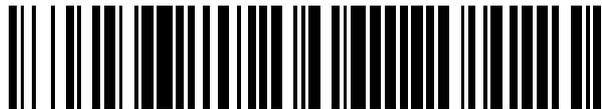


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 467**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2009 PCT/US2009/038226**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09120767**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2009 E 09725711 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 2279266**

54 Título: **Un método para detectar aberraciones de igf1r en células tumorales circulantes usando hfis**

30 Prioridad:

25.03.2008 US 39162 P

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

02.02.2018

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
700 US Highway 202
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**FOULK, BRAD y
TERSTAPPEN, LEON, W.M.M.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 652 467 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**Un método para detectar aberraciones de igf1r en células tumorales circulantes usando hfis****Antecedentes de la invención****5 Campo de la invención**

La invención se refiere generalmente a los campos de oncología y diagnóstico por imágenes. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para la detección de cáncer y para evaluar regímenes de tratamiento en pacientes.

10

Técnica anterior

A pesar de los esfuerzos para mejorar el tratamiento y gestión de pacientes de cáncer, la supervivencia en pacientes de cáncer no ha mejorado durante las últimas dos décadas para muchos tipos de cáncer. Por consiguiente, la mayor parte de los pacientes de cáncer no mueren por su tumor primario, sino que en su lugar sucumben a metástasis: múltiples colonias tumorales extendidas establecidas por células malignas que se separan del tumor original y se desplazan a lo largo del cuerpo, a menudo a sitios distantes. La estrategia terapéutica más exitosa en cáncer es la detección temprana y la extracción quirúrgica del tumor mientras el órgano está confinado. La detección temprana de cáncer ha demostrado ser factible para algunos cánceres, particularmente donde existen pruebas de diagnóstico apropiadas como exámenes Papanicolau en cáncer cervical, mamografía en cáncer de mama, y antígeno específico de próstata (AEP) en cáncer de próstata. Sin embargo, muchos cánceres detectados en etapas tempranas han establecido micrometástasis antes de la extirpación quirúrgica. Así, la determinación temprana y precisa del potencial maligno del cáncer es importante para la selección de una terapia apropiada.

25

La terapia óptima se basará en una combinación de información diagnóstica y de pronóstico. Una prueba diagnóstica precisa y reproducible es necesaria para proporcionar información específica en relación con la naturaleza metastásica de un cáncer particular, junto con una evaluación de pronóstico que proporcionará información específica en relación con la supervivencia.

30

Una prueba de pronóstico apropiadamente diseñada dará al médico información sobre el riesgo y la probabilidad de supervivencia, lo que a su vez dará al paciente el beneficio de no tener que sufrir un tratamiento no necesario. La moral del paciente también se levantará al conocer que una terapia seleccionada será efectiva en base a la prueba de pronóstico. Los ahorros de costes asociados con tal prueba podrían ser significativos ya que al médico se le proporcionará la lógica para sustituir terapias inefectivas. Un banco de datos de diagnóstico y pronóstico apropiadamente desarrollados en el tratamiento y detección de cáncer metastásico centrado en la supervivencia proporcionará obviamente un enorme beneficio a la medicina (US 6.063.586).

35

Si un tumor primario se detecta lo suficientemente pronto, puede a menudo eliminarse mediante cirugía, radiación o quimioterapia o combinaciones de estos tratamientos. Desafortunadamente, las colonias metastásicas son difíciles de detectar y a menudo es imposible tatar todas ellas de manera exitosa. Por lo tanto, desde un punto de vista clínico, la metástasis puede considerarse el hecho concluyente en la progresión natural de cáncer. Además, la habilidad para metastatizar es una propiedad que únicamente caracteriza a un tumor maligno.

40

La detección de células tumorales intactas en sangre proporciona un enlace directo con enfermedad metastásica recurrente en pacientes de cáncer que han sido sometidos a extirpación de su tumor primario. Desafortunadamente, la misma propagación de células malignas continúa perdiéndose mediante procedimientos convencionales en etapas tumorales. Estudios recientes han demostrado que la presencia de carcinoma de una única célula en la médula ósea de pacientes de cáncer es un factor pronóstico independiente para recaída metastásica (Diel IJ, Kaufman M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G. Detección de célula tumorales en médula ósea de paciente con cáncer primario de mama: un factor pronóstico para metástasis distante. J Clin Oncol, 10: 1534-1539, 1992). Pero estas técnicas invasivas son consideradas indeseables o inaceptables para ensayos clínicos rutinarios o múltiples en comparación con la detección de células tumorales epiteliales diseminadas en sangre.

50

Los métodos para la caracterización de no solamente células tumorales, sino también células raras, u otras entidades biológicas de muestra biológicas se han descrito previamente (US 6.365.362). Este método de dos etapas requiere un enriquecimiento eficiente para asegurar la adquisición de células dianas mientras se eliminan una cantidad sustancial de desechos y otras sustancias interferentes antes del análisis, permitiendo el examen celular mediante técnicas de imágenes. El método combina elementos de enriquecimiento inmunomagnético con citometría de flujo con múltiples parámetros, análisis con microscopio e inmunocitoquímica de un modo únicamente automatizado. El método de combinación se usa para enriquecer y enumerar células epiteliales en muestras de sangre, proporcionando así una herramienta para medir cáncer.

60

El método de dos etapas tiene aplicaciones en pronóstico de cáncer y supervivencia para pacientes con cáncer metastásico (WO 04076643). En base a la presencia de células cancerígenas circulantes morfológicamente intactas en sangre, este método es capaz de correlacionar la presencia de células cancerígenas circulantes de pacientes con cáncer de mama metastásico con el tiempo para la progresión de la enfermedad y supervivencia. Más

65

específicamente, la presencia de cinco (5) o más células tumorales circulantes por 7,5 milímetros proporciona un valor predictivo en el primer control, proporcionando así un indicador de pronóstico temprano de la supervivencia del paciente.

5 La especificidad del ensayo descrito anteriormente aumenta con el número de células detectadas y no es suficiente en casos donde solamente se detectan pocas (generalmente menos de 5) células tumorales circulantes. Una solución a este problema es proporcionar información genética detallada sobre células cancerígenas sospechosas. Por consiguiente, un método que incorporará enriquecimiento de una muestra de sangre con citometría por imágenes con múltiples parámetros y análisis genéticos con múltiples parámetros en una célula cancerígena sospechosa individual proporcionará un perfil completo y un mecanismo confirmatorio para mejorar significativamente los procedimientos actuales para análisis de pacientes, evaluación de recurrencia de enfermedad o supervivencia general.

15 La hibridación fluorescente in situ (HFIS) se ha descrito como un único modo de análisis en detección de células raras después de enriquecimiento como el descrito en WO 00/60119; Meng et al. PNAS 101 (25): 9393-9398 (2004); Fehm et al. Clin Can Res 8: 2073-2084 (2002). Después del enriquecimiento celular epitelial, las células capturadas se analizan mediante métodos conocidos de hibridación y se representan en imágenes en una lámina de microscopio. Debido a las variaciones técnicas inherentes y a una falta de confirmación satisfactoria de la información genética, el patrón de hibridación solo no proporciona un nivel de confianza clínica que sería necesario para análisis sensible, como en muestras de evaluación con menos de 5 células dianas. Además, este método para análisis HFIS es difícil de automatizar.

25 Los métodos basados en hibridación de enlace con inmunoquímica en el análisis de células individuales se han descrito previamente (US 6.524.798). La evaluación fenotípica y genotípica simultánea de células individuales requiere que las características fenotípicas permanezcan estables después de las etapas preparatorias de hibridación in situ y se limitan a la elección de etiquetas detectables. Típicamente, los ensayos convencionales de hibridación in situ requieren las siguientes etapas: (1) desnaturalización con calor a alcali; (2) una etapa opcional para reducir el enlace no específico; (3) hibridación de uno o más sondas de ácido nucleico con la secuencia diana de ácido nucleico; (4) retirada de fragmentos de ácido nucleico no unidos; y (5) detección de las sondas hibridadas. Los reactivos usados para completar una o más de estas etapas (esto es, lavado de metanol) alterará el reconocimiento de antígeno en inmunocitoquímica posterior, provocará pequeños cambios en la posición de células dianas o retirará por completo las células dianas, lo que introduce la posibilidad de caracterización incorrecta de células sospechosas.

35 La habilidad para reconocer células raras circulantes combinando análisis fenotípicos y genotípicos con múltiples parámetros de una célula diana individualmente aislada proporcionará la confirmación al médico de cualquier información cuantitativa requerida. Esto es especialmente relevante cuando los estados de la enfermedad se evalúan usando números extremadamente pequeños (1, 2, 3 o 4) de células tumorales circulantes (CTCs) proporcionando una confirmación para detección temprana de enfermedad.

40 Los conjuntos de sondas y los métodos para análisis HFIS con múltiples parámetros se han descrito en cáncer de pulmón (US 20030087248). También se ha descrito una combinación de 3 sondas que da como resultado un 95% de sensibilidad en la detección de cáncer de vejiga en pacientes, véase US 6.376.188; US 6.174.681. Estos métodos carecen de especificidad y sensibilidad para evaluar números pequeños de células dianas, y por lo tanto una evaluación confirmatoria para detección temprana de estado enfermo. Tampoco proporcionan medios para automatización conveniente.

50 Una sonda recientemente descrita elimina las secuencias repetitivas de ADN para proporcionar una secuencia libre de repeticiones. Las sondas libres de repeticiones funcionan como sondas de hibridación sin el uso de ADN bloqueante o la necesidad de secuencias de ADN bloqueante no deseadas (WO 07/053245).

55 Los niveles altos de expresión IGF-1 se han asociado con un aumento de riesgo en cánceres tales como pulmón, mama, próstata y colorrectal, en comparación con individuos con niveles más bajos de IGF-1. Además, hay una evidencia considerable de un papel para IGF-1 y/o IGF-1R en el mantenimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo*. Los niveles IGF-1R se elevan en tumores de pulmón (Kaiser et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 119: 665-668, 1993; Moody et al., Life Sciences 52: 1161-1173, 1993; Macauley et al., Cancer Res., 50: 2511-2517, 1990), mama (Pollak et al., Cancer Lett. 38: 223-230, 1987; Foekens et al., Cancer Res. 49: 7002-7009, 1989; Arteaga et al., J. Clin. Invest. 84: 1418-1423, 1989), próstata y colon (Remaole-Bennet et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 75: 609-616, 1992; Guo et al., Gastroenterol. 102: 1101-1108, 1992). La expresión desregulada de IGF-1 en epitelio prostático lleva a neoplasia en ratones transgénicos (DiGiovanni et al., Proc. Nat'l.Acad. Sci. USA 97: 3455-3460, 2000). Además, IGF-1 parece ser un estimulador autocrino de gliomas humanos (Sandberg-Nordqvist et al., Cancer Res. 53 (11): 2475-78, 1993), mientras IGF-1 ha demostrado estimular el crecimiento de fibrosarcomas que sobreexpresan IGF-1R (Butler et al., Cancer Res. 58: 3021-3027, 1998). Para un análisis del papel que juega la interacción IGF-1/IGF-1R en el crecimiento de una variedad de tumores humanos, véase Macaulay, Br. J. Cancer, 65: 311-20, 1992.

El uso de vectores de expresión anti-sentido u oligonucleótidos anti-sentido con ARN IGF-1R ha demostrado que la interferencia con IGF-1R lleva a la inhibición de crecimiento celular mediado por IGF-1 (véase, por ejemplo, Wraight et al., *Nat. Biotech.* 18:521-526, 2000). El crecimiento también puede inhibirse usando análogos peptídicos de IGF-1 (Pietrzowski et al., *Cell Growth & Diff.* 3: 199-205, 1992; Pietrzowski et al., *Mol. Cell. Biol.* 12: 3883-3889, 1992), o un vector que expresa un ARN anti-sentido para ARN IGF-1 (Trojan et al., *Science* 259: 94-97, 1992). Además, los anticuerpos para IGF-1R (Arteaga et al., *Breast Canc. Res. Treatm.* 22: 101-106, 1992; and Kalebic et al., *Cancer Res.* 54: 5531-34, 1994), y los mutantes dominantes negativos de IGF-1R (Prager et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 2181-85, 1994; Li et al., *J. Biol. Chem.* 269: 32558-2564, 1994; Jiang et al., *Oncogene* 18: 6071-6077, 1999), pueden invertir el fenotipo transformado, inhibir tumorigénesis e inducir pérdida del fenotipo metastático.

IGF-1 es también importante en la regulación de apoptosis. La apoptosis, que es una muerte celular programada, está incluida en una amplia variedad de procesos de desarrollo, incluyendo la maduración del sistema inmune y nervioso. Además de su papel en el desarrollo, la apoptosis ha estado implicada como una garantía celular importante contra tumorigénesis (Williams, *Cell* 65: 1097-1098, 1991; Lane, *Nature* 362: 786-787, 1993). La supresión del programa apoptótico puede contribuir al desarrollo y progresión de malignidades.

Algunos estudios sugieren que la expresión de niveles de IGF-1R se correlaciona con resultados clínicos. En modelos tumorales, IGF-1R modula la proliferación celular, supervivencia y metástasis e induce a la resistencia en terapias dirigidas. La inhibición de IGF-1R aumenta de manera significativa la actividad de agentes citotóxicos (Cohen, B. et al., *Clin. Cancer. Res.* 11(5): 2063-73). La inhibición de señalización de IGF-1R parece ser por lo tanto una estrategia prometedora para el desarrollo de terapias nuevas para cáncer.

La detección de expresión de IGF-1R en la superficie de CTCs se ha asociado con la predicción de eficacia de terapia antagonista de IGF-1R en paciente de cáncer (WO 07/141626). Sin embargo, este método carece de habilidad de examinar directamente la disposición cromosómica en una célula tumoral individual. El análisis del gen IGF-1R proporcionará información sobre el estado apoptótico o proliferativo de células tumorales individuales que expresan IGF-1R, dando por lo tanto un resultado de una evaluación más específica de tumorigénesis.

Además, un método que permitirá evaluar tanto la presencia de IGF-1R como cualquier aberración cromosómica, unido a la habilidad de detectar la expresión en la superficie de IGF-1R, dará como resultado un índice más directo de aneuploidía en células tumorales circulantes que expresan IGF-1R. Esto, a su vez, permite un diagnóstico más específico y sensible y una evaluación de la progresión de la enfermedad.

WO 2007/053245 describe métodos y composiciones para obtener sondas de ADN de secuencia única, y tanto la conservación como el análisis genético de células que se han identificado después de la selección inmunomagnética y el etiquetado fluorescente.

Adelaide, J. et al. (1007), *Cancer Research*, Asociación Americana para investigación en cáncer US, describe el análisis de número de copias de genomas y la expresión genética en cáncer de mama humano.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método directo para evaluar la disposición cromosómica en células tumorales circulantes IGF-1R, donde el método evalúa las aberraciones genéticas de IGF-1R en células tumorales circulantes de una muestra de sangre obtenida de un paciente, comprendiendo dicha muestra una población celular mezclada de células tumorales circulantes contenidas. Un método de análisis más directo ayudará a los médicos a predecir el beneficio de terapia con IGF-1R en pacientes de cáncer, y proporcionar un diagnóstico más específico en estos pacientes. El método comprende: a) aislar una subpoblación de células epiteliales mediante enriquecimiento inmunomagnético y b) identificar células tumorales circulantes sospechosas; y c) hibridar dichas células tumorales circulantes sospechosas con una configuración de sonda libre de repeticiones IGF-1R capaz de detectar aberraciones cromosómicas que consistente en secuencias de clones que contiene al menos una parte del lugar de IGF-1R y una hibridación cruzada carente de sondas libres de repeticiones específica para la región q1 del cromosoma 15.

La presente invención proporciona un kit para determinar aberraciones de gen IGF-1R en células tumorales circulantes de una muestra de un paciente que comprende: a) una configuración de sonda libre de repeticiones IGF-1R capaz de detectar aberraciones cromosómicas que consiste en secuencias de clones que contienen al menos una parte del lugar de IGF-1R; y b) una sonda libre de repeticiones que carece de hibridación cruzada específica para la región q1 del cromosoma 15; y c) etiquetar fracciones unidas a dicho (a) y (b).

La presente invención proporciona además un kit para analizar muestras de un paciente para la presencia de células tumorales circulantes que expresan IGF-1R que comprende: a) nanopartículas magnéticas cubiertas que comprenden un material central magnético, un material de capa base de proteína y un anticuerpo que se une específicamente a células tumorales de origen celular epitelial, estando el anticuerpo unido directa o indirectamente a dicho material de capa base; b) un tinte celular para excluir los componentes de la muestra de otros de las células

tumorales para análisis; c) una sonda de enumeración de satélite para enumeración de cromosomas y detección de aneuploidía; y d) una sonda libre de repeticiones capaz de definir el lugar del gen IGF-1R.

Breve descripción de los dibujos

- 5 Figura 1: Representación esquemática que representa la generación de sondas de ADN carentes de repetición desde BAC que comienzan ADN. Una biblioteca de amplificación de genoma completo fragmentado se desnaturaliza y se deja recocer en presencia de exceso de ADN Cot. La digestión DSN de ADN de doble hélice da como resultado una mezcla de secuencia única de único hélice, disponible como una plantilla para producción de sondas.
- 10 Figura 2: Diagrama que muestra la localización de dos clones usados para identificar el gen IGF-1R. La sonda de IGF-1R se diseñó seleccionando clones BAC que contienen secuencias que rodean el lugar IGF-1R.
- 15 Figura 3: Se representa el mapeo de clones IGF-1R de ADN libres de repetición. Los clones IGF-1R se hibridan con cromosomas de metafase humanos normales (ROJO) junto con sonda de control de satélite de cromosoma 17 (VERDE).
- 20 Figura 4: Imagen de la sonda de satélite alfa para cromosoma 15 (SE-15) se muestra en el lugar IGF-1R. Los clones IGF1R libres de repetición (ROJO) se juntaron con la sonda SE-15 (VERDE) y se hibridan con propagaciones de cromosoma de metafase normal.
- Figura 5: Hibridación de la configuración de sonda IGF-1R en células LNCAP (derecha) y células BT474 (izquierda).
- 25 Figura 6: Diagrama que muestra la localización relativa de sondas usadas en combinación. Los dos clones fueron sondas libres de repetición, con etiquetas fluorescentes (ROJO) mapeadas usando la sonda IGF-1R (AZUL) como referencia.
- Figura 7: Se usan los espectros de los fluorocromos usados en el ensayo. ULS DY415 se usó para IGF-1R.
- 30 Figura 8: Imágenes de siete líneas celulares evaluadas con la sonda IGF-1R, demostrando que la sonda es capaz de detectar aberraciones cromosómicas.
- Figura 9: La habilidad para marcar imágenes adquirida en el instrumento CellTracks se muestra en la figura. Las imágenes del instrumento CellTracks se comparan con un microscopio de fluorescencia estándar.
- 35 Figura 10: Imagen de una captura de pantalla de software HFIS usado en la clasificación de resultados HFIS. La fila superior muestra las imágenes originales del escáner CTC, CK+; DAPI+/CD45- y CTC. La fila inferior muestra una CTC con un número aberrante de IGF-1R y sondas de cromosoma 15.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención incorpora el aislamiento e identificación de células tumorales circulantes usando enriquecimiento inmunomagnético y análisis por imagen unido a hibridación fluorescente *in situ* (HFIS) con el fin de detectar IGF-IR en células tumorales que tienen perfiles genéticos aberrantes.

50 Con este fin, el sistema CellTracks utiliza una selección y separación inmunomagnética para enriquecer altamente y concentrar cualquier célula epitelial presente en muestras de sangre total. Las células capturadas se etiquetan de manera detectable con un marcador específico de leucocito y con uno más anticuerpos monoclonales específicos de célula tumoral para permitir la identificación y enumeración de las CTC capturadas así como instrumental inequívoco o diferenciación visual de células no dianas contaminantes. Con una sensibilidad extraordinaria de 1 o 2 células epiteliales por 7,5-30 ml de sangre, este ensayo permite la detección de células tumorales incluso en las fases tempranas de baja masa tumoral. La realización de la presente invención no se limita al sistema CellTracks, sino que incluye cualquier protocolo de aislamiento e imágenes de sensibilidad y especificidad comparable.

55 El ADN contiene secuencias tanto únicas como repetitivas. Las secuencias repetitivas ocurren a lo largo de los cromosomas y tienen el potencial de interferir con las reacciones de hibridación, como con hibridación *in situ*, dirigida hacia regiones específicas o secuencias únicas fuera de estas secuencias repetitivas. Para identificar la presencia, la cantidad y localización de secuencias específicas en cromosomas, genes o secuencias de ADN, es importante que las sondas de hibridación se hibriden solamente en la localización de interés. La presencia de secuencias repetitivas en la mezcla de sonda de hibridación reduce la especificidad del enlace, requiriendo métodos para retirar las secuencias repetitivas de las sondas o prevenir que las sondas se hibriden con las secuencias repetitivas de la diana. Por ejemplo, ADN Cot-1 a menudo se añade durante la hibridación para prevenir el enlace de las sondas con secuencias repetitivas (US 5.447.841 y US 6.596.479).

65

Un diagrama general para la generación de sondas de ADN carentes de repeticiones se representa en la Figura 1. Las nucleasas específicas dúplex (NED) que preferentemente parten las moléculas de ácido desoxirribonucleico (US 2005/0164216 y US 6.541.204) parten preferentemente polinucleótidos dúplex de ácido nucleico y en comparación con ADN de único hélice proporcionan un medio para retirar ADN de doble hélice que no es diana de la mezcla de la muestra. La habilidad de estas nucleasas para digerir preferentemente la forma dúplex de polinucleótidos proporciona un uso potencial en la fabricación de una sonda específica diana única, eliminando el efecto interferente de bloquear ADN y proporcionando un medio para una producción rápida, eficiente y rentable.

El ADN de inicio tiene típicamente la forma de una o más secuencias de ADN que contienen una multiplicidad de segmentos de ADN. La fuente inicial de material individual de inicio en la producción de la composición de la sonda se ha descrito en la producción de sondas etiquetadas directas (US 6.569.626). Óptimamente, la fuente del polinucleótido de inicio se purifica del tejido y se fragmenta en segmentos de 150 kb a 200 kb, usando cualquier técnica conocida como tratamiento con enzima (eximas de restricción), polimerasas, digestión limitada con ADNasa I, digestión limitada con nucleasa de frijol mungo, sonicación, corte de ADN y similares. Algunos de estos fragmentos segmentales serán complementarios al menos con una parte de uno o más segmentos de ADN en la secuencia diana única particular.

Los segmentos individuales de ADN se propagan mediante métodos comúnmente conocidos, como clonación de una construcción de plásmido y después transfección a bacterias.

Después de la propagación de los fragmentos clonados, las colonias individuales que representan fragmentos aislados se identifican por contener al menos una parte de la secuencia de interés. La identificación se lleva a cabo mediante técnicas conocidas tales como hibridación, PCR o búsqueda de bases de datos conocidas de bibliotecas comercialmente disponibles. Cada colonia elegida crece para obtener una construcción de plásmido aislado que tiene un fragmento único, al menos parcialmente complementario con un segmento de la secuencia diana en el cromosoma (por ejemplo, clones BAC).

Una vez que los fragmentos clonados de interés se propagan y aíslan, se les reduce sus secuencias repetitivas de polinucleótido. Usando amplificación de genoma completo (AGC), los fragmentos se amplifican hasta segmentos de 200 a 500 bp desde las construcciones de plásmido aislado. ADN Cot-1 se combina con el grupo de biblioteca ACG después de amplificación primero calentando a 95°C para desnaturalizar el polinucleótido de doble hélice en un estado de único hélice y después templando a 65°C para permitir que las secuencias de repetición se vuelvan a recocer de manera selectiva. Las nucleasas específicas dúplex (NED) bajo condiciones optimizadas de NED de añaden después para partir preferentemente moléculas de ácido desoxirribonucleico que contienen dúplex de ácido nucleico perfectamente combinados mientras no afectan a ningún segmento de único hélice restante. La partición selectiva del ácido nucleico dúplex se lleva a cabo mediante digestión enzimática de dúplex ADN-ADN y dúplex ADN-ARN. NED aislado de cangrejo de Kamchatka (US 10/845.366) o gamba (US 6.541.204) retira la estructura dúplex. El uso de nucleasas específicas de endonucleasa hidroliza un enlace fosfodiéster en el segmento central de ADN dúplex, proporcionando la ventaja de no ser específico de secuencia de nucleótido y por lo tanto aplicable a la mayoría de dianas de interés. La digestión de NED proporciona la retirada de una cantidad sustancial del dúplex de ácido nucleico para amplificación posterior del resto de polinucleótido de único hélice. La digestión resultante contiene ADN de único hélice, correspondiente a partes de la secuencia diana única en el cromosoma, una cantidad de ADN de doble hélice no digerido y parejas bases digeridas. ADN no digerido se separa de ADN digerido y de NED mediante centrifugación (esto es, cromatografía de columna con giros). La mezcla se usa inmediatamente o se almacena a 80°C, bien antes o después de la amplificación de la composición purificada para utilización posterior como etiquetado e hibridación *in situ*. Después de la amplificación, la secuencia de sonda diana se amplifica mediante PCR produciendo de 90% a 99% de secuencia de sonda diana pura, y ADN designado carente de repeticiones.

Las sondas resultantes se incorporan en los métodos representados en la presente invención. ADN carente de repeticiones, como se ha descrito en la presente invención, es útil para hibridación *in situ*, incluyendo HFIS como se aplica a gen IGF-1R en CTC sospechosas. El requisito de enlace competitivo se elimina usando sondas carentes de repeticiones descritas en esta invención, da como resultado una mayor especificidad y una reducción en la cantidad de sondas necesarias para enlace.

Re-análisis de células etiquetadas inmunomagnéticamente

La aneuploidía cromosómica se asocia con trastornos genéticos, particularmente cáncer. Hay disponibles métodos de diagnóstico que proporcionan la detección de estas anomalías cromosómicas particularmente con el uso de hibridación *in situ* (HIS). La aplicación de HIS e inmunocitoquímica (ICC) en muestras de tejido o célula se ha establecido de manera correcta, pero no está clara la necesidad de establecer un método diagnósticamente efectivo para el análisis simultáneo de HIS e ICC en una única célula. La presente invención proporciona la detección de estas anomalías cromosómicas en células individuales cuando se relacionan con el lugar IGF-1R en células cancerígenas usando medios rentables y altamente específicos.

Un aspecto de la presente invención incluye el procesamiento adicional de células raras después de enriquecimiento y análisis inmunocitoquímico (ICC). Por ejemplo, células circulantes raras tales como células epiteliales se identifican como células cancerígenas sospechosas (US 6.365.362; US 6.645.731; y US 11/202.875). Las células sospechosas se identifican por medio de antígenos celulares específicos y etiquetado de ácido nucleico. La confirmación de IGF-1R de estas células sospechosas se determina posteriormente mediante la expresión de secuencias dianas únicas específicas, definiendo un cromosoma y/o un gen, usado para evaluar cambios cromosómicos (esto es, aneuploidía) en la células sospechosa identificada. Por consiguiente, una realización de la presente invención incluye la combinación de tinción ICC y posterior confirmación mediante hibridación fluorescente in situ (HFIS) usando una sonda de enumeración satélite (SE) y una única sonda de secuencia, capaz de unirse a un gen o un grupo de genes.

El método proporciona una mayor especificidad después de enriquecimiento inmunomagnético y representación en imágenes fluorescentes de células tumorales circulantes como lo proporcionan los sistemas CellTracks®, AutoPrep® y CellTracks® Analyzer II (Veridex, LLC) y además se describe en US 6.365.362. Un método permite la designación de 1 o más CTCs como una célula cancerígena positiva IGF-1R con independencia de la fase de la enfermedad y por lo tanto reduce el umbral de llamar a una muestra positiva para CTCs. Una realización de la presente invención es la detección de la presencia o ausencia de IGF-1R como una diana terapéutica y por lo tanto proporciona un medio para tomar la elección correcta de tratamiento.

Por consiguiente, un método automatizado y estandarizado para procesamiento de muestras de sangre proporciona la identificación de células epiteliales circulantes mediante ICC. El plasma aspirado de una muestra de sangre dividida se combina con un reactivo de ferrofluido conjugado con anticuerpos específicos para una población celular diana (esto es, EpCAM positivo). Estas células se recogen inmunomagnéticamente a través de un campo magnético externamente aplicado, permitiendo la separación y retirada de células no etiquetadas.

Una vez que las células dianas se han separado, se dispensan en un cartucho desechable para análisis de imagen usando un dispositivo de presentación de imágenes (US 6.790.366 y US 6.890.426). El dispositivo se diseña para ejercer un campo magnético que orienta a las células etiquetadas a lo largo de la superficie ópticamente transparente de la cámara para una posterior representación de imágenes ICC.

Después de la representación de imágenes ICC, las células sospechosas se identifican usando algoritmos apropiados. Las imágenes de las células sospechosas se presentan al usuario que toma la decisión final sobre la identidad de las células sospechosas presentadas. Las imágenes de las células sospechosas y su posición relativa a lo largo de la superficie de visión ópticamente transparente de la cámara se registran y archivan para uso posterior.

Ya que la representación de imágenes ICC sola carece de especificidad para evaluar la significancia clínica de muestras de sangre con menos de 5 CTCs o para proporcionar información genética detallada sobre células cancerígenas sospechosas, se necesita un análisis posterior sobre células sospechosas individuales para proporcionar un perfil completo y establecer confirmación de que una células tumoral sospechosa puede usarse en análisis de diagnóstico, incluyendo la investigación, la evaluación de recurrencia de enfermedad y supervivencia general.

HFIS requiere temperatura por encima de la temperatura de fusión de ADN así como reactivos que sean compatibles con el etiquetado ICC. La mayoría de las etiquetas ICC y ADN no sobreviven al proceso de HFIS con ninguna señal perdida durante el proceso. Así, una célula que se haya identificado como células interesante para análisis HFIS no puede ser rastreada en su posición. Por lo tanto, existe la necesidad de tener un método de detección en el que una vez se haya obtenido la imagen ICC, la posición de la célula a lo largo de la superficie de visión ópticamente transparente se mantenga para análisis genético posterior (HFIS) u otros tipos de análisis donde se pierden las etiquetas ICC. Esto se consigue, en parte, fijando las células a la superficie ópticamente transparente después de obtener la imagen ICC sin una pérdida de células o cualquier movimiento sustancial a lo largo de la superficie.

Por consiguientes, después de la adición de los reactivos de HFIS, el cartucho se coloca en una placa caliente que tiene la superficie con las células inmovilizadas en contacto con la placa caliente. Dependiendo del tipo de ensayo, la placa caliente está programada con diferentes ciclos de temperatura que funcionan entre 2 y 48 horas. Después de que se hayan completado los ciclos de temperatura, los reactivos en exceso de HFIS se retiran del cartucho. El cartucho se llena con una solución tampón que contiene una etiqueta de ADN para visualizar los núcleos de células inmovilizadas. Dependiendo de la etiqueta de ADN usada, la etiqueta permanece en el cartucho o se lava fuera del cartucho después de la tinción.

Después, el cartucho se coloca de nuevo en el sistema CellTracks® Analyzer II para un segundo escáner. Debido a que las células presentes en la superficie superior durante el primer análisis de imagen ICC se inmovilizaron, las mismas células están aún en la misma localización relativa dentro del cartucho. Para evaluar el movimiento del cartucho en relación con el sistema de representación de imágenes (sistema CellTracks® Analyzer II), la localización de los núcleos de las imágenes del segundo escáner se comparan con la localización de los núcleos en imágenes del primer escáner ICC. El movimiento de estas imágenes con respecto entre sí se determina

usando algoritmos de convolución. Después de que se haya determinado este movimiento, puede seleccionarse una célula específica de interés, en base a su imagen ICC, de una lista y puede recolocarse en la superficie del cartucho después de HFIS en el segundo escáner. Después se adquieren imágenes fluorescentes de las sondas HFIS seleccionadas.

5

Ejemplo 1 – Desarrollo de un conjunto de sondas para un ensayo HFIS IGF-1R/Chr 15

Se necesitan dos tipos de sondas para el ensayo. Un tipo es una sonda de enumeración por satélite (SE). Estas sondas se unen a la secuencia satélite (repetitiva) cerca del centrómero del cromosoma y se usa para enumeración de cromosomas y detección de aneuploidía. El segundo tipo de sonda es la sonda de secuencia única. Como el nombre implica, estas sondas se unen a secuencias únicas, como genes. Usando bioinformática, las sondas de secuencia única pueden diseñarse para cualquier localización en el genoma. Las sondas de secuencia única normalmente contienen elementos repetitivos como repeticiones de Alu o Knp que pueden provocar una unión no específica de la sonda. La supresión de unión no específica se hace típicamente mediante la incorporación de ADN bloqueante no etiquetado en la hibridación. ADN bloqueante ha demostrado interferir con hibridación de sondas de secuencia única y satélite. El presente método elimina esta etapa con el uso de sondas libres de repetición que permite una hibridación más rápida y brillantes de las sondas sin los inconvenientes de usar ADN bloqueante.

10

15

20

Usando bioinformática, se diseñó una sonda IGF-1R seleccionando clones de cromosoma artificial bacteriano (BAC) que contienen secuencias que rodean el lugar de IGF1R. El diagrama en la Figura 2 muestra la localización de los dos clones con respecto al gen IGF1R. ADN BAC se propagó y aisló usando el kit Qiagen Large Construct. Los clones se mapearon con HFIS para especificidad y después se hicieron libre de repeticiones de acuerdo con el protocolo descrito. De la Figura 2, la “A” y “B” en ROJO representan los dos clones que rodean el lugar de IGF-1R. La región VERDE representa la sonda de enumeración por satélite en el cromosoma 15 (SE-15).

25

30

Los clones IGF1R se mapearon para confirmar su función. ADN amplificado libre de repeticiones para ambos clones se sometió a sonicación y se etiquetó con ULS-PlatinumBright 550 (Kreatech Diagnostics). Como se muestra en la Figura 3, los clones IGF1R (ROJO) se hibridaron con cromosomas de metafase normal humanos a lo largo de una sonda de control de satélite alfa en cromosoma 17 (VERDE). Ambos clones dieron lugar a señales brillantes en la terminal q de un cromosoma acrocéntrico del tamaño apropiado. No se vio hibridación cruzada de los clones libre de repeticiones en otros cromosomas.

35

Una sonda de satélite alfa para cromosoma 15 (SE-15) se evaluó para su uso como una sonda de referencia para el lugar de IGF-1R. Como se muestra en la Figura 4, los clones A y B (ROJO) IGF-1R libres de repeticiones se juntaron a lo largo de la sonda de centrómero SE-15 (verde) y se hibridaron con propagaciones de cromosoma de metafase normal. Las imágenes más abajo demuestran claramente que las sondas IGF1R y SE15 mapean hasta el cromosoma correcta y dan señales fuertes.

40

Ejemplo 2 – Evaluación de línea celular de la configuración de sonda IGF-1R/SE-15

La combinación de la sonda de satélite alfa para cromosoma 15 y los clones A y B de IGF-1R (IGF-1R/SE-15) se probó para evaluar aberraciones genéticas. La configuración de sonda IGF1R/SE-15 se usó en varias líneas celulares para ver si la sonda podía detectar aneuploidía o amplificación/eliminación genética. Las líneas celulares A548 (pulmón), BT474 (mama), PC3(próstata), LNCAP (próstata), H1299 (pulmón) y MCF7 (mama) se probaron para esta configuración. La imagen en la Figura 5 muestra que LNCAP tiene cuatro copias de SE-15 y cuatro copias de IGF1R, lo que indica aneuploidía sin amplificación genética. El resto de cinco líneas celulares probadas mostraron hibridación cruzada de la sonda SE-15 con otros cromosomas. Las células BT 474 contienen 2-3 copias de IGF1R y numerosas señales SE-15 lo que indican hibridación cruzada. Las otras líneas celulares tuvieron varias cantidades de hibridación cruzada de la sonda SE-15. Ya que el grado de hibridación cruzada varió entre las líneas celulares y donantes normales probados, es probable que esta hibridación cruzada se deba a las variables de donante a donante.

50

55

60

Con el fin de resolver el problema de hibridación cruzada de SE-15, la sonda IGF-1R7/SE-15 se reconfiguró con una sonda de secuencia única para un lugar en otro sitio en el cromosoma 15. Ya que es una sonda de secuencia única debería unirse a una región específica del cromosoma 15 sin los problemas de hibridación cruzada que pueden surgir usando una sonda satélite alfa como SE-15. Se seleccionaron dos clones adyacentes en la región q1 del cromosoma 15, situados cerca del centrómero en el mismo brazo del cromosoma 15 que IGF1r. El diagrama en la Figura 6 muestra la localización relativa de sondas usadas en esta configuración. Los dos clones se hicieron de acuerdo con el protocolo libre de repeticiones y se etiquetaron con fluorescente (ROJO). La sonda IGF-1R (AZUL) se usó como referencia en el mapeo. Como se muestra en la imagen, el clon Chr 15 A se mapeó con un cromosoma incorrecto. El clon Chr 15 B se mapeó correctamente con el cromosoma 15 y después se evaluó como una sonda de referencia para IGF.1R.

65

La Figura 7 muestra los espectros para fluorocromos usados como una etiqueta para las sondas. El tinte ULS-550 (Kreatech Diagnostics) se seleccionó para la sonda Chr 15 mientras que ULS DY415 se usó para IGF-1R.

La concentración óptima para cada sonda en la configuración se basó en la señal más brillante con la mejor señal para la medición de ruido. Las mezclas de hibridación consistieron en 50% formadida, 1xSSC, 10% sulfato de dextrano, 10% Kreaboost y varias concentraciones de sonda. Leucocitos fijados en cartuchos CellTracks se sometieron a HFIS durante la noche y se realizó un lavado de severo usando 24% formadida y 0,1xSSC. Las intensidades de señal y fondo se midieron adquiriendo imágenes fluorescentes de 10 células y dividiendo la intensidad del pixel más brillante (seña) por la intensidad media de varios pixeles arbitrarios en el núcleo de la célula (ruido). Las concentraciones probadas y la señal asociada con las proporciones de ruido (SNR) se enumeran en la Tabla I. Las concentraciones óptimas se han determinado para ser 4ng/ul para IGF1R y Chr 15.

Tabla I

	1ng/ul		2ng/ul		4ng/ul		6ng/ul	
	Señal	SNR	Señal	SNR	Señal	SNR	Señal	SNR
IGF1R DY415	18,1	1,9	27,5	2,5	38,9	3,2	38,8	2,7
Chr 15 DY550	22,7	1,8	35,6	2,8	41,4	2,6	38,6	2,2

Ejemplo 3 – Evaluación de configuración de sonda de muestras de donante

Después de obtener las condiciones óptimas para el ensayo que incluyó el uso de 4 ng/ul de cada sonda en la reacción, la configuración de sonda se evaluó en un total de 350 células CD45⁺/CK⁻ (leucocitos) de tres donantes diferentes y se analizaron usando el sistema HFIS de CellTracks. El número de copias de cada diana clasificada y los resultados están enumerados en las tablas más abajo. Las señales de HFIS fueron capaces de clasificarse en más del 95% de las células reubicadas por el sistema HFIS de CellTracks

La Tabla II muestra los resultados de tres donantes. Las 2 copias esperadas de IGF1R ocurrieron en el 87%, 81% y 93% de los WBC examinados de tres donantes. Se esperó que >75% de leucocitos debería mostrar el resultado esperados de 2 puntos por leucocito para IGF1R y >85% de los leucocitos evaluados deberían ser clasificables. Los tres donantes mostraron las 2 copias esperadas de Chr 15 en 91%, 97% y 93% de los leucocitos examinados. Por esta razón, se fijó una especificación de control de calidad de que >80% de leucocitos debería mostrar el resultado esperado de 2 puntos y >85% de leucocitos evaluados debería ser clasificable. Los datos son consistentes con los datos recogidos de una manera similar usando otras sondas seleccionadas.

Tabla II

Donante 887	Células evaluadas	# Células 0 copias	# Células 1 copia	# Células 2 copias	# Células 3 copias
IGF1R	128	0	14 (11%)	111 (87%)	3 (2%)
Chr 15	129	0	11 (9%)	116 (91%)	2 (2%)
Donante 888	Células evaluadas	# Células 0 copias	# Células 1 copia	# Células 2 copias	# Células 3 copias
IGF1R	32	0	6 (19%)	26 (81%)	0
Chr 15	33	0	1 (3%)	31 (97%)	1 (3%)
Donante 889	Células evaluadas	# Células 0 copias	# Células 1 copia	# Células 2 copias	# Células 3 copias
IGF1R	194	0	13 (7%)	180 (93%)	1 (1%)
Chr 15	194	0	13 (7%)	180 (93%)	1 (1%)

Ejemplo 4 – Detección de aberraciones cromosómicas

Siete líneas celulares se sometieron a ensayo con la sonda optimizada IGF-1R para demostrar que la sonda es capaz de detectar aberraciones cromosómicas. Como se muestra en la Fig. 8, las imágenes del microscopio representan las señales IGF-1R (AZUL) y las señales Chr 15 (ROJO) junto con los conteos típicos vistos cuando se ven numerosas células. Todas las líneas celulares examinadas contenían copias extras de sonda IGF-1R y Chr 15. La mayoría de los aumentos en el número de copia fueron aumentos equilibrados de ambas sondas, lo que indica aneuploidía más que amplificación genética. La excepción a esto es la línea celular MCF7 que consistentemente tuvo 1-2 copias extras de IGF-1R con respecto a la sonda Chr 15 indicando una amplificación genética de nivel bajo. Ninguna de las líneas celulares probadas mostró nivel alto de amplificación genética IGF-1R.

Ejemplo 5 – Comparación entre el instrumento automatizado CellTracks y un microscopio de fluorescencia estándar

Para verificar que el instrumento CellTracks es capaz de adquirir imágenes útiles en análisis automatizados, se adquirieron imágenes del mismo cartucho con instrumento para HFIS CellTracks y un microscopio de fluorescencia estándar. La Figura 9 muestra imágenes de un control representativo con células PC3-9 y leucocitos. La figura demuestra que las imágenes del instrumento CellTracks son al menos tan buenas como las imágenes del microscopio. La imagen de Chr 15 de la célula PC3-9 tomada con el microscopio muestra dos puntos que están un poco fuera del enfoque (flecha blanca). En cambio, el instrumento CellTracks toma imágenes en varios planos focales y crea una imagen compuesta donde todos los puntos están enfocados, lo que permite una interpretación más fácil. Las células típicas PC3-9 mostraron 4-6 copias de Chr 15 y 3-5 copias de IGF-1R.

El sistema HFIS de CellTracks es una plataforma ideal para análisis automatizado de IGF-1R de una muestra fluida. La Figura 10 muestra una imagen típica de captura de pantalla de células seleccionadas después de enriquecimiento y fijación en el cartucho. La fila superior de imágenes muestra imágenes originales del escáner de CTC mostrando que esta célula es CK⁺DAPI⁺/CD45⁻ y, por lo tanto, una CTC sospechosa. La fila inferior de imágenes se adquiere con el instrumento HFIS que muestra que CTC tiene un número aberrante de sondas IGF1R y Chr 15. El software HFIS clasifica los resultados y proporciona la información para interpretación de diagnóstico. Esto demuestra que CTC de una muestra de un paciente puede enriquecerse de sangre, fijarse en el cartucho y analizarse usando técnicas HFIS en el Sistema CellTracks.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar aberraciones genéticas de IGF-1R en células tumorales circulantes de una muestra de sangre obtenida de un paciente, comprendiendo dicha muestra una población celular mezclada sospechosa de contener células tumorales circulantes, que comprende:
- 10 a. aislar una subpoblación de células epiteliales mediante enriquecimiento inmunomagnético;
 b. identificar células tumorales circulantes sospechosas; y
 c. hibridar dichas células tumorales circulantes sospechosas con una configuración de sonda libre de repeticiones IGF-1R capaz de detectar aberraciones cromosómicas que consisten en secuencias de clon que contienen al menos una parte del lugar de IGF-1R y una sonda libre de repeticiones que carece de hibridación cruzada específica para la región 1q del cromosoma 15.
- 15 2. El método de la Reivindicación 1 donde dicho enriquecimiento inmunomagnético comprende:
- a. mezclar dicha muestra con partículas inmunomagnéticas coloidales acopladas a un ligando que se une específicamente a células tumorales circulantes sospechosas, hasta la exclusión sustancial de otras poblaciones; y
 b. someter la muestra de partículas inmunomagnéticas de la muestra a un campo magnético de alto gradiente para producir una fracción celular separada enriquecida en las células tumorales unidas a la partícula electromagnética.
- 20 3. El método de la Reivindicación 1 donde dicho perfil fenotípico se determina a partir de un método seleccionado de un grupo consistente en citometría de flujo con múltiples parámetros, microscopia fluorescente, citometría de escáner con láser, análisis de imagen base en campo brillante, volumetría capilar, análisis de imagen espectral, análisis celular manual, análisis celular automatizado y combinaciones de los mismos.
- 25 4. El método de la Reivindicación 3 donde dicho perfil fenotípico se determina a partir de análisis celular inmunofluorescente automatizado.
5. El método de la Reivindicación 4 donde dicha secuencia de clon se selecciona a partir de clones de cromosomas artificiales bacterianos.
- 30 6. El método de la Reivindicación 1 donde dicha célula diana sospechosa de hibridación proporciona información sobre el diagnóstico, pronóstico y terapia de dicho paciente.
- 35 7. Un kit para determinar aberraciones genéticas de IGF-1R en células tumorales circulantes de una muestra de un paciente que comprende:
- a. una configuración de sonda libre de repeticiones de IGF-1R capaz de detectar aberraciones cromosómicas que consisten en secuencias de clones que contienen al menos una parte del lugar de IGF-1R;
 b. una sonda libre de repeticiones que carece de hibridación cruzada específica para la región 1q del cromosoma 15,
 y
 c. fracciones etiquetadoras unidas a dicho (a) y (b).
- 40 8. El kit de la Reivindicación 7 donde dicha secuencia de sonda de polinucleótido carece de dichas secuencias repetitivas por digestión con nucleasa específica de dúplex.
- 45 9. El kit de la Reivindicación 7 donde dicha fracción etiquetadora es un fluoróforo unido por un enlace coordinativo con base de platino.

50

55

60

65

Figura 1

Generación de sondas de ADN específicas de secuencia única

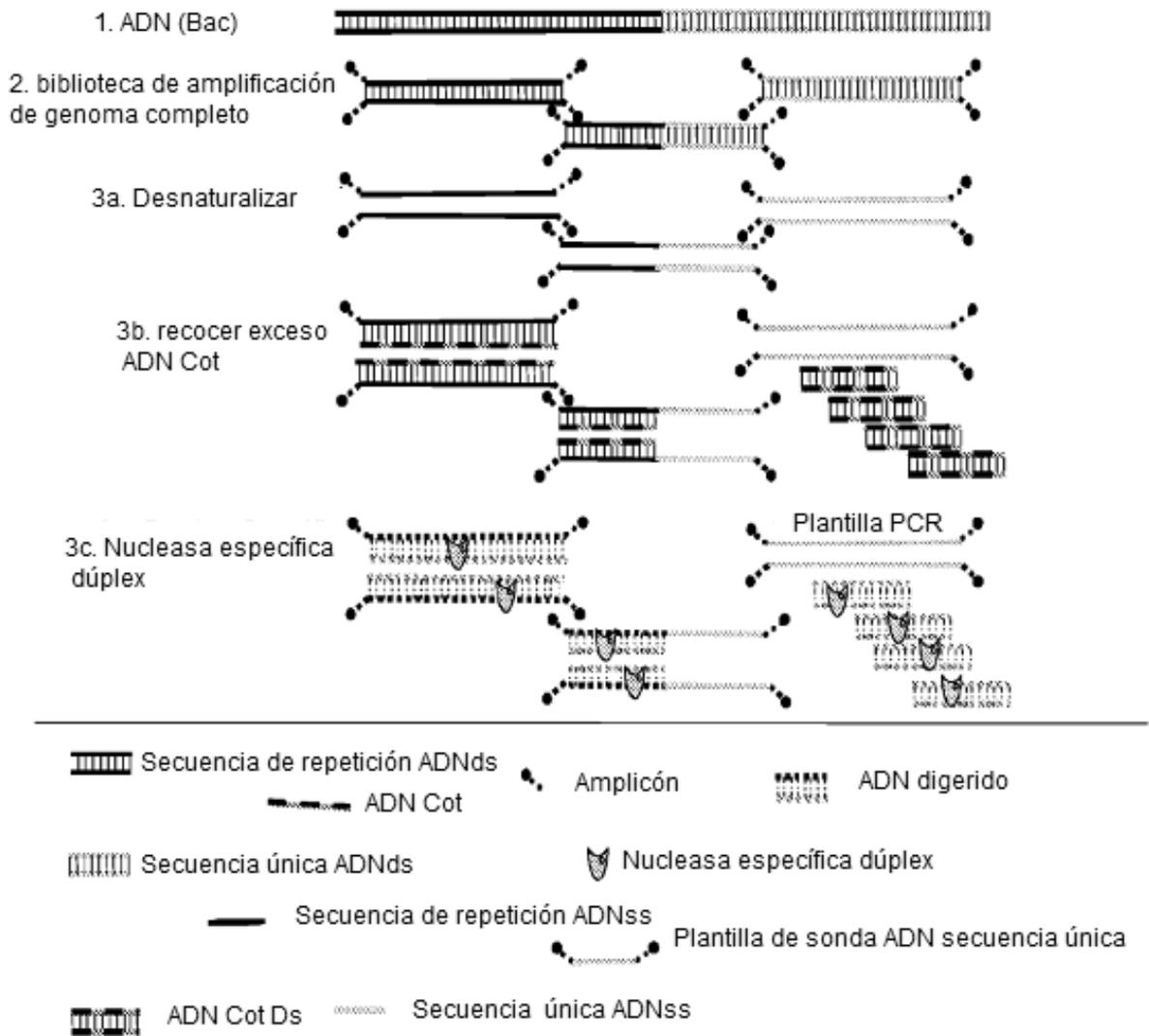


Figura 2

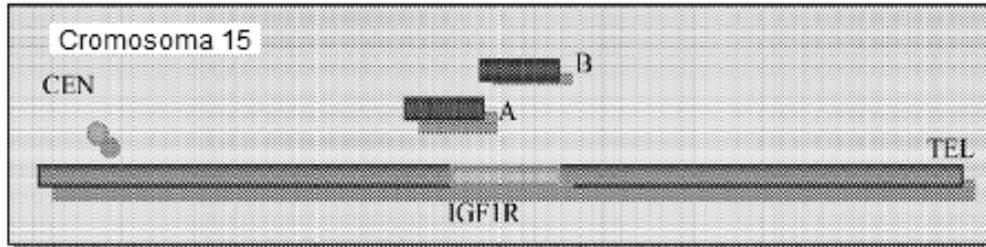


Figura 3

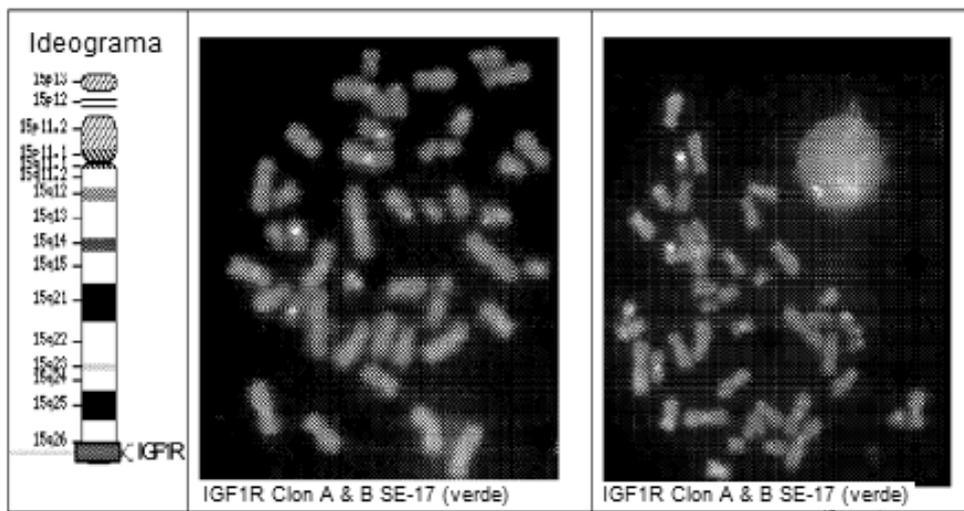


Figura 4

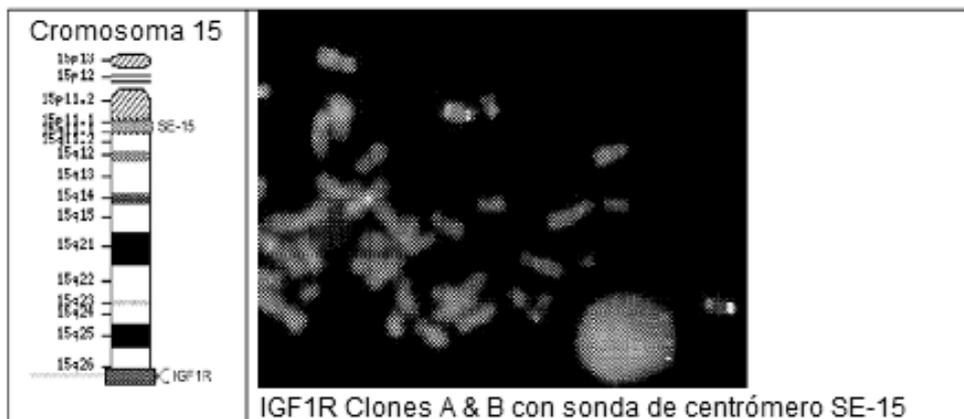


Figura 8

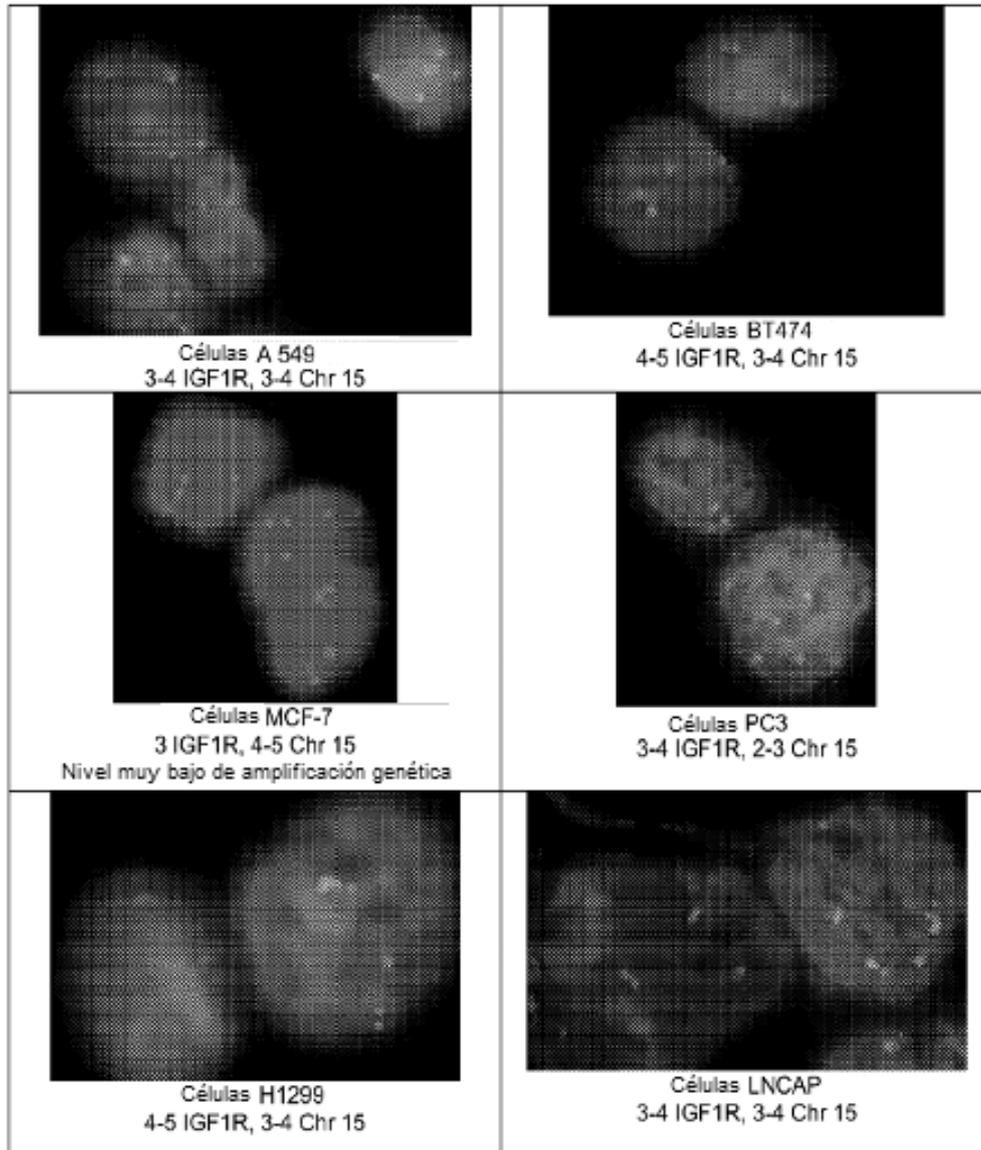


Figura 9

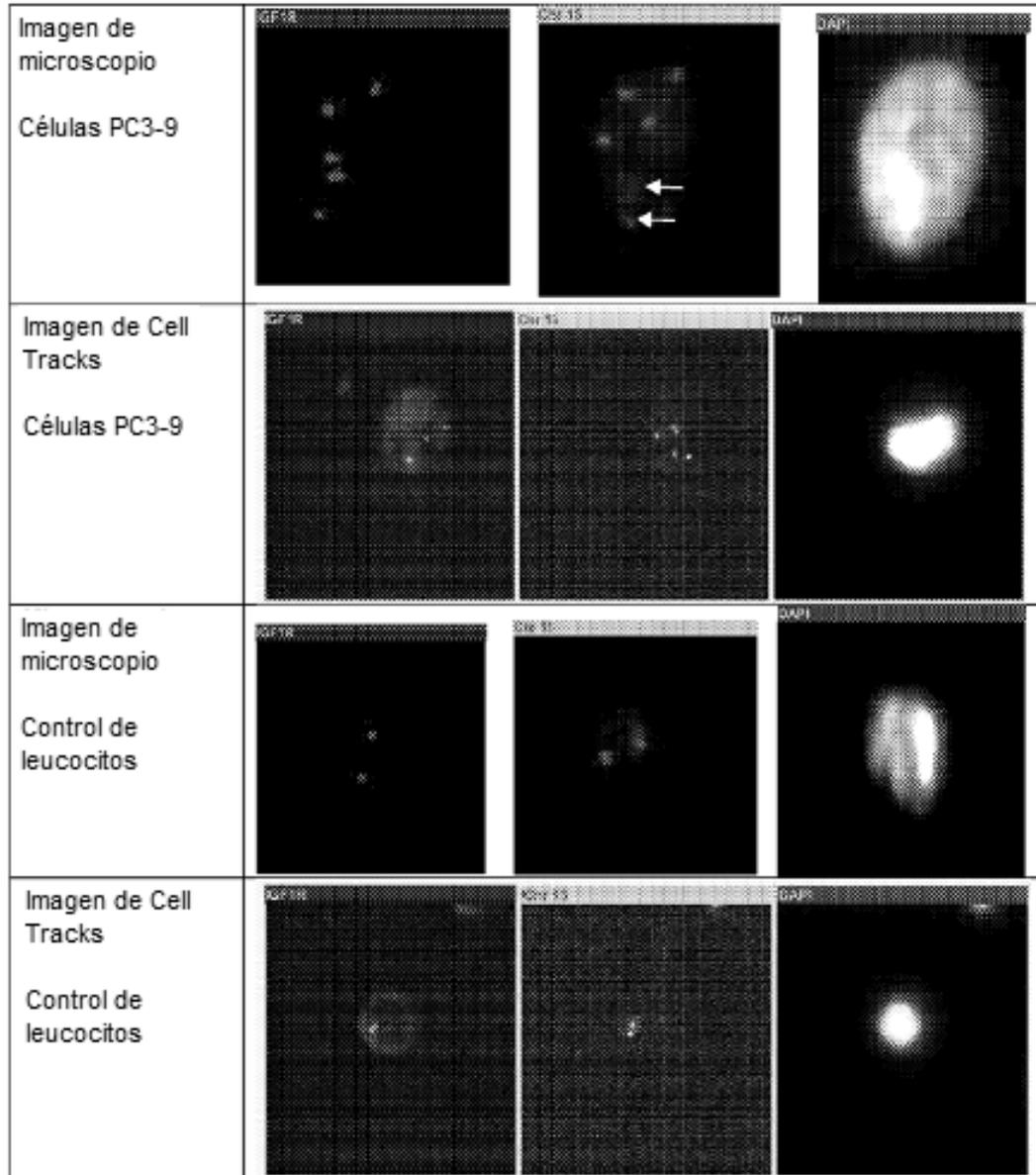


Figura 10

