63,5)	614 ± 400 (479 a 750)	30 ± 11 (25,5 a 33,1)	299 ± 182 (236 a 361)
	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$	$P = 0,0015$	$P < 0,0001$	$P = 0,018$	$P = 0,036$

Tabla 1. Frecuencia de las células progenitoras hematopoyéticas en sangre periférica. Después de la centrifugación en gradiente de Ficoll, se obtuvieron $1,46 \times 10^6 \pm 0,56 \times 10^6$ de MNCs (95% CI = $1,25 \times 10^6$ a $1,66 \times 10^6$ MNCs), y $1,40 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$ de MNCs (95% CI = $1,28 \times 10^6$ a $1,61 \times 10^6$ MNCs) en el grupo control y el grupo con cáncer, respectivamente. Los valores correspondientes a las células progenitoras circulantes (CPCs) se expresan como porcentaje de las MNCs y en número de células por mL de sangre. Los valores correspondientes a las células progenitoras hematopoyéticas (HPCs) circulantes se expresan como porcentaje del total de CPCs CD34⁺ y en número de células por mL. Los datos se expresan como Media ± SD. Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre paréntesis. Los datos se compararon utilizando el test t de Student para muestras no pareadas. Grupo control, n = 32, y grupo con cáncer n = 64.

	EPCs		Monocitos	
	CD45neg CD34+ CD31+ CD133-	CD45+ CD14+	% MNCs	(Células/mL) x 10 ³
	%CPCs CD34+	Células/mL		
Control	5,9 ± 3,4 (4,4 a 7,4)	109 ± 99 (65 a 154)	70 ± 8 (66 a 73)	1297 ± 607 (1028 a 1566)
Cancer	6,9 ± 4,7 (5,3 a 8,5) <i>P</i> = 0,381	60 ± 41 (46 a 74) <i>P</i> = 0,035	59 ± 14 (54 a 64) <i>P</i> < 0,001	614 ± 400 (479 a 750) <i>P</i> = 0,005

Tabla 2. Frecuencia de las células progenitoras endoteliales circulantes y monocitos en sangre periférica. Los valores correspondientes a las células progenitoras endoteliales (EPCs) circulantes se expresan como porcentaje del total de CPCs CD34⁺ y en número de células por mL. Los valores correspondientes a los monocitos se expresan como porcentaje de las MNCs y en número de células por mL de sangre. El número de MNCs obtenidos tras la centrifugación en gradiente de Ficoll se dan en la Tabla 1. Los datos se expresan como Media ± SD. Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre paréntesis. Los datos se compararon utilizando el test t de Student para muestras no pareadas. Grupo control, n = 32, y grupo con cáncer n = 64.

Además, un análisis más exhaustivo demostró que en las CPCs, sólo el porcentaje correspondiente a las HPCs disminuía significativamente, mientras que el correspondiente a las HPCs más proliferantes CD34⁺CD31⁺CD133⁻CD45^{dim} aumentaba (Tabla 1), sugiriendo una mayor velocidad de entrada en el ciclo celular de las HPCs en pacientes con cáncer. La proporción de las CPCs correspondiente a las EPCs era similar en los grupos control y con cáncer (Tabla 2). Adicionalmente, los presentes inventores determinaron la expresión del VEGFR2/KDR, un marcador que originalmente se consideró restringido a las células vasculares y se utilizó para enumerar las EPCs, aunque también es expresado por algunas subpoblaciones de HPCs. Nuestros resultados muestran que no se hallaron diferencias en el porcentaje de CPCs positivas para KDR entre donantes sanos [1,3% ± 1,9% (95% CI=0,47% a 2,19%)] y pacientes con CRC [0,6% ± 1,0% (95% CI=0,18% a 1,04%)]. Además, también se determinó la frecuencia de las células endoteliales circulantes maduras (CECs), cuyo fenotipo corresponde a CD45⁻CD31⁺CD146⁺ (Figura 2). De nuevo, no se observaron diferencias en el porcentaje de MNCs correspondiente a las CECs entre el grupo control 0,33 ± 0,21% (95% CI=0,19% a 0,47%) y el grupo con cáncer 0,41% ± 0,32% (95% CI= 0,29% a 0,52%).

Las HPCs de pacientes con CRC muestran una mayor capacidad de diferenciarse en monocitos con un patrón proinflamatorio destacado

Nuestros resultados muestran que la proporción de MNCs correspondiente a monocitos CD14⁺ se incrementó significativamente en pacientes con CRC (Tabla 2). Para evaluar si los niveles circulantes de estas células mieloides se asociaban con los de las HPCs CD34⁺, todos los valores se representaron en un gráfico. De hecho, se obtuvo una buena correlación entre estas dos poblaciones de células en ambos grupos de estudio, pero a nivel de células individuales se obtuvo un mayor número de monocitos CD14⁺ por célula CD34⁺ en pacientes con CRC (Figura 3A), indicando una mayor eficiencia de las HPCs para diferenciarse en monocitos. También se analizó la expresión de Tie-2 y CD16 en los monocitos CD14⁺ (Figura 2). Inesperadamente, la proporción de monocitos proangiogénicos CD14⁺Tie-2⁺ en la subpoblación de células CD14⁺ era similar en ambos grupos, 0,77% ± 0,42% (95% CI=0,56% a 0,98%) en el grupo control y 1,41% ± 1,36% (95% CI=0,79% a 2,04%) en el grupo con CRC. Sin embargo, los monocitos proinflamatorios CD14⁺CD16⁺ que suponían un 5,2% ± 1,9% (95% CI=4,27% a 6,2%) de la población celular CD14⁺ en los donantes sanos, aumentaron bruscamente alcanzando valores del 10,5% ± 4,8% (95% CI=8,7% a 12,3%) en los pacientes con CRC ($P < 0,0001$).

Los niveles en plasma de factores angiogénicos y moléculas proinflamatorias relacionadas están aumentados en pacientes con CRC

Es ampliamente conocido que los niveles circulantes de los factores angiogénicos están elevados en CRC. Por consiguiente, los niveles en plasma del VEGF como del PlGF aumentaron significativamente en pacientes con CRC cuando se comparaban con el grupo control, pero los niveles en plasma de sus receptores solubles VEGFR2/KDR y VEGFR1/Flt1 eran similares entre los dos grupos, sugiriendo una mayor biodisponibilidad de estos factores angiogénicos en estos pacientes. Adicionalmente, la IL-6 y la MMP-9, dos moléculas implicadas en procesos inflamatorios y angiogénicos aumentaron en siete y dos veces, respectivamente, en pacientes con CRC (Tabla 3).

	IL-6	VEGF	PIGF	VEGFR-2/KDR	VEGFR-1/Flt-1	MMP-9
	pg/mL	pg/mL	pg/mL	ng/mL	pg/mL	ng/mL
Control	1,26 ± 0,83 (0,96 a 1,56)	20,2 ± 10,7 (16,0 a 24,3)	15,7 ± 7,2 (12,8 a 18,5)	5,6 ± 1,0 (5,2 a 6,1)	66 ± 12 (60 a 72)	56 ± 55 (36 a 76)
Cancer	8,58 ± 9,92 (5,92 a 11,24)	31,0 ± 16,0 (26,6 a 35,2)	20,2 ± 11,1 (17,2 a 23,1)	5,4 ± 1,2 (5,1 a 5,8)	70 ± 12 (66 a 75)	106 ± 71 (87 a 125)
	$P < 0,0001$	$P = 0,0005$	$P = 0,029$	NS	NS	$P = 0,001$

Tabla 3. Valores en plasma de factores angiogénicos y moléculas relacionadas. Los valores se expresan como la Media ± SD. Los intervalos de confianza del 95% se indican entre paréntesis. Para comparaciones estadísticas se utilizaron el test t de Student para muestras no pareadas o el test de Mann-Whitney. Grupo control, n: 20 a 32, y grupo con cáncer, n: 45 a 64. NS = no significativo.

Los factores angiogénicos modulan la hematopoyesis

Para evaluar el impacto de la concentración de factores angiogénicos en los niveles de las HPCs circulantes, se expresaron los niveles en plasma de las moléculas seleccionadas por célula CD34⁺. Al hacerlo de esta manera, apareció un escenario de fuertes relaciones entre estos factores (Figura 3B y 3C). No obstante, de manera destacada, a nivel de células individuales, las concentraciones plasmáticas del VEGF, del PIGF y de la IL-6 por célula CD34⁺ se correlacionaban directamente con la proporción CD14⁺: CD34⁺, una medida de la capacidad de las células CD34⁺ para diferenciarse en monocitos (Figura 3D, 3E, 3F). Cabe mencionar que la concentración de IL-6 por célula CD34⁺ también se correlacionaba con la proporción CD14⁺CD16⁺: CD34⁺ (Figura 3F).

El CRC induce la movilización de las células CD34⁺

Como los factores angiogénicos circulantes aumentaban en los pacientes con CRC, supusimos que este incremento podría afectar el grado de movilización de las HPCs CD34⁺. La salida de las células CD34⁺ de la médula ósea se facilita mediante la interacción entre el factor-1 derivado del estroma (SDF-1) y su único receptor CXCR4 en las células CD34⁺. Además, se ha demostrado que la movilización de las HPCs está mediada por la degradación de SDF-1 en la médula ósea (16, 17) y como consecuencia, las células CD34⁺ movilizadas presentan una proporción y densidad inferiores de CXCR4 (18). Por lo tanto, se determinó la expresión de CXCR4 en las células progenitoras CD34⁺. De hecho, los pacientes presentaron un mayor número de HPCs CD34⁺ movilizadas, tal como se demostró por la menor proporción de células CD34⁺ que expresaban CXCR4 [12,1% ± 5,0% (95% CI=10,4% a 13,9%) frente a 18,0% ± 7,3% (95% CI=13,5% a 22,6%) en los controles, $P = 0,02$], así como por la menor expresión en membrana del CXCR4, determinada como la intensidad de fluorescencia promedio (414 ± 95 AU frente a 557 ± 209 en los controles, $P = 0,014$).

Tal como se representa en las Figuras 4A y 4B, los niveles circulantes de células CD34⁺CXCR4⁺ eran dependientes de la cantidad del VEGF como del PIGF por célula CD34⁺, pero se observó una movilización más eficiente en pacientes con CRC. Se ha propuesto que la migración y reclutamiento mediados por SDF-1 de las CPCs depende de la MMP-9 (19). Nuestros resultados muestran que efectivamente el número de células CD34⁺CXCR4⁺ circulantes se correlacionaba bien con la concentración en plasma de la MMP-9 por célula CD34⁺ en donantes sanos, pero era independiente en los pacientes con CRC (Figura 4C), a pesar de la buena correlación observada entre los niveles circulantes del VEGF y de la MMP-9 por célula CD34⁺ (Figura 4D). Adicionalmente, los inventores observaron que el número de monocitos circulantes se correlacionaba bien con el de las células CD34⁺CXCR4⁺ en individuos sanos, pero no así en pacientes con CRC (Figura 4E).

La proporción CD14⁺:CD34⁺ en pacientes con CRC está relacionada con el porcentaje de HPCs CD34⁺ circulantes que expresan la enzima convertidora de angiotensina

Finalmente, se analizó la posibilidad de que los niveles elevados de factores angiogénicos en plasma pudieran reducir el reservorio de las células CD34⁺ más pluripotentes y, de este modo, satisfacer el requerimiento mieloide necesario para inducir la angiogénesis tumoral. Para este fin, los inventores aprovecharon la reciente descripción del CD143/BB9 (enzima convertidora de angiotensina, ACE), que define las HPCs CD34⁺ con capacidad de injertar y repoblar la médula ósea irradiada (20) e identifica los hemangioblastos que se diferencian de las células madre embrionarias humanas (21). Nuestros resultados muestran que el 19,9% ± 8,1% (95% CI=15,1% a 24,8%) de las células CD34⁺ expresaban BB9 en el grupo control, pero sólo un 10,8% ± 4,4% (95% CI=9,0% a 12,7%) en el grupo con CRC lo expresaba ($P = 0,001$). Además, no se observaron diferencias en la intensidad de fluorescencia.

Las representaciones de los niveles circulantes de las células CD34⁺BB9⁺ frente a las concentraciones en plasma de factores angiogénicos por célula CD34⁺ nos llevó a observar que estas células primitivas se correlacionaban bien con los niveles del VEGF y del PIGF en el grupo con CRC, pero sólo con los niveles del VEGF en el grupo control (Figura 5A y 5B). No obstante, de manera destacada, los inventores observaron que el nivel de monocitos circulantes era dependiente del nivel de las HPCs CD34⁺BB9⁺ circulantes más primitivas en ambos grupos control y CRC (figura 5C), indicando una asociación íntima entre estas dos poblaciones celulares. Sin embargo, a nivel de células individuales, se obtuvo un mayor número de células CD14⁺ por célula CD34⁺BB9⁺ en el grupo con cáncer, corroborando la mayor eficiencia de las HPCs hacia la diferenciación en monocitos, observada previamente. Adicionalmente, aunque en el grupo control la proporción CD14⁺: CD34⁺ era independiente del porcentaje de células progenitoras CD34⁺ que expresan BB9, se obtuvo una fuerte correlación entre estos dos parámetros en el grupo con CRC (Figura 5D). De forma destacada, los niveles en plasma de la ACE disminuyeron ligeramente, aunque significativamente, en el grupo con CRC [(134 ± 44 ng/mL)

(95% CI=122 ng/mL a 1474 ng/mL)] frente al grupo control [(181 ± 59 ng/mL) (95% CI=157 ng/mL a 204 ng/mL)], $P = 0,0008$, pero cuando se expresaron por célula CD34⁺, las concentraciones relativas de la ACE se correlacionaban bien con las del VEGF y las del PIGF (datos no mostrados). Estos datos sugieren firmemente que además de los factores angiogénicos clásicos, la ACE debe jugar un papel importante en la modulación de la angiogénesis, así como en la diferenciación mieloide, particularmente en CRC.

Discusión

Actualmente se cree que, en vista de los recientes avances en la biología de las células progenitoras, la neovascularización tiene lugar por angiogénesis y/o vasculogénesis y, de este modo, la contribución de las células endoteliales en los nuevos vasos sanguíneos ha sido objeto de mucho estudio. De este modo, se han descrito niveles elevados de células endoteliales circulantes en algunos cánceres humanos (7), y de manera destacada, se observó un descenso en el número de células CD31^{bright}CD45⁻ en pacientes con cáncer rectal después del tratamiento con bevacizumab, un anticuerpo específico del VEGF, (22). No obstante, es importante mencionar que el CD146, un marcador de células endoteliales, no se pudo detectar en las células viables CD31^{bright}CD45⁻ de pacientes con cáncer rectal (23). Por consiguiente, los inventores hallaron que la frecuencia de estas subpoblaciones celulares en sangre periférica era extremadamente baja tanto en donantes sanos como en pacientes con CRC. Además, utilizando un panel de marcadores específicos, los inventores demostraron que los porcentajes de MNCs correspondientes a EPCs y CECs eran similares en ambos grupos, control y CRC, sugiriendo una falta de movilización y probablemente de contribución de estas subpoblaciones celulares endoteliales a la angiogénesis tumoral. Estos resultados cuestionan la validez de utilizar la enumeración de las células endoteliales en sangre periférica como biomarcadores de terapia anti-angiogénica, por lo menos en pacientes con CRC.

En la presente invención, se utiliza el término CPCs para incluir las HPCs y las EPCs, y se muestra que el porcentaje de MNCs correspondiente a las CPCs se redujo drásticamente en pacientes con CRC, pero sólo se redujeron las CPCs con características fenotípicas de HPCs. De manera destacada, las HPCs de pacientes con CRC mostraban una mayor capacidad de diferenciarse en monocitos y el incremento resultante en los niveles circulantes de estas células mieloides puede ser de gran importancia, dadas las implicaciones de esta subpoblación celular en la angiogénesis tumoral. De este modo, las células mieloides no sólo muestran la capacidad de inducir *ex vivo* la angiogénesis por brotes sino que su posición perivascular contribuye y parece ser necesaria para la angiogénesis tumoral en modelos animales experimentales (24, 25). Se ha propuesto que los monocitos que expresan Tie-2 son las células mieloides más proangiogénicas (24, 26), y los monocitos Tie-2 circulantes se incrementan en algunos cánceres humanos (27). En cambio, nuestros resultados demuestran que en las células CD14⁺, la proporción de monocitos que expresan Tie-2 era similar entre donantes sanos y pacientes con CRC. Sin embargo, los monocitos circulantes que expresan CD16, las células mieloides más proinflamatorias (28), aumentaban significativamente, recalcando la fuerte asociación entre inflamación y angiogénesis en el CRC (29). Como los procesos inflamatorios están relacionados con un aumento de la angiogénesis (30), los monocitos deben contribuir a la creación de un medio proangiogénico mediante la liberación de mediadores proinflamatorios y factores angiogénicos. Así, se ha demostrado que la infusión única de bevacizumab, era capaz de disminuir la densidad de la microvasculatura e incrementar el recubrimiento por pericitos de una fracción de los vasos (22). Adicionalmente, la eliminación dirigida de *Vegfa* en las células del linaje mieloide no sólo daba lugar a una vasculatura tumoral menos tortuosa, con un aumento del recubrimiento por pericitos y disminución de la longitud de los vasos, sino que contribuía a la eficacia quimioterapéutica de los agentes citotóxicos (31), destacando la importancia de las células mieloides en la angiogénesis tumoral.

Se sabe que las citoquinas secretadas por las células hematopoyéticas inducen la angiogénesis, mientras que los factores angiogénicos, incluyendo el VEGF, juegan un papel esencial en la hematopoyesis. En la presente invención, se demuestra que existe una asociación íntima entre los niveles circulantes de los factores angiogénicos y las células hematopoyéticas tanto en estado sano como en CRC, y, de este modo, los incrementos en plasma del VEGF y del PIGF pueden ayudar a explicar el incremento en la capacidad de las HPCs de diferenciarse en monocitos en pacientes con CRC. Además, se demostró en base a la expresión de CXCR4, que el CRC induce un mayor grado de movilización de las HPCs, confirmando el efecto que, sobre la movilización de las HPCs, ejercen los factores angiogénicos (32, 33).

Estos hallazgos pueden, aportar nueva luz para comprender el desarrollo tumoral en humanos, ya que se ha demostrado que el reclutamiento de células progenitoras de la médula ósea es necesario y suficiente para la angiogénesis tumoral (1, 25, 34). Además, se ha observado que las HPCs CD34⁺ se sitúan en la periferia del tumor, adheridas, o próximas a la pared del vaso sanguíneo en el parénquima

tumoral en ratones con carcinomas de mama (35). Adicionalmente, se ha descrito que la elevación mantenida del VEGF₁₆₅ en plasma, en órganos diana o en tumores da lugar al remodelado de la arquitectura vascular de la médula ósea y a la movilización de las HPCs hacia el torrente sanguíneo y los órganos extramedulares con una esplenomegalia y hepatomegalia concomitantes (33, 36). Por otro lado, los estudios clínicos han proporcionado evidencias de que la elevación de los niveles del VEGF en plasma está asociada con el fallo de la médula ósea (37) y la aparición de hemangiomas (38), entre otros. Por lo tanto, es posible que los factores angiogénicos induzcan el reclutamiento de las HPCs hacia el tumor. Sin embargo, aunque no existen evidencias de la inducción de hematopoyesis extramedular en estos pacientes, no se puede descartar esta posibilidad.

Adicionalmente, y a la luz de informes recientes, el desequilibrio hematopoyético observado puede ser de relevancia en el desenlace de los pacientes con CRC. De este modo, estudios clínicos han descrito que después del tratamiento con bevacizumab, los niveles circulantes del VEGF y del PIGF aumentaban significativamente en pacientes con cáncer rectal (39) y después de monoterapia con bevacizumab, los pacientes con carcinoma rectal mostraban niveles circulantes de SDF-1 más elevados, sobreexpresándose los genes de SDF-1, CXCR4 y CXCL6 en las células del cáncer rectal (40). Teniendo en cuenta que el tráfico y el reclutamiento de las células hematopoyéticas tiene lugar después de la expresión perivascular del SDF-1, que actúa capturando y reteniendo las células CXCR4⁺ entrantes (17, 25, 41), es creíble pensar que la terapia anti-VEGF debería inducir, más que prevenir, el reclutamiento de las células hematopoyéticas hacia los nichos tumorales. Además, la demostración de que el reclutamiento y la migración de las células hematopoyéticas hacia el tumor tiene lugar antes del inicio de la angiogénesis en la masa tumoral (34), condujo a los inventores a hacer la hipótesis de que la ventaja modesta observada en la supervivencia global después de las terapias anti-angiogénicas podría estar ligada al desequilibrio hematopoyético mostrado por estos pacientes.

Finalmente, el hallazgo más importante y sorprendente fue la estrecha relación entre los factores angiogénicos en plasma y los niveles circulantes de las células progenitoras hematopoyéticas que expresan ACE/BB9, lo que sugiere que los factores angiogénicos deben jugar un papel clave en el mantenimiento de estas células primitivas y, por lo tanto, son responsables de su disminución en pacientes con CRC. Además, como los niveles circulantes de las células CD34⁺BB9⁺ y las células CD14⁺ se correlacionaban bien, los presentes resultados indican que la concentración elevada de factores angiogénicos debe contribuir a reducir el reservorio de las HPCs primitivas para satisfacer el requerimiento mielóide necesario para inducir la angiogénesis tumoral en estos pacientes. De manera destacada, los presentes inventores muestran, por primera vez que la proporción CD14⁺:CD34⁺ en pacientes con CRC era dependiente de la proporción de células CD34⁺ que expresan la ACE.

La implicación de estas células progenitoras primitivas aumenta la posibilidad de que el sistema renina-angiotensina (RAS) juegue un papel no reconocido en el desequilibrio hematopoyético presente en pacientes con CRC. Cabe mencionar que una revisión de la literatura sugiere que la ACE debe estar implicada en el aumento de la entrada en ciclo de las HPCs primitivas en la médula ósea (42, 43) y se ha observado que los inhibidores de la ACE, así como los antagonistas de los receptores de angiotensina (Ang) II, AT1/AT2, afectan a la expansión de colonias de hemangioblastos humanos y a la proliferación y diferenciación de las HPCs (21). Por otro lado, el RAS está implicado en procesos angiogénicos y también en la angiogénesis tumoral. Por ejemplo, la sobreexpresión del angiotensinógeno-Hu en diferentes modelos animales inhibía el crecimiento tumoral y la metástasis (44, 45) y la expresión de AT1 en las células estromales inducía la angiogénesis tumoral mediante la inducción de la síntesis del VEGF (46). Es importante mencionar que los macrófagos asociados a tumor sobreexpresan AT1 (47) y un informe reciente acaba de mostrar que los fibroblastos asociados a carcinoma representan un fenotipo transicional del linaje monocítico al linaje de fibroblastos (48). Por lo tanto, las células mieloides mediante la señalización a través de RAS podrían contribuir a la angiogénesis tumoral humana.

De forma general, los datos de la presente invención proporcionan una evidencia convincente de que los factores angiogénicos que actúan en concordancia con moléculas proinflamatorias y el RAS, inducen a las HPCs a diferenciarse en monocitos, conduciendo a un desequilibrio hematopoyético, que a su vez, debería contribuir a las fases iniciales del crecimiento tumoral, así como a la fase angiogénica, ya que este efecto se observó en pacientes en todos los estadios. Además, estos resultados sugieren que la enumeración de los monocitos CD14⁺ circulantes y la de las células CD34⁺ que expresan BB9 deberían considerarse como marcadores fiables de la actividad angiogénica y podrían fomentar nuevas estrategias terapéuticas para el CRC. Los presentes inventores creen que el desarrollo de este método no invasivo permitirá mejorar la comprensión de la biología de la angiogénesis del cáncer en el CRC y proporcionará nueva luz sobre el origen de los tipos celulares que participan en este proceso fundamental para la progresión y diseminación del cáncer. Además, la evaluación de los niveles

circulantes de estas subpoblaciones celulares hematopoyéticas puede ser utilizada como una nueva herramienta de diagnóstico, que aporte información sobre el pronóstico, no proporcionada por otros indicadores clínicos convencionales, y ser utilizada por grupos colaborativos multicéntricos como un nuevo marcador para determinar la eficacia de la terapia antiangiogénica.

5 Referencias

1. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7:1194-201.
2. Yu L, Su B, Hollomon M, Deng Y, Facchinetti V, Kleinerman ES. Vasculogenesis driven by bone marrow-derived cells is essential for growth of Ewing's sarcomas. *Cancer Res* 2010; 70:1334-43.
- 10 3. Purhonen S, Palm J, Rossi D, et al. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:6620-5.
4. Spring H, Schüler T, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18111-6.
- 15 5. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature *Circ Res* 2004; 94:230-8.
6. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005; 11:261-2.
- 20 7. Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001; 97:3658-61.
8. Beaudry P, Force J, Naumov GN, et al. Differential effects of vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor ZD6474 on circulating endothelial progenitors and mature circulating endothelial cells: implications for use as a surrogate marker of antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3514-22.
- 25 9. Sessa C, Guibal A, Del Conte G, Rüegg C. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations?. *Nat Clin Prac Oncology* 2008; 5:378-91.
10. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and hematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002; 2:826-35.
- 30 11. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S et al. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000; 102:199-209.
12. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:71-8.
- 35 13. Dirkx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2006; 80:1183-96.
14. De Palma M, Venneri MA, Galli R, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005; 8:211-26
- 40 15. Encabo A, Mateu E, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. IL-6 precludes the differentiation induced by IL-3 on expansion of CD34+ cells from cord blood. *Haematologica* 2003; 88:388-95.
16. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization o mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97:3354-60.
- 45 17. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10:858-64.
18. Dlubek D, Drabczak-Skrzypek D, Lange A. Low CXCR4 membrane expression on CD34+ cells characterizes cells mobilized to blood. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37:19-23.

19. Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*. 2003; 112:160–9.
20. Jokubaitis VJ, Sinka L, Driessen R, et al. Angiotensin-converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal, and adult hematopoietic tissues. *Blood* 2008; 111:4055-63.
21. Zambidis ET, Park TS, Yu W, et al. Expression of ACE (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2008; 112:3601-14.
22. Willet CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004; 10:145-7.
23. Duda DG, Cohen KS, di Tomaso E, et al. Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24:1449-53.
24. De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003; 9:789-95.
25. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006; 124:175-89.
26. Coffelt SB, Tal AO, Scholz A, et al. Angiopoietin-2 regulates gene expression in TIE2-expressing monocytes and augments their inherent proangiogenic functions. *Cancer Res*; 70:5270–80.
27. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, et al. Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 2007; 109:5276-85.
28. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007; 81:584-92.
29. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2101-14.e5.
30. Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, Feldmann M, Paleolog E. T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004 ;3:35-42.
31. Stockmann C, Doedens A, Weidemann A, et al. Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature* 2008; 456:814-8.
32. Carlo-Stella C, Di Nicola M, Longoni P, et al. Placental growth factor-1 potentiates hematopoietic progenitor cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor in mice and nonhuman primates. *Stem Cells* 2007;25:252-61.
33. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2001; 193:1005-14.
34. Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, et al. Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* 2005;105:2757-63.
35. Jin H, Aiyer A, Su J, et al. A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest* 2006;116:652-62.
36. Kitajima S, Liu E, Morimoto M, et al. Transgenic rabbits with increased VEGF expression develop hemangiomas in the liver: a new model for Kasabach–Merritt syndrome. *Lab Invest* 2005; 85:1517–27.
37. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:3717-21.
38. Ohnishi S, Miyagishima T, Nakagawa M, et al. Diffuse neonatal hemangiomatosis without cutaneous lesions in an adult—a case report. *Angiology* 2002;53:235–7.

39. Willett CG, Duda DG, di Tomaso E, et al. Efficacy, Safety, and Biomarkers of Neoadjuvant Bevacizumab, Radiation Therapy, and Fluorouracil in Rectal Cancer: A Multidisciplinary Phase II Study. *J Clin Oncol* 2009; 27:3020-6.
- 5 40. Xu L, Duda DG, di Tomaso E, et al. Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1 α , CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res* 2009; 69:7905-10.
41. Jin DK, Shido K, Kopp HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med* 2006; 12 :557-67.
- 10 42. Park TS, Zambidis ET. A role for the rennin-angiotensin system in hematopoiesis. *Haematologica* 2009 94:745-7.
43. Haznedaroglu IC, Öztürk MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow rennin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35 :867-80.
- 15 44. Bouquet C, Lamandé N, Brand M, et al. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated gene transfer of human angiotensinogen. *Mol Ther* 2006; 14:175-82.
45. Vincent F, Bonnin P, Clemessy M, et al. Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res* 2009; 69:2853-60.
46. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer?. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16:293-9.
- 20 47. Egami K, Murohara T, Shimada T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 2003; 112 :67-75.
48. Abangan Jr RS, Williams CR, Mehrotra M, Duncan JD, LaRue AC. MCP1 directs trafficking of hematopoietic stem cell-derived fibroblast precursors in solid tumor. *Am J Pathol* 2010; 176:1914-26.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de neoangiogénesis tumoral que comprende las etapas de:
 - a) Proporcionar una muestra de sangre aislada de un individuo;
 - b) Obtener células nucleadas de la muestra de sangre aislada;
 - 5 c) Determinar el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en las células nucleadas de la muestra de sangre aislada;
 - 10 d) Comparar la proporción entre el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes dividido por el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes con respecto al porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) determinados en c) con los valores obtenidos para individuos control o individuos sanos.
- 2.- Método según la reivindicación 1, en el que dicha determinación se lleva a cabo mediante citometría de flujo.
- 15 3.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha neoangiogénesis tumoral está asociada con cáncer colorrectal.
- 4.- Inmunoensayo que se utiliza en la etapa c) del método de detección de neoangiogénesis tumoral en una muestra de sangre aislada de un individuo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
 - 20 a) Unir un anticuerpo monoclonal anti-CD45 humano al antígeno de las células hematopoyéticas CD45⁺ circulantes;
 - b) Unir por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-humano al antígeno de los monocitos CD14⁺ circulantes, al antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y al antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143);
 - 25 c) Mezclar en un recipiente reactivos y células;
 - d) Detectar dicha unión entre anticuerpos y antígenos mediante por lo menos un reactivo.
- 5.- Inmunoensayo según la reivindicación 4, en el que dicho por lo menos un anticuerpo monoclonal anti-humano se selecciona del grupo de anticuerpos monoclonales anti-humano que consiste en anti-CD34, anti-CD14, y anti-ACE/CD143 (BB9).
- 30 6.- Inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que dicho reactivo para la detección se selecciona del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), peridín clorofila (PerCP), PE-cianina 7 (PE-Cy7), alofocianina (APC), APC-cianina 7 (APC-Cy7) y APC-H7.
- 35 7.- Inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicha neoangiogénesis tumoral está asociada con cáncer colorrectal.
- 8.- Kit para la detección de neoangiogénesis tumoral, que comprende:
 - a) por lo menos un medio de recepción para recibir una muestra de sangre aislada del individuo, preferiblemente tubos que contienen citrato y Ficoll;
 - 40 b) un anticuerpo seleccionado entre anti-CD45 humano, anti-CD34 humano, anti-CD14 humano y anti-ACE/CD143 (BB9) humano;
 - c) un reactivo de detección seleccionado del grupo que consiste en isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), peridín clorofila (PerCP), PE-cianina 7 (PE-Cy7), alofocianina (APC), APC-cianina 7 (APC-Cy7) y APC-H7;
 - 45 d) isotipos para el control;
 - e) instrucciones para la utilización del kit.

9. Kit según la reivindicación 8, en el que dicha neoangiogénesis tumoral está asociada con cáncer colorrectal.

5 10.- Utilización del nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en una muestra de sangre aislada como biomarcador para la detección de neoangiogénesis tumoral.

11.- Utilización según la reivindicación 10, en el que dicha neoangiogénesis tumoral está asociada con cáncer colorrectal.

FIGURA 1

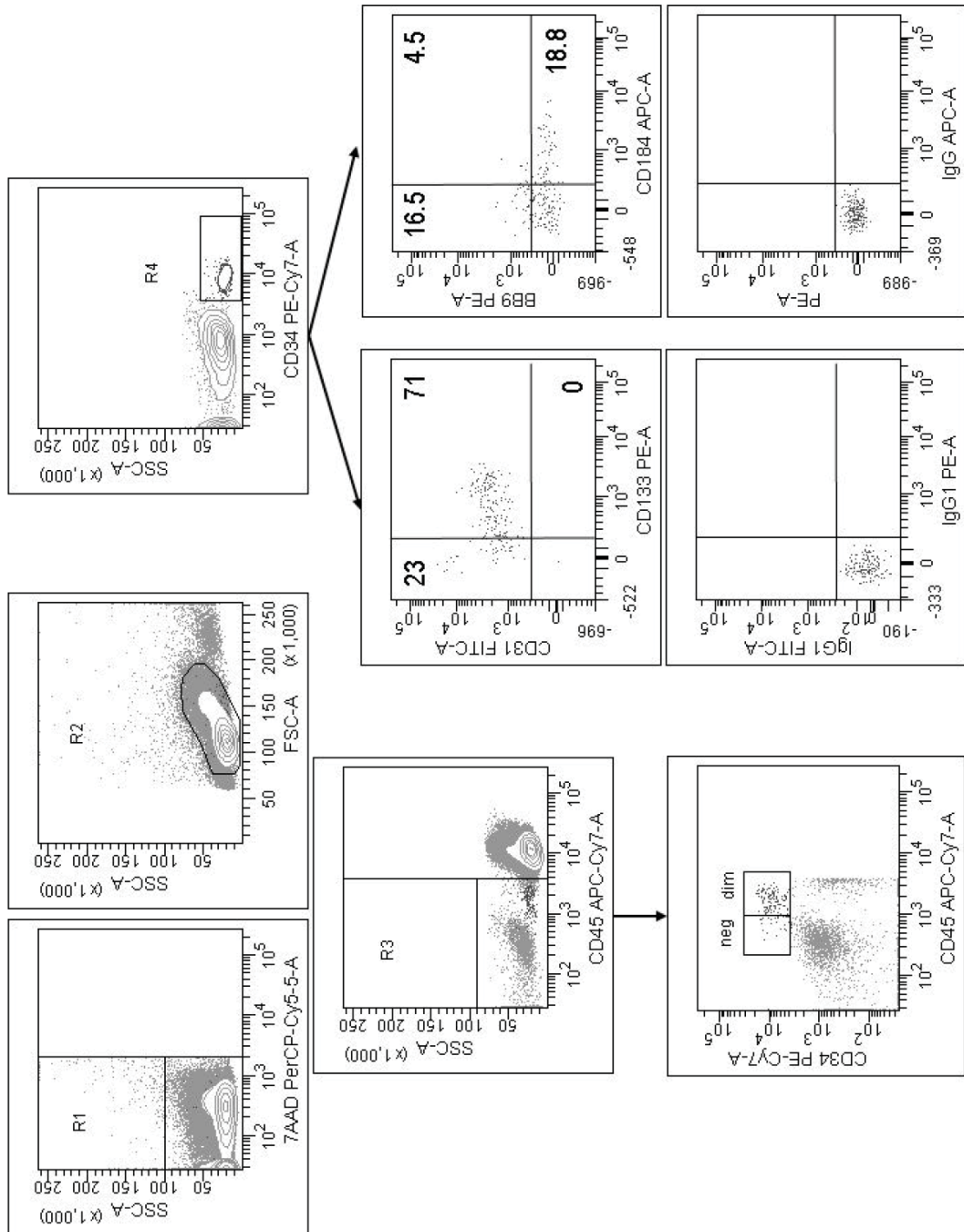


FIGURA 2

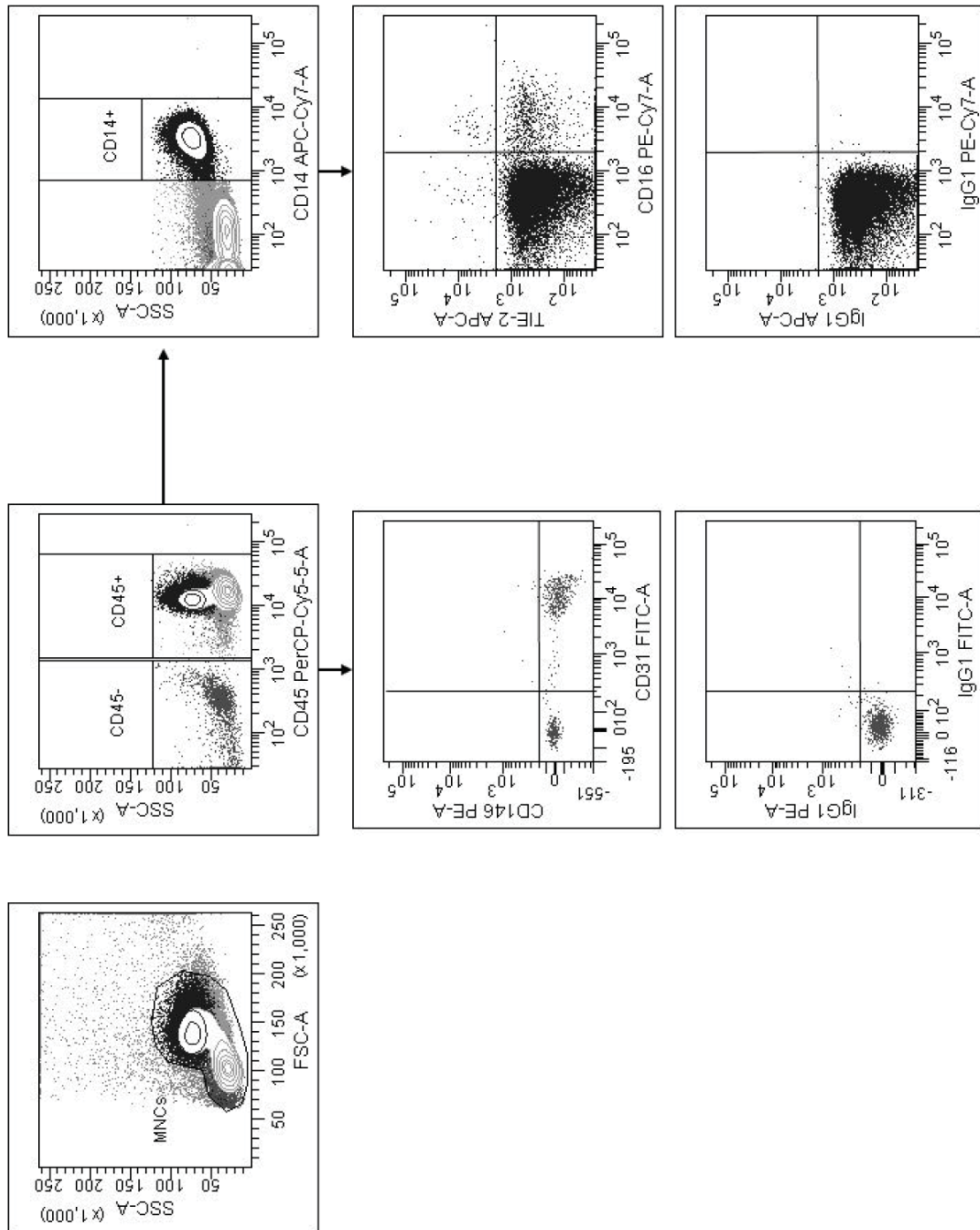


FIGURA 3

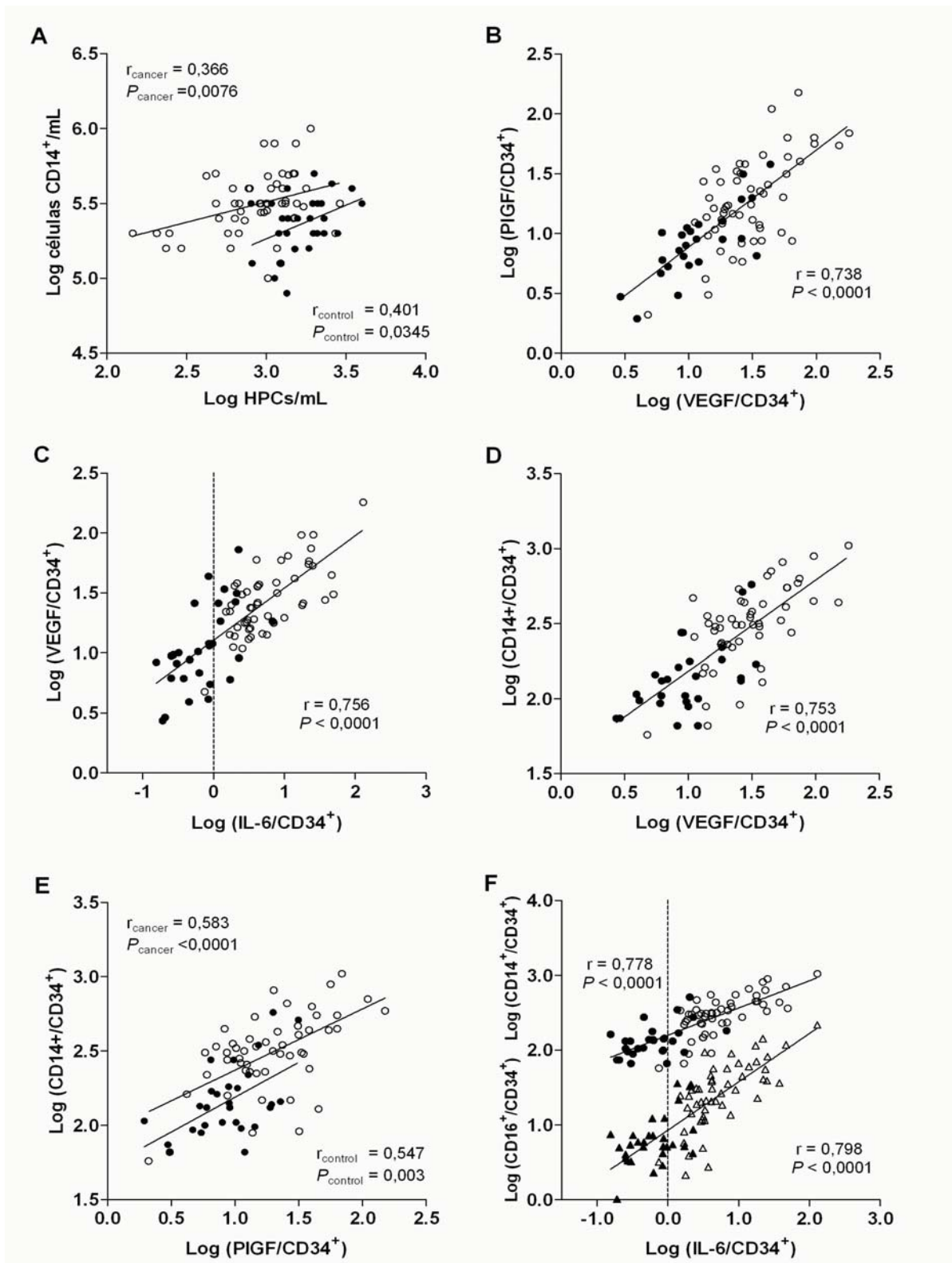


FIGURA 4

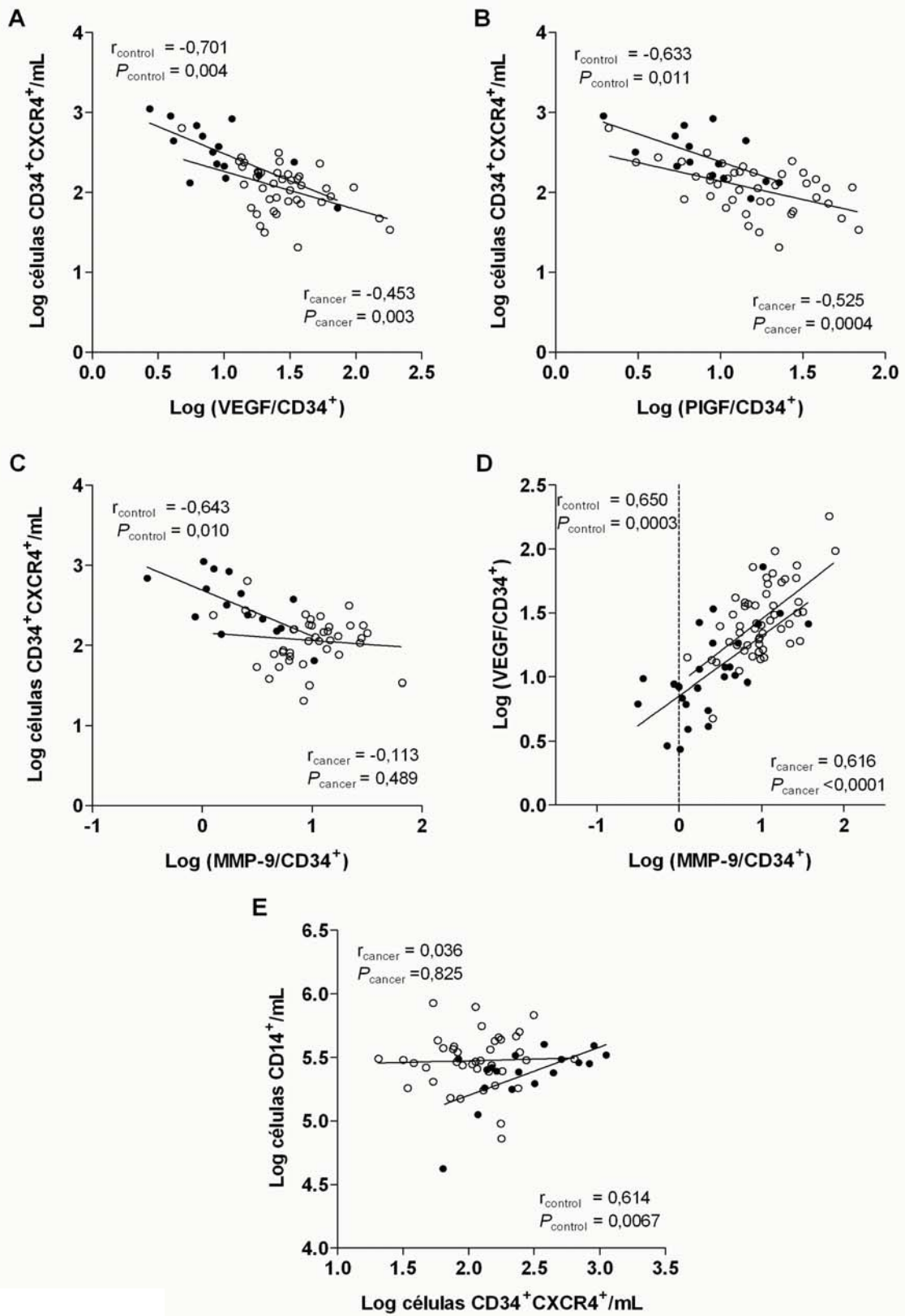
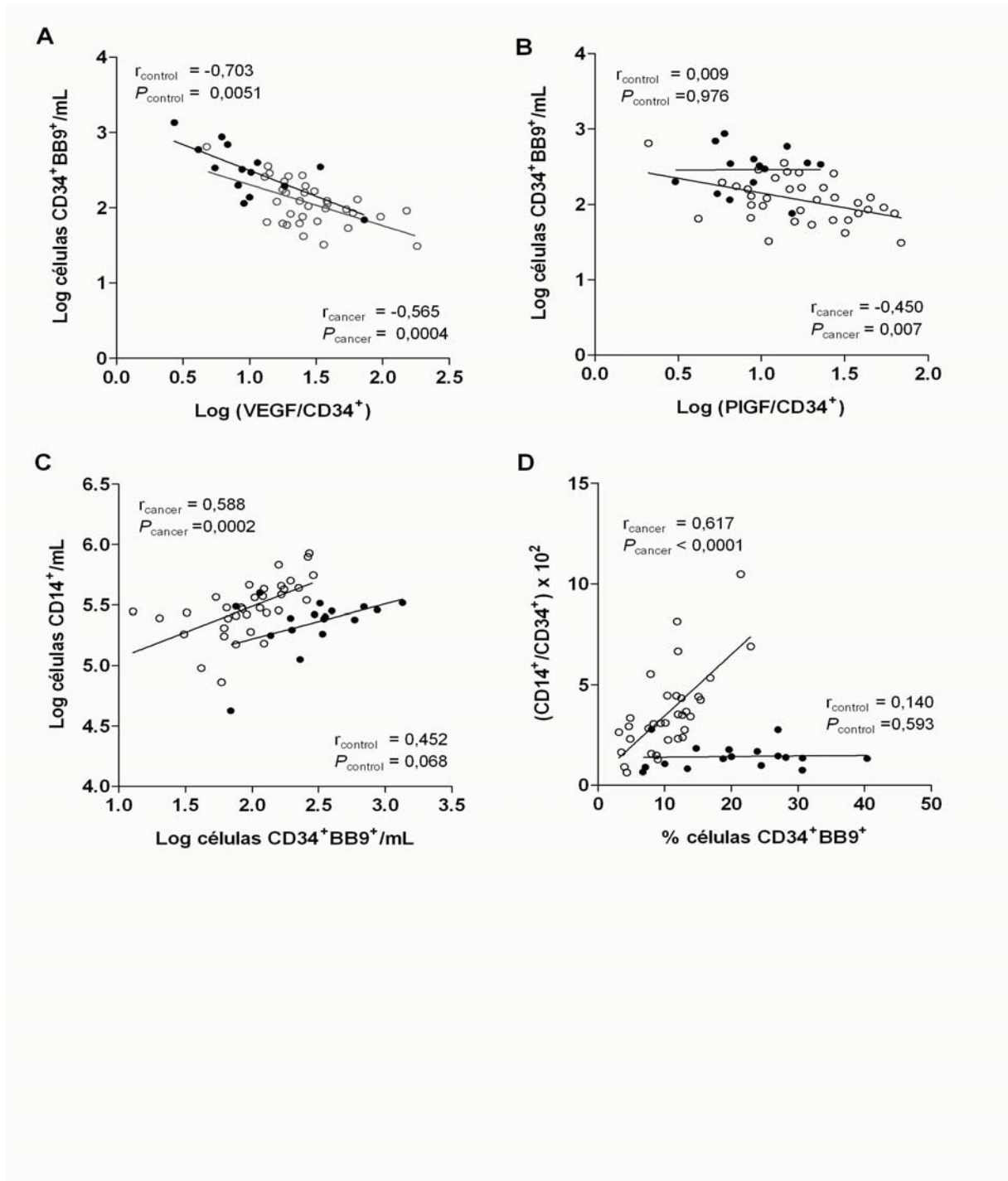


FIGURA 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031698

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZAMBIDIS E. T. et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. Blood. 01.11.2008, Vol. 112, N° 9, páginas 3601-3614 (todo el documento)	1-11
A	US 2010/0203058 A1 (INGRAM ET AL) 12.08.2010, (todo el documento)	1-11
A	DUDA D. G. et al. Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy. Journal of Clinical Oncology. 20.03.2006, Vol. 24, N° 9, páginas 1449-1453 (todo el documento)	1-11
A	DOME B. et al. Circulating endothelial cells, bone marrow-derived endothelial progenitor cells and proangiogenic hematopoietic cells in cancer: from biology to therapy. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2009, Vol. 69, páginas 108-124 (todo el documento)	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.06.2012

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201031698

②² Fecha de presentación de la solicitud: 18.11.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HRISTOV M. et al. An optimized flow cytometry protocol for analysis of angiogenic monocytes and endothelial progenitor cells in peripheral blood. Cytometry Part A. 2009, Vol. 75A, páginas 848-853 (todo el documento)	1-11
A	MANCUSO P. et al. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. Blood. 2001, Vol. 97, páginas 3658-3661 (todo el documento)	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
01.06.2012

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, XPESP, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.06.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZAMBIDIS E. T. et al. Blood. Vol. 112, Nº 9, páginas 3601-3614	01.11.2008
D02	US 2010/0203058 A1	12.08.2010
D03	DUDA D. G. et al. Journal of Clinical Oncology. Vol. 24, Nº 9, páginas 1449-1453	20.03.2006
D04	DOME B. et al. Critical Reviews in Oncology/hematology. Vol. 69, páginas 108-124	2009
D05	HRISTOV M. et al. Cytometry Part A. Vol. 75A, páginas 848-853	2009
D06	MANCUSO P. et al. Blood. Vol. 97, páginas 3658-3661	2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención tiene por objeto un método para la detección de neoangiogénesis tumoral que comprende las etapas de: a) obtener una muestra de sangre aislada de un individuo; b) obtener células nucleadas de la muestra; c) determinar el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes, el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes y el porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) en las células nucleadas de la muestra de sangre; d) comparar la proporción entre el nivel de monocitos CD14⁺ circulantes dividido por el nivel de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes con respecto al porcentaje de células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺ circulantes que expresan el antígeno ACE/BB9 (CD143) con los valores obtenidos para individuos control o individuos sanos (reivindicaciones 1 a 3). También tiene por objeto el inmunoensayo que se utiliza en la etapa c) (reivindicaciones 4 a 7), el kit para la detección de neoangiogénesis tumoral (reivindicaciones 8 y 9) y el uso del método mencionado para la detección de neoangiogénesis tumoral asociada con cáncer colorrectal (reivindicaciones 10 y 11).

D01 explica que la enzima convertidora de angiotensina, reguladora de la presión sanguínea, la angiogénesis y la inflamación, es un nuevo marcador para distinguir hemangioblastos diferenciados a partir de células madre embrionarias humanas. Hemangioblastos ACE⁺CD45⁻CD34^{+/-} son progenitores comunes para las células endoteliales y linfematopoyéticas humanas. La expresión de BB9/ACE identifica a las células hematopoyéticas emergentes tanto CD34⁺ como CD34⁻. ACE y su producto enzimático han surgido como importantes biomarcadores de angiogénesis, inflamación, progresión tumoral y hematopoyesis.

D02 divulga métodos y composiciones para la detección, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades arteriales basados en células madre y progenitoras hematopoyéticas, proangiogénicas y no angiogénicas, y en células endoteliales formadoras de colonias. Un método para diagnosticar cáncer o enfermedad vascular periférica (PVD) consiste en analizar la relación entre células madre y progenitoras hematopoyéticas, proangiogénicas y no angiogénicas, de modo que si la relación es elevada el individuo padece cáncer y si es baja padece PVD, en comparación con niveles de referencia. Para ello se utiliza la citometría de flujo. Como marcadores proangiogénicos se determina CD133⁺CD45^{dim}CD34⁺CD31⁺AC133⁺CD14⁻LIVE/DEAD⁻CD41a⁻ y como marcadores no angiogénicos CD133⁻CD45^{dim}CD34⁺CD31⁺AC133⁻CD14⁻LIVE/DEAD⁻CD41a⁻.

D03 determina que en sangre periférica de los pacientes con cáncer rectal el 90% de las células CD146 son células hematopoyéticas CD45⁺. La expresión de CD146 fue detectada principalmente en los linfocitos CD3⁺CD4⁺ y no se detectó en las células progenitoras CD34⁺CD133⁺CD45^{dim} ni en las células endoteliales CD31^{bright}CD45⁻.

D04 expone que las células progenitoras endoteliales (EPCs) y las células hematopoyéticas proangiogénicas (HCs) participan en la vascularización de los tumores ejerciendo un efecto sinérgico con la angiogénesis y, así mismo, las células endoteliales circulantes (CECs) también intervienen en la vascularización. Revisa la biología de estos tipos celulares y su posible utilidad en oncología clínica. Las CECs se pueden analizar mediante citometría de flujo utilizando 4 marcadores de superficie CD31, CD34, CD133 y CD45 (CD31^{bright}CD34⁺CD133⁻CD45⁻). Las EPCs son CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁻.

D05 ensaya el número de monocitos angiogénicos Tie2⁺CD14⁺CD16^{mid} y EPCs CD34⁺VEGFR2⁺CD45^{low/-} en sangre periférica de pacientes con enfermedad coronaria mediante citometría de flujo. Este protocolo puede ser la base de un análisis clínico estandarizado de estas poblaciones celulares para el diagnóstico/pronóstico de angiogénesis tumoral.

D06 desarrolla un procedimiento para medir, mediante citometría de flujo, CECs y CEPs en pacientes con cáncer. Para cada población celular se utilizan diferentes marcadores. En el caso de las CECs inactivas: CD45⁻P1H12⁺CD31⁺CD34⁺CD105⁻CD106⁻CD133⁻. Para las CECs activadas: CD45⁺P1H12⁺CD31⁺CD34⁺CD105⁺CD106⁺CD133⁻. Para las CEPs: CD133⁺.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos citados exponen métodos para la detección de neoangiogénesis tumoral mediante el análisis por citometría de flujo de diversos tipos celulares. Tanto las poblaciones celulares analizadas como los marcadores utilizados para llevar a cabo dicho análisis son los mismos que los que tiene por objeto la presente solicitud. Sin embargo, en la documentación y bases de datos que han sido consultadas, no se ha encontrado que se determine específicamente la correlación entre la proporción de CD14+/CD34+ y el porcentaje de células precursoras hematopoyéticas CD34+ que expresan BB9. Por lo tanto, las reivindicaciones de la 1 a la 11 se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica y presentan actividad inventiva.