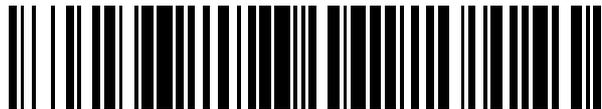


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 438**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2013 PCT/EP2013/073381**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2013 E 13789770 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2919910**

54 Título: **Captura in vitro y análisis de células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

09.11.2012 US 201261724753 P

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

22.03.2018

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH**

72 Inventor/es:

**MARTIN, GEORGE, A.;
SOPER, STEVEN;
WITEK, MAKGORZATA y
YEH, JEN JEN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 660 438 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

Captura *in vitro* y análisis de células tumorales circulantes

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la biología del cáncer y, más específicamente, a procedimientos para la captura *in vitro* y el análisis de células tumorales circulantes, la fuente de metástasis del cáncer.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La metástasis a los órganos distales provoca la mayoría de las muertes por cáncer. Las células tumorales circulantes (CTC) se originan a partir de un tumor primario e inician una cascada de metástasis que finalmente da como resultado la aparición de tumores metastásicos en sitios distales, véase Sun *et al.* (2011) *Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance*, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137:1151-1173. Se pueden usar varias pruebas genéticas, morfológicas, inmunológicas y fisiológicas para identificar las CTC, véase *Id.*, y Man, *et al.* (2011) *Currently used markers for CTC isolation – advantages, limitations and impact on cancer prognosis*, J. Clin. Exper. Pathol. 1:1. Debido a que el número de CTC en sangre periférica, incluso en pacientes con enfermedad metastásica avanzada, es extremadamente bajo en comparación con el número de células sanguíneas normales (una entre mil millones), la selección positiva es un procedimiento comúnmente utilizado para contar y aislar las CTC. Las CTC se pueden capturar usando un anticuerpo dirigido contra la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) expresada dentro de la membrana celular de muchas CTC. Después de la selección, las CTC se identifican finalmente mediante inmunotinción usando una combinación de reactivos dirigidos a células vivas, marcadores específicos de leucocitos y marcadores específicos de tumores. Por ejemplo, la prueba CELLSEARCH® de CTC aprobada por la FDA (Veridex, LLC, Raritan, N.J. / EE. UU.) detecta CTC usando anticuerpos monoclonales anti-EpCAM preparados sobre microesferas paramagnéticas, seguido de la identificación de las CTC usando DAPI, citoqueratinas (CK) y CD45, véase Hayes, D.F. y Smerage, J. (2008) *Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer?* Clin. Cancer Res., 14:3646-3650; Cristofanilli, M., *et al.* (2004) *Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer*. N. Engl. J. Med., 351:781-791. Sin embargo, los informes han sugerido que esta estrategia no captura células con escasa o ninguna expresión de EpCAM; y el ensayo muestra baja sensibilidad y especificidad para casos metastásicos, véase Lu, J. *et al.* (2010) *Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients*. Intl. J. of Cancer, 126:669-683; Sieuwerts, A.M. *et al.* (2009) *Anti-epithelial adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells*. J Natl Cancer Inst, 101:61-66. Sin embargo, también es probable que las células con escasa o ninguna expresión de EpCAM sean altamente significativas desde el punto de vista clínico. Se ha sugerido que las células tumorales que expresan fenotipos invasores regulan por disminución y pierden sus antígenos epiteliales (incluyendo EpCAM) en un proceso llamado transición epitelio-mesenquimatoso (EMT), véase Mego, M. *et al.* (2010) *Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer-clinical applications*, Nat. Rev. Clin. Oncol., 7:693-701; Brabletz, T. *et al.* (2005) *Invasion and metastasis in colorectal cancer: Epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and Beta-catenin*, Cell Tissues Organs, 179:56-65; Raimondi, C. *et al.* (2011) *Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients*, Breast Cancer Res, 130:449-455. También se ha sugerido que las CTC contienen subpoblaciones con una variedad de fenotipos, además del epitelial. Por lo tanto, los intentos de capturar todas las subpoblaciones de CTC (especialmente las invasoras que tienen escasa o ninguna expresión de EpCAM) dirigidos únicamente a las EpCAM pueden ser ineficaces, véase Sabile, A. *et al.* (1999) *Efficiency of Ber-EP4 antibody for isolating circulating epithelial tumor cells before RT-PCR detection*, Am. J. Clin. Pathol., 112:171-178; Thurm, H., *et al.* (2003) *Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy*, Clin. Cancer Res., 9:2598-2604. Esto viene avalado por la observación de que un gramo de un tumor epitelial puede liberar hasta 106 células por día (véase Butler, T.P. *et al.* (1975) *Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma*. Cancer Res., 35, 512-516). Si bien es evidente que no todas estas células poseen la capacidad de iniciar metástasis, algunas subpoblaciones infrecuentes y elusivas sí lo hacen.

Puede ser posible seleccionar subpoblaciones de CTC usando una combinación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpo contra CD45 combinado con anticuerpos contra diversos marcadores de tumores, por ejemplo, HER2 o receptor de estrógenos. Se ofrecen pruebas ejemplares en BioCept, Inc. (San Diego, California / EE. UU.). Sin embargo, los cócteles de anticuerpos típicamente usados en dichas pruebas se generan usando líneas celulares inmortalizadas que pueden no sintetizar realmente la variedad de cambios que se producen en las CTC liberadas de los tumores de los pacientes, véase Pecot, C.V. *et al.* (2011) *A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs*, Cancer Discovery, 1(7):580-586. En consecuencia, existe la necesidad de un procedimiento capaz de detectar de manera eficaz subpoblaciones invasoras infrecuentes de CTC presentes en muestras de pacientes y de dirigirse a ellas.

El documento WO 02/20825 describe procedimientos para aislar, separar o capturar células cancerosas y células cancerosas circulantes de la sangre y de otras secreciones corporales procedentes de sujetos con cáncer metastásico por diferentes medios. Los reactivos de afinidad, por ejemplo, los anticuerpos, se aplican, por ejemplo, para separar células cancerosas; los gradientes de densidad o una matriz basada en colágeno de tipo I se aplican, por ejemplo,

para separar células cancerosas circulantes.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 En un modo de realización, la invención es un procedimiento de captura de células tumorales circulantes de una muestra, que comprende (i) poner en contacto la muestra con un reactivo de afinidad dirigido a seprasa de mamífero, (ii) poner en contacto la muestra con un reactivo de afinidad dirigido a EpCAM de mamífero, y (iii) capturar las células retenidas en las etapas (i) y (ii), capturando así las células tumorales circulantes de la muestra, en el que el reactivo de afinidad dirigido a seprasa y el reactivo de afinidad dirigido a EpCAM se inmovilizan cada uno sobre una superficie de un soporte sólido.

10 En variaciones de este modo de realización, el reactivo de afinidad dirigido a seprasa es un inhibidor competitivo o no competitivo de seprasa, un anticuerpo, un aptámero de ácido nucleico o un aptámero peptídico o un ligando peptídico de seprasa tal como, por ejemplo, ácido Ac-Gly-prolinaborónico (Ac-Gly-BoroPro) o difenilfosfonato de prolina (Gly-ProP(OPh)₂). El soporte sólido que lleva el reactivo de afinidad dirigido a seprasa puede ser una parte de un dispositivo microfluídico. El procedimiento puede comprender además una etapa de liberación de las células tumorales circulantes capturadas mediante la adición de un exceso de agente de unión a seprasa soluble o un compuesto de avidina o mediante fotoescisión o mediante degradación enzimática de un conector bifuncional que sirve para unir un reactivo de afinidad por células tumorales circulantes a una superficie sólida.

15 En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además una etapa de detección de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD146, CK5, CK7, CK18, CK19, Cd44v6, EphB4, FAP (seprasa), IGF-1R, BCL2, HER2, HER3, CA19-9, CEA, CD133, MUC1, N-cadherina, survivina, EGFR, KRAS, BRAF, p53, Pi3KCA, PTEN, KRT19, CD34, CD24, ACT2, VIM, NANOG, CXCR4 y TWIST1 en las células capturadas.

20 En otro modo de realización, la invención es un procedimiento de detección de la presencia de un tumor maligno en un paciente capturando células tumorales circulantes de una muestra de un paciente usando un reactivo de afinidad dirigido a seprasa de mamífero. La muestra del paciente puede comprender sangre completa, secreciones corporales, cualquier fracción sanguínea que contenga células, un tumor fragmentado, una suspensión de células tumorales o un cultivo celular establecido a partir de una muestra del paciente, o el sobrenadante del cultivo, o un xenoinjerto establecido a partir de un tumor del paciente.

25 En otro modo de realización más, la invención es un procedimiento para evaluar el riesgo de desarrollar un tumor metastásico en un paciente que tiene o ha tenido un tumor, mediante la captura de células tumorales circulantes de una muestra del paciente usando un reactivo de afinidad dirigido a seprasa de mamífero. La muestra del paciente puede comprender sangre completa, secreciones corporales, cualquier fracción sanguínea que contenga células, un tumor fragmentado, una suspensión de células tumorales o un cultivo celular establecido a partir de una muestra del paciente, o el sobrenadante del cultivo, o un xenoinjerto establecido a partir de un tumor del paciente. En variaciones de este modo de realización, el procedimiento comprende además una etapa de detección de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD146, CK5, CK7, CK18, CK19, CD44, Cd44v6, EphB4, IGF-1R, BCL2, HER2, HER3, CA19-9, CEA, CD133, MUC1, N-cadherina, survivina, EGFR, KRAS, BRAF, p53, Pi3KCA, PTEN, KRT19, CD34, CD24, ACT2, VIM, NANOG, CXCR4 y TWIST1 en las células capturadas.

35 Se divulga un dispositivo microfluídico para capturar o aislar células seleccionadas de un líquido, que comprende uno o más módulos con una pluralidad de canales paralelos, en el que dichos canales están conectados a una entrada común y a una salida común, en el que al menos parte de la superficie interna de dichos canales está unida covalentemente a elementos de captura específicos para la proteína seprasa de mamífero. En variaciones, los elementos de captura pueden ser anticuerpos monoclonales específicos para la proteína seprasa de mamífero, moléculas de aptámero de ácido nucleico o moléculas de aptámero peptídico o moléculas de un ligando peptídico de seprasa. En variaciones, el dispositivo contiene al menos un módulo que contiene elementos de captura específicos para la proteína seprasa de mamífero, mientras que los módulos adicionales contienen elementos de captura específicos para la proteína EpCAM de mamífero u otro marcador de mamífero dirigido contra un fenotipo diferente, por ejemplo, proteína CD146. En variaciones adicionales, el dispositivo comprende además al menos un módulo para el análisis de las células aisladas.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un diagrama de un dispositivo microfluídico a modo de ejemplo para poner en práctica la invención.

60 La Figura 2 es un diagrama de chips CTC conectados en serie para aislar tanto las CTC de EpCAM como las de seprasa de la sangre y el posterior recuento de las CTC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65 *Definiciones*

Para facilitar la comprensión de esta divulgación, se proporcionan las siguientes definiciones de los términos utilizados en el presente documento.

- 5 El término «reactivo de afinidad» se refiere a un reactivo capaz de unirse específicamente a su diana como se define en el presente documento.
- El término «biorreactor» se refiere a un dispositivo que mantiene un entorno biológicamente activo en el que las células o tejidos pueden crecer *ex vivo*.
- 10 Los términos «unión» y «unión específica» se usan de manera intercambiable para referirse a la capacidad de un reactivo de unirse selectivamente a su diana. Típicamente, la especificidad se caracteriza por una constante de disociación de 10^4 M^{-1} a 10^{12} M^{-1} . Se pueden emplear procedimientos empíricos que usan controles apropiados para distinguir la unión específica y no específica en un caso particular.
- 15 Los términos «células cancerosas» y «células tumorales» se usan de manera intercambiable para referirse a células procedentes de un cáncer o un tumor, o de una línea celular tumoral o un cultivo de células tumorales.
- El término «células metastásicas» o «células tumorales metastásicas» se refiere a las células que tienen la capacidad de producir metástasis o que ya son parte de un tumor metastásico.
- 20 El término «células tumorales circulantes» o «CTC» se refiere a las células tumorales que se encuentran en la circulación de un paciente que tiene un tumor. Este término no incluye típicamente neoplasias hemáticas, en las que la mayor parte de la neoplasia se encuentra en circulación.
- 25 El término «matriz» o «soporte sólido» se usa de manera intercambiable para referirse al material sólido presente, por ejemplo, en un recipiente o cámara. El soporte sólido puede estar recubierto con reactivos, por ejemplo, reactivos de afinidad. El soporte sólido también puede mantener la adhesión de células a través de fuerzas y procesos biológicos, químicos o electrostáticos.
- 30 El término «tumor primario» se refiere a un tumor que crece en el sitio del origen del cáncer.
- El término «tumor metastásico» se refiere a un tumor secundario que crece en un sitio diferente del sitio del origen del cáncer.
- 35 El término «línea celular» se refiere a una población de células que, a través del cultivo celular, ha adquirido la capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*.
- El término «cultivo celular primario» se refiere a un cultivo celular establecido a partir de un organismo en el curso de un estudio. Un cultivo celular primario puede dar lugar o no a una línea celular.
- 40 El término «línea celular establecida» se refiere a una línea celular propagada *in vitro* múltiples veces antes de un estudio.
- 45 El término «biomarcador» se refiere a un marcador biológico que caracteriza un fenotipo. Un biomarcador típicamente incluye un gen o un producto génico. Dependiendo del gen, «detectar un biomarcador» puede incluir la detección de expresión génica alterada, modificaciones epigenéticas, mutaciones germinales o somáticas, etc. En el caso de un producto génico, «detectar un biomarcador» puede significar la detección de la presencia, cantidad o cambio en cantidad de un marcador de superficie celular, un compuesto soluble tal como citocina, etc. «Detectar un biomarcador» también puede incluir la detección de expresión génica (ARNm o proteína) o un metabolito que refleje la expresión o actividad de un gen.
- 50 El término «reactivo dirigido» es sinónimo de «reactivo de afinidad» y se refiere a un reactivo capaz de dirigirse a una molécula mediante unión específica a la misma.
- 55 El término «biomarcador tumoral» o «biomarcador de cáncer» se refiere a un biomarcador característico de un tumor o cáncer, pero no de tejido normal.
- 60 El término «tumor» se refiere a cualquier tipo de tumor sólido maligno que se sabe que tiene potencial metastásico, incluidos, sin limitación, carcinoma broncopulmonar (por ejemplo, carcinoma broncopulmonar no microcítico (CPNM)), cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza o cuello, melanoma, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular) y cánceres del sistema nervioso central (SNC) (por ejemplo, glioma, glioblastoma multiforme o astrocitoma).
- 65 El nombre del gen y la proteína «seprasa» se usa de manera intercambiable con los sinónimos «proteína de activación

de fibroblastos alfa», «FAP α » y «FAP» para designar el mismo gen o su producto de proteína.

La presente invención comprende un procedimiento para enriquecer subpoblaciones de CTC que han perdido algunas o todas las características de su fenotipo epitelial y muestran un comportamiento más invasor. La invención utiliza seprasa como molécula diana para la captura y el enriquecimiento de CTC para una caracterización adicional. La proteína seprasa se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.767.242. La seprasa, también conocida como proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP α) y DPP-5, es una proteasa (gelatinasa) que se ha demostrado que participa en la degradación de la matriz extracelular (ECM) y potencia el crecimiento y la proliferación tumoral. La seprasa es una proteína anclada a la membrana que existe como un homodímero de 170 kDa compuesto de dos subunidades de 97 kDa N-glucosiladas. La seprasa también existe en una forma soluble que lleva el nombre de enzima de escisión de antiplasmina (APCE), véase Lee, K., *et al.* (2006) *Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein*, *Blood*, 107:1397-1404.

Estructuralmente, la seprasa contiene un gran dominio extracelular C-terminal, un dominio transmembranario hidrófobo y una cola citoplásmica corta. Curiosamente, la distribución de seprasa en la superficie de las células tumorales no es uniforme: está presente principalmente en el frente invasor de las células tumorales malignas humanas, especialmente dentro de los invadopodios, protrusiones de membrana que se pueden asociar con la matriz extracelular, véase Edosada, C.Y., *et al.* (2006) *Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity*, *J. Biol. Chem.*, 281: 7437-7444; Mori Y., *et al.* (2004) *The expression of a type II transmembrane serine protease (Seprase) in human gastric carcinoma*, *Oncology*, 67:411-419; O'Brien, P., *et al.* (2008) *Seprase: an overview of an important matrix serine protease*, *Biochim Biophys Acta*, 1784:1130-1145; Monsky, M.J. *et al.* (1994) *A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells*, *Cancer Research*, 54:5702-5710; Mueller, S.C., *et al.* (1999) *A Novel Protease-docking Function of Integrin at Invadopodia*, *J. Biol. Chem.*, 274: 24947-24952.

Se ha encontrado que la seprasa está sobreexpresada en superficies celulares en > 90 % de los cánceres epiteliales humanos, pero ausente en tejidos no cancerosos y fibroblastos de tumores epiteliales benignos (véase Aertgeerts, K., *et al.* (2005) *Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein α* , *J. Biol. Chem.*, 280:19441-19444). Un estudio de CTC aisladas mostró que las poblaciones celulares capturadas por un anticuerpo anti-EpCAM no expresan seprasa; mientras que entre las poblaciones celulares capturadas usando su afinidad por las proteínas de la matriz de adhesión celular (CAM), solo algunas expresan seprasa (véase Lu, J., *et al.* (2010) *Isolation of circulating epithelial and tumor progenitor cells with an invasive phenotype from breast cancer patients*, *Int J. Cancer*, 126: 669-683). Se sabe que, durante el proceso metastásico, se produce degradación proteolítica de la matriz extracelular (ECM); y además, algunas subpoblaciones de CTC invasoras con avidez por la matriz de adhesión celular (CAM) sobreexpresan seprasa, véase *Id.*

La presente invención es un procedimiento de captura de las CTC utilizando reactivos de afinidad específicos para seprasa y EpCAM.

En algunos modos de realización, las CTC se aíslan de una muestra de un paciente que puede proceder de sangre completa, secreciones corporales, cualquier fracción sanguínea que contiene células, un tumor fragmentado, una suspensión de células tumorales o un cultivo celular establecido a partir de una muestra del paciente, o el sobrenadante de cultivo. En otros modos de realización, las CTC se aíslan de un cultivo de línea celular establecido o sobrenadante de cultivo o de un animal experimental, por ejemplo, de un animal que tiene un tumor de xenoinjerto. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye una configuración de doble selección: después de la selección por seprasa, las CTC de tipo epitelial se seleccionan adicionalmente usando reactivos de afinidad específicos para EpCAM. De forma alternativa, las células positivas a seprasa y positivas a EpCAM se pueden aislar o contar por separado y se puede obtener la proporción de dichas células. El cambio en la proporción de células positivas a seprasa y positivas a EpCAM es indicativo de un cambio en el potencial metastásico del cáncer.

En algunos modos de realización, en primer lugar, se evalúa el nivel de expresión de seprasa en un tejido normal particular o tejido tumoral correspondiente. Por ejemplo, se puede usar la citometría de flujo para calcular el porcentaje de células del tumor que expresan seprasa. Si se observa que el porcentaje es bajo, la concentración o densidad de los reactivos de captura específicos para seprasa en el dispositivo de captura se puede modificar para garantizar una cinética óptima de unión y la captura de las CTC que expresan seprasa. De la misma manera, en primer lugar, se evalúa la proporción seprasa/EpCAM en un tejido normal particular o el tejido tumoral correspondiente.

En algunos modos de realización, además de o en lugar de EpCAM, se pueden usar otras moléculas asociadas con la transición epitelio-mesenquimatoso para la selección (véase, por ejemplo, Zeng, Q., *et al.* (2012) *CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer*, *PNAS* 109(4):1127-32).

En algunos modos de realización, las poblaciones de células que expresan seprasa que incluyen CTC se capturan utilizando anticuerpos específicos para seprasa. Los anticuerpos específicos para seprasa están disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Antibody Resource, Cambridgeshire, Reino Unido). De forma alternativa, los anticuerpos específicos para seprasa se pueden generar *de novo* usando procedimientos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Howard y Kaser, Eds., (2006) *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook*, CRC Press;

Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL Press. Opcionalmente, se puede realizar una selección secundaria usando anticuerpos anti-EpCAM. Los anticuerpos específicos para EpCAM están ampliamente disponibles en múltiples proveedores, por ejemplo, OriGene Tech., Rockville, Md. / EE. UU. Se puede emplear una selección adicional con anticuerpos adicionales, por ejemplo, anticuerpos específicos para CD146 (American Research Products, Inc., Waltham, Mass. / EE. UU.).

En otro modo de realización, la molécula de captura es un ligando de seprasa o un inhibidor de seprasa. En algunos modos de realización, el ligando o el inhibidor es un péptido. Ejemplos de péptidos son ácido Ac-Gly-prolinaborónico (Ac-Gly-BoroPro) y difenilfosfonato de prolina (Gly-ProP(OPh)₂), octopéptidos y octopéptidos cíclicos descritos en la patente de EE. UU. n.º 7.374.898. Estos ligandos se han caracterizado extensamente y muestran una afinidad favorable por seprasa, véase Edosada, C.Y., *et al.* (2006) *Selective Inhibition of Fibroblast Activation Protein Protease Based on Dipeptide Substrate Specificity*. J. Biol. Chem., 281:7437-7444; y Aertgeerts, K., *et al.* (2005) *Structural and Kinetic Analysis of the Substrate Specificity of Human Fibroblast Activation Protein α* , J. Biol. Chem., 280:19441-19444. Otros ligandos peptídicos de seprasa se pueden generar *in vitro* por un experto en la técnica usando, por ejemplo, procedimientos de selección de péptidos descritos en Bartoli, L., *et al.* (2007) *A computational approach for detecting peptidases and their specific inhibitors at the genome level*, BMC Bioinformatics Mar 8;8 Supl. 1:S3; o Yagi, Y., *et al.* (2007) *In silico panning for a non-competitive peptide inhibitor*, BMC Bioinformatics, Ene 12; 8:11.

En otro modo de realización más, la molécula de captura es un aptámero peptídico o de ácido nucleico. Dichos aptámeros se pueden seleccionar de bibliotecas de oligonucleótidos o péptidos mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los aptámeros de ácido nucleico se pueden seleccionar mediante SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial), véase Oliphant A.R., *et al.* (1989) *Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides: analysis of yeast GCN4 proteins*, Mol. Cell Biol. 9:2944-2949. Los aptámeros peptídicos se pueden seleccionar usando el sistema de dos híbridos de levadura o bacteria, véase Fields, S., Song, O. (1989) *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*, Nature 340 (6230): 245-6; Joung, J., *et al.* (2000) *A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (13): 7382-7.

Se divulga un dispositivo capaz de capturar CTC de una muestra de paciente. El dispositivo comprende reactivos de afinidad dirigidos a seprasa inmovilizados sobre una superficie sólida. La superficie sólida puede comprender matrices basadas en polímeros que están recubiertas con reactivos de afinidad dirigidos a seprasa y, opcionalmente, adicionalmente o en paralelo, EpCAM. En algunos ejemplos, las poblaciones de células que expresan seprasa que incluyen CTC se capturan en un dispositivo que contiene superficies recubiertas con anticuerpos anti-seprasa. Opcionalmente, se puede usar una selección secundaria en la que el dispositivo contiene superficies recubiertas con anticuerpos anti-EpCAM o anti-CD146 o cualquier anticuerpo adicional de interés. Los reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos específicos para seprasa y específicos para EpCAM) se pueden combinar para formar una monocapa mixta, aunque los anticuerpos específicos para seprasa y específicos para EpCAM están ubicados en lechos consecutivos (colocados en cualquier orden). En otros modos de realización adicionales, las CTC que expresan seprasa se capturan en un dispositivo que contiene superficies recubiertas o revestidas con ligandos peptídicos de seprasa tales como, por ejemplo, ácido Ac-Gly-prolinaborónico (Ac-Gly-BoroPro) y difenilfosfonato de prolina (Gly-ProP(OPh)₂). Otros péptidos adecuados se pueden seleccionar de acuerdo con los procedimientos de selección de péptidos *in vitro* e *in silico* conocidos en la técnica. En otro modo de realización más, las CTC que expresan seprasa se capturan usando aptámeros peptídicos o de ácido nucleico específicos para seprasa. En algunos modos de realización, el dispositivo es un dispositivo microfluídico que se puede interconectar con una placa base fluidica incorporada en un sistema funcional con una secuencia de trabajo automatizada. En dicho dispositivo, uno o más módulos de selección de CTC están configurados en una placa base fluidica de modo que, una vez que se liberan las células, se pueden enriquecer aún más y someter a un análisis inmunológico y molecular.

Típicamente, el dispositivo microfluídico es adecuado para alojar y procesar grandes volúmenes de muestra necesarios para detectar las CTC que se producen en la muestra del paciente a una tasa extremadamente baja. Con ese fin, el dispositivo puede estar equipado con múltiples canales que alojan el flujo lineal de la muestra. La velocidad de flujo lineal óptima para la máxima recuperación de las células que expresan seprasa o EpCAM se puede determinar experimentalmente por un experto en la técnica de microfluidos.

En algunos ejemplos, el dispositivo analítico de captura de células está construido de manera que maximiza la unión de las células que expresan seprasa a la superficie del dispositivo. Por ejemplo, la superficie se puede poner rugosa usando luz UV. Además, la superficie del dispositivo se puede nanotexturizar para crear estructuras microscópicas que faciliten la captura y retención de las CTC. Por ejemplo, la superficie se puede tratar para crear nanopilares como se describe, por ejemplo, en Wang, S., *et al.* (2009) *Three-dimensional nanostructured substrates toward efficient capture of circulating tumor cells*, Angewandte Chemie Int 1. edición, 48:8970-8973. En general, un dispositivo a modo de ejemplo adecuado para la selección de células tumorales circulantes se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 2009/140326 publicada el 19 de noviembre de 2009.

Un dispositivo a modo de ejemplo se muestra en la Figura 1. El dispositivo de la Figura 1 contiene múltiples módulos de captura, cada uno de los cuales incluye canales sinusoidales que contienen una superficie interna recubierta con reactivos de afinidad utilizados para la selección. El dispositivo de la Figura 1 tiene dos módulos de captura: uno para

seprasa y otro para EpCAM dispuestos en una configuración en serie (la salida de un módulo sirve como entrada al segundo módulo). Un profesional experto apreciaría que se pueden agregar módulos adicionales. El orden de las etapas de selección por afinidad también se puede invertir. En otra alternativa más, los módulos de selección pueden funcionar en una configuración en paralelo en la que la muestra de entrada se divide para ejecutarse en cada uno de los módulos de selección de CTC de forma simultánea. En otra alternativa más, se puede usar un único módulo con una mezcla de dos o más anticuerpos. El dispositivo tiene recipientes para tampones de lavado, recolección de residuos y otros reactivos. El dispositivo posee múltiples válvulas (V) para dirigir el flujo. Después de la selección, las células se dirigen hacia módulo de recuento opcional y un módulo de tinción opcional. Se conocen en la técnica diversos dispositivos y procedimientos de recuento celular y se pueden emplear por un profesional experto. Por ejemplo, el módulo de recuento puede contener pares de electrodos para que las células se puedan identificar y contar usando la impedancia de una sola célula, véase T. Sun y H. Morgan (2010) *Single-Cell Microfluidic Impedance Cytometry: A Review*, *Microfluid Nanofluid*, 8:423-443 y las referencias citadas en el mismo. El módulo de tinción está configurado para recibir diversos reactivos de tinción, por ejemplo, colorantes (DAPI) y anticuerpos marcados (específicos para citoqueratinas (CK), CD45 y cualquier otra diana de interés). La salida del dispositivo proporciona células seleccionadas para un procesamiento adicional, por ejemplo, análisis molecular de acuerdo con la invención.

En algunos modos de realización, puede ser deseable liberar subpoblaciones de células que contienen CTC capturadas usando el reactivo de afinidad dirigido a seprasa unido a una superficie sólida y, además, opcionalmente, el reactivo de afinidad dirigido a EpCAM unido a una superficie sólida para análisis adicional. La liberación se puede lograr rompiendo el enlace que ancla el reactivo de afinidad a la matriz sólida o desplazando las células capturadas del reactivo de afinidad.

En un modo de realización, el procedimiento de la invención utiliza conectores bifuncionales escindibles para la captura de anticuerpos, por ejemplo, grupos fotoescindibles o químicos contenidos dentro de los conectores bifuncionales para permitir la liberación de las células capturadas. Varios conectores fotoescindibles están disponibles para un experto en la técnica, véase, por ejemplo, Kanoh, N., *et al.* (2010) *Cleavable linker for photo-cross-linked small-molecule affinity matrix*, *Bioconjug. Chem.* 21:182-186 y las referencias citadas en el mismo. Los conectores fotoescindibles son candidatos ideales para aplicaciones clínicas, en las que el módulo de selección de células se usa una vez y luego se descarta. Estos conectores bifuncionales pueden consistir en diferentes longitudes y composición, tales como oligonucleótidos monocatenarios que contienen el residuo fotoescindible o un sitio abásico que se puede escindir enzimáticamente.

En otro modo de realización, la invención utiliza un compuesto de avidina, por ejemplo, avidina, estreptavidina, nitroavidina o neutravidina, que interactúa con un anticuerpo de captura biotinilado para permitir la captura y liberación de células. El compuesto de avidina se disocia de la parte de biotina del anticuerpo biotinilado tras un cambio en el pH de la solución de neutro a alcalino en el caso de la nitroavidina. La ventaja de este modo de realización es la capacidad de regenerar la superficie de unión.

En otro modo de realización más, cuando las células se capturan usando inhibidores peptídicos, ligandos u otros socios de unión para permitir la liberación de las células capturadas, se provoca que las células se disocien de la matriz añadiendo un exceso del agente de unión en forma soluble.

En otro modo de realización más, con aptámeros de ácido nucleico que sirven como reactivo de afinidad, se puede usar un exceso de la forma soluble de un complemento al aptámero de afinidad para liberar la CTC seleccionada. Después de la desnaturalización por calor, dicha superficie de captura recubierta con aptámeros se puede regenerar fácilmente.

En algunos modos de realización, la subpoblación de células capturadas que incluye CTC se libera del reactivo de afinidad y se somete a análisis adicional. En algunos modos de realización, las células se someten a un examen microscópico después de la tinción, por ejemplo, con hematoxilina y eosina (H&E) u otros tintes diferenciales, por ejemplo, tinción PROTOCOL[®] HEMA 3. Todas las células se pueden teñir con colorante fluorescente de unión a ácido nucleico, tal como Hoechst 33342 o DAPI para ayudar a diferenciar las células de los restos celulares. Las células que muestran tinción positiva con los diversos marcadores descritos a continuación se pueden identificar como CTC, y se pueden contar y caracterizar adicionalmente.

Se pueden usar varios biomarcadores, así como pruebas morfológicas, inmunológicas y fisiológicas o combinaciones de las mismas para identificar CTC entre las células capturadas usando el procedimiento de la presente invención, véase, por ejemplo, Sun *et al.* (2011), *Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137:1151-1173; Man, *et al.* (2011); *Currently used markers for CTC isolation - advantages, limitations and impact on cancer prognosis*, *J. Clin. Exper. Pathol.* 1:1. Por ejemplo, las CTC se pueden identificar por su capacidad de adherirse a moléculas de adhesión celular (CAM), así como por la presencia de ciertos biomarcadores específicos que incluyen EpCAM, citoqueratinas (CK) 5, 7, 18 y 19, CD44v6 o N-cadherina. Dependiendo del tumor de origen, las CTC también se pueden identificar en función de la presencia de biomarcadores específicos del tumor que incluyen EpCAM, CD146, CK5, CK7, CK18, CK19, CD44, Cd44v6, EphB4, FAP (seprasa), IGF-1R, BCL2, HER2, HER3, CA19-9, CEA, CD133, MUC1, N-cadherina, survivina, EGFR, KRAS, BRAF, p53, Pi3KCA, PTEN, KRT19, CD34, CD24, ACT2, VIM, NANOG, CXCR4 y TWIST.

Por ejemplo, las CTC que se originan en el páncreas exhibirían una tinción positiva con marcadores epiteliales estándar y marcadores tumorales pancreáticos humanos (EpCAM y CA19-9). En algunos modos de realización de la invención, las CTC se identifican usando ensayos disponibles comercialmente, por ejemplo, la plataforma VITA-ASSAY™ AR16 (Vitalex, Inc., Stony Brook, N.Y. / EE. UU.).

En otro modo de realización, la invención es un procedimiento de detección de la presencia de un tumor maligno o de evaluación del potencial metastásico de un tumor existente o extirpado en un paciente mediante la detección de células que expresan seprasa en una muestra del paciente. La muestra puede comprender sangre completa, secreciones corporales, cualquier fracción sanguínea que contenga células, un tumor fragmentado, una suspensión de células tumorales o un cultivo celular establecido a partir de una muestra del paciente o el sobrenadante del cultivo.

En este modo de realización, las células que expresan seprasa capturadas se pueden caracterizar adicionalmente como CTC y se pueden evaluar por sus números y perfil de expresión génica que comprende, por ejemplo, uno o más de los biomarcadores ACT2, IGF-1R, BCL2, HER2, EphB4, CA19-9, CEA, CD24, CD44, CD133, CD146, CXCR4, TWIST1, VIM, NANOG, KRT19, MUC1, survivina, EGFR, KRAS, BRAF, p53, Pi3KCA y PTEN.

En otro modo de realización, la invención es un procedimiento para comparar la expresión de seprasa con la expresión de EpCAM en el tumor o en CTC derivadas del tumor usando el procedimiento de la presente invención. La proporción de CTC que expresan seprasa y CTC que expresan EpCAM se puede usar para determinar el potencial metastásico del tumor.

En otro modo de realización más, la invención es un procedimiento de determinación del pronóstico para un paciente que tiene un tumor, comprendiendo el procedimiento la determinación del potencial metastásico del tumor evaluando la proporción de CTC que expresan seprasa y CTC que expresan EpCAM, en el que el aumento de la proporción indica un aumento del potencial metastásico del tumor y, por lo tanto, un mal pronóstico para el paciente. El aumento de la proporción de CTC que expresan seprasa y CTC que expresan EpCAM se puede detectar comparando la proporción determinada experimentalmente con las proporciones documentadas de CTC que expresan seprasa y CTC que expresan EpCAM para el tipo de tumor particular. De forma alternativa, la proporción de CTC que expresan seprasa y CTC que expresan EpCAM se puede evaluar (monitorizar) repetidamente para el paciente particular, de manera que se pueda detectar un aumento en la proporción. De acuerdo con el procedimiento, el pronóstico se puede formar para cualquier tumor sólido maligno que se sabe que tiene potencial metastásico, incluidos, sin limitación, carcinoma broncopulmonar (por ejemplo, carcinoma broncopulmonar no microcítico (CPNM)), cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza o cuello, melanoma, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de endometrio, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular) y cánceres del sistema nervioso central (SNC) (por ejemplo, glioma, glioblastoma multiforme o astrocitoma).

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Selección de células tumorales circulantes (CTC) seprasa(+) y EpCAM(+) en la sangre periférica de pacientes con cáncer de páncreas

Las siguientes mediciones clínicas se obtuvieron de un IRB aprobado (Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, Lineberger Cancer Center). Estas mediciones están destinadas a ilustrar modos de realización de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. La presente invención pretende incluir todos los adenocarcinomas o tumores sólidos.

Materiales y procedimientos

Los microchips para CTC utilizados para la selección de células positivas para seprasa y EpCAM se fabricaron en un termoplástico (copolímero de olefina cíclico, COC o poli(metacrilato de metilo), PMMA). Los microchips para CTC consistían en una arquitectura compuesta por 50 canales sinusoidales que emanaban de una entrada común y convergían en una salida común (véase Adams *et al.*, *Highly Efficient Circulating Tumor Cell Isolation from Whole Blood and Label-Free Enumeration Using Polymer-based Microfluidics with an Integrated Conductivity Sensor*, Journal of the American Chemical Society, 139 (2008) 8633-8641). Los canales sinusoidales tenían 30 µm de ancho y 150 µm de profundidad.

Los sustratos de polímero y los cubreobjetos (0,5 mm de grosor) se adquirieron de Good Fellow (Berwyn, PA / EE. UU.). Los hilos de platino se adquirieron en Alfa Aesar (Boston, MA / EE. UU.). Los capilares de sílice fundida recubiertos con poliimida se adquirieron en Polymicro Technologies (Phoenix, AZ / EE. UU.). Los productos químicos utilizados para la limpieza y modificación de la superficie de COC incluyeron alcohol isopropílico de grado reactivo, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), suero bovino fetal y

ácido 2-(4-morfolino)etanosulfónico (MES) y se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO / EE. UU.). El anticuerpo monoclonal anti-EpCAM y el anticuerpo anti-seprasa se obtuvieron de R & D Systems (Minneapolis, MN / EE. UU.).

5 Los microchips para CTC se fabricaron mediante microrreplicación de una matriz de metal. Las microestructuras de la matriz de metal se fresaron sobre la superficie de una placa de latón con una microfresadora de alta precisión (KERN MMP 2522, KERN Micro- und Feinwerktechnik GmbH & Co.KG, Alemania) siguiendo procedimientos previamente publicados (Huper *et al.*, *Evaluation of Micromilled Metal Mold Masters for the Replication of Microchip Electrophoresis Devices*, *Microfluidics and Nanofluidics*, (2007) 3: 1-11). La microfresadora se equipó con un sistema de medición láser (LaserControl NT, Blum-Novotest GmbH, Alemania) para la determinación automática de la longitud y el radio de la herramienta, y un microscopio óptico (Zoom 6000, Navitar, Inc. Rochester, NY / EE. UU.) para la monitorización del procedimiento de fresado. El microfresado se llevó a cabo a 40 000 rpm. Las tasas de alimentación dependían del tamaño de la herramienta de fresado y típicamente estaban en el intervalo de 200 mm/min para una broca fresadora de 500 μm , 100-150 mm/min para la broca fresadora de 200 μm , 50-75 mm/min para la broca fresadora de 100 μm y 10-20 mm/min para una broca fresadora de 50 μm . Un ciclo de fresado típico consistió en un precorte de toda la superficie con una broca fresadora de 500 μm para garantizar el paralelismo entre ambas caras de la placa de latón y una altura uniforme de las microestructuras fresadas finales en todo el patrón, un fresado aproximado de las microestructuras usando ya sea una broca fresadora de 500 o de 200 μm , y un corte de acabado con una broca fresadora de menor diámetro. En la etapa final de la fabricación de la matriz moldeada, las rebabas se eliminaron por pulido mecánico. El pulido se realizó a mano sobre un papel de pulido de 3 μm de tamaño de grano (Fibremet Discs - PSA, Buehler, Lake Bluff, IL), seguido de pulido sobre una tela de polipropileno (Engis, Wheeling, IL) con una suspensión de diamante de 1 μm (Metadi Diamond Suspension, Buehler).

Después de la modificación por UV de los sustratos de polímero y los cubreobjetos, las propiedades fisicoquímicas de la superficie se alteraron de manera eficaz dando como resultado una reducción moderada de la temperatura de transición vítrea (T_g) en la interfaz cubreobjetos-sustrato. La unión por fusión térmica se llevó a cabo en un horno de cromatografía de gases (GC) (Varian 3400, Palo Alto, CA / EE. UU.) utilizando el cubreobjetos de polímero y el sustrato polimérico estampado en caliente de cara abierta. El sustrato y el cubreobjetos se alinearon y sujetaron unidos entre dos placas de vidrio de borosilicato y el conjunto se colocó en el horno de temperatura programable del GC, en el que la temperatura se incrementó de 50 $^{\circ}\text{C}$ hasta 150 $^{\circ}\text{C}$ a una tasa de 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La temperatura se mantuvo a 150 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min antes de enfriar hasta temperatura ambiente.

La modificación regioespecífica por ultravioleta (UV) del sustrato polimérico y del cubreobjetos se realizó a través de una fotomáscara de aluminio para facilitar la formación del armazón carboxilado para el anclaje del anticuerpo dirigido exclusivamente en los lechos de selección de células de los microchips para CTC. Antes del ensamblaje final por fusión térmica, el cubreobjetos y el sustrato se irradiaron localmente a 254 nm con una fluencia de 15 mW cm^{-2} durante 10 min usando una estación de exposición UV (ABM, Inc., San Jose, CA / EE. UU.).

La inmovilización de anticuerpos se realizó usando un procedimiento de dos etapas. Inicialmente, el dispositivo para CTC modificadas por UV, después del ensamblaje térmico, se cargó con una solución que contenía 4,0 mg/ml de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC), 6,0 mg/ml de N-hidroxisuccinimida (NHS) en ácido 2-(4-morfolino)etanosulfónico 150 mM a pH = 6 (MES, Fisher Biotech, Fair Lawn, NJ) y solución salina tamponada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO / EE. UU.) durante 1,0 h para formar un intermedio de éster de succinimidilo. La solución de EDC/NHS se reemplazó hidrodinámicamente con una solución de 1,0 mg/ml de anticuerpo monoclonal contra EpCAM o de anticuerpo monoclonal anti-seprasa (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN / EE. UU.) contenida en PBS 150 mM a pH = 7,4 (Sigma -Aldrich, St Louis, MO / EE. UU.) y se dejó reaccionar durante 4 h, tras las que los microchips para CTC se enjuagaron con una solución de PBS (pH = 7,4) para eliminar cualquier anticuerpo unido de forma no específica.

Se usó una bomba de jeringa PHD2000 (Harvard Apparatus, Holliston, MA / EE. UU.) para procesar hidrodinámicamente las muestras usando los microchips para CTC. Para conectar el microchip a la bomba, una jeringa de Luer (Hamilton, Reno, NV / EE. UU.) se equipó con un adaptador Luer-capilar (InnovaQuartz, Phoenix, AZ / EE. UU.). La bomba de jeringa se programó para generar el caudal volumétrico apropiado para evaluar la eficacia de captura de células CTC y la retención de células poscaptura. Las velocidades lineales se calcularon a partir del área de sección transversal de los respectivos canales de captura HTMSU y del caudal volumétrico programado. El procedimiento de doble selección se llevó a cabo interconectando el microchip para CTC seprasa directamente con la bomba de jeringa. La salida del chip para seprasa se dirigió luego al microchip para EpCAM. Por lo tanto, la muestra de sangre se procesó en un solo ensayo usando ambos microchips dispuestos en serie.

Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes con cáncer de páncreas que habían dado su consentimiento en un tubo de EDTA con un volumen total aproximado de 10 ml. Una vez obtenidas las muestras, se procesaron inmediatamente usando los microchips para CTC. Típicamente, se extrajeron 3 ml de sangre completa del tubo de EDTA y se ubicaron en una jeringa de plástico esterilizada y se fijó en una bomba de jeringa y se conectó al microchip para CTC. La muestra de sangre se procesó a un caudal volumétrico de $\sim 150 \mu\text{l}/\text{min}$, requiriendo 20 minutos para procesar un volumen de entrada de 3 ml. Después del procesamiento de la sangre, el microchip se lavó con un tampón isotónico (PBS, 1,5 ml).

Las células seleccionadas (aquellas que permanecen en la superficie después del lavado con PBS del microchip) se tiñeron directamente usando DAPI (tinción nuclear), anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos contra CD45, anticuerpos anti-citoqueratina (8,18,19) marcados con ficoeritrina (PE) y anticuerpos anti-EpCAM marcados con Cy7 (para el chip seprasa+) o anticuerpos anti-seprasa marcados con Cy7 (para el chip EpCAM+). Después de la tinción y el lavado, se obtuvieron imágenes de los chips en un Zeiss Axiovert 200M utilizando un objetivo de microscopio 40X y una cámara EMCCD. Se encontró que > 95 % de las células seprasa+ no expresaron niveles visibles de EpCAM, como se discernió a partir de la tinción en el chip usando anticuerpos anti-EpCAM marcados con colorante fluorescente Cy7. Las células EpCAM+ también se inmunofenotiparon usando también anticuerpos anti-seprasa marcados con Cy7 con resultados similares garantizados (> 95 % de células EpCAM+ no expresaron seprasa).

Los resultados de varias muestras clínicas se muestran en la Tabla 1. En la Tabla 1, la columna «Patología» enumera el estadio de la enfermedad en el momento en que se tomó la muestra. «Ab de afinidad» indica el anticuerpo utilizado para capturar las CTC de la muestra. El número de células se proporciona para 7,5 ml de sangre. La pureza se calcula como una proporción de CTC (seprasa+ o EpCAM+) con respecto al número total de células seleccionadas (WBC (CD45+) + CTC + células de tinción triple - dichas células (CD45+, DAPI+ y CK+)). Las muestras analizadas incluyeron muestras de pacientes metastásicos y de pacientes con enfermedad localizada. Además, se realizó el seguimiento de un solo paciente con enfermedad localizada antes y 3 semanas después de la cirugía (resección del tejido enfermo). La proporción de CTC seprasa+ y CTC EpCAM+ también se muestra como una función de la patología.

Tabla 1. CTC seleccionadas por seprasa y EpCAM

Patología	Ab de afinidad	CTC (por 7,5 ml)	WBC (por 7,5 ml)	Pureza	Proporción FAP/EpCAM
Pancreático metast.	FAP	158	11	94 %	
Pancreático metast.	EpCAM	176	13	90 %	0,92
Pancreático metast.	FAP	94	21	82 %	
Pancreático metast.	EpCAM	11	15	42 %	8,54
Pancreático metast.	FAP	625	10	98 %	
Pancreático metast.	EpCAM	98	13	88 %	6,38
Pancreático no metast.	FAP	11	7	61 %	
Pancreático no metast.	EpCAM	34	5	87 %	0,32
Pancreático no metast.	FAP	94	19	83 %	
Pancreático no metast.	EpCAM	581	28	95 %	0,16
Pancreático localizado (30 días posOP)	FAP	73	9	89 %	
Pancreático localizado (30 días posOP)	EpCAM	91	12	88 %	0,80
Pancreático localizado (resecado)	FAP	237	–	–	
Pancreático localizado (resecado)	EpCAM	125	–	–	1,90
3 semanas posOP	FAP	30	–	–	
3 semanas posOP	EpCAM	39	–	–	0,77
Sin cáncer	FAP	0	8	-	-
Sin cáncer	EpCAM	1	4	-	-

Ejemplo 2

25 Determinación de la proporción de CTC seprasa(+) y EpCAM(+) en la sangre periférica de pacientes con diversos cánceres

Los chips microfluídicos para CTC se fabricaron en sustratos de COC. El diseño del chip consistió en una huella de 26,3 x 20,5 mm con canales principales de entrada y salida (20,5 mm de longitud, 400 µm de anchura y 150 µm de profundidad) que conectaban una serie de 50 canales curvilíneos que formaban de manera conjunta el lecho de selección de células. La Figura 1 muestra el diseño del chip de selección de CTC. Cada canal de selección curvilíneo tenía 30,6 mm de longitud, 150 µm de profundidad y 25 µm de anchura. El área de superficie del lecho de selección de CTC era de 596 mm² (11 mm²/canal) con 45,1 mm² de dicha área de superficie en los canales principales. El volumen total del chip era de 9,4 µl (138 nl/canal) con un volumen de 2,5 µl para los canales principales.

La profundidad de estos canales aumentó el rendimiento y proporcionó una caída de presión reducida en todos los canales de selección, especialmente cuando estaban ocupados por CTC capturadas. En promedio, la anchura de los microcanales es solo ligeramente mayor que el diámetro promedio de las CTC (12-20 μm), lo que maximiza la recuperación, pero mucho mayor que el diámetro promedio de los leucocitos (7-15 μm). La anchura de los canales desempeña una función en la maximización de la probabilidad de interacciones célula/pared y permite lograr un alto rendimiento de CTC, pero una menor probabilidad de interacciones con células más pequeñas. Para células incluso más pequeñas, tales como eritrocitos, la probabilidad de acercarse a la pared del canal es muy limitada, debido en parte a la formación de una capa libre de células marginales.

Los chips de COC activados por UV se modificaron con anticuerpo anti-FAP α humano (MAB3715 R&D), anti-EpCAM humano (MAB960, R&D) como se muestra en la Figura 2. La unión del Ab se realizó utilizando el siguiente protocolo: activación de la superficie UV-COC con 20 mg/ml de EDC y 2 mg/ml de NHS a pH 4,8 durante 15-20 minutos de incubación, seguido de vaciado de los canales y sustitución por 0,5 mg/ml de Ab en PBS a pH 7,4 e incubación durante la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$. Antes del procesamiento de la sangre, los chips se enjuagaron con 2 ml de PBS/0,25 % de BSA.

Los chips estaban equipados con capilares de sílice que estaban conectados a la bomba de jeringa en la entrada del chip n.º 1. La salida del chip n.º 1 se conectó a la entrada del chip n.º 2 usando un conector de vidrio. El protocolo de captura celular para el chip de COC de 50 canales implicó la infusión de sangre completa (sin diluir y sin fijar) a través de los chips a 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ (2 mm/s), seguido de un lavado del chip a 55 $\mu\text{l}/\text{min}$ (4 mm/s) con 1-2 ml de solución PBS/BSA.

Las células seleccionadas se analizaron e identificaron por inmunotinción mediante: (i) tratamiento con bloqueador de Fc (IgG); (ii) incubación con anticuerpos-FITC anti-CD45 murino o humano durante 30 min; (iii) fijación celular con PFA al 2 %; (iv) poración con Triton-X100 al 0,1 %; y (v) incubación con anticuerpos CK8/19-PK y el colorante nuclear, DAPI. Las imágenes de las células teñidas se obtuvieron utilizando un microscopio invertido confocal de disco giratorio Olympus 1X71-DSU controlado mediante el programa informático MetaMorph, que se suministró con objetivos secos 10x, 20x y 40x, una fuente de iluminación de lámpara de arco de mercurio, dos cámaras (Hamamatsu EMCCD de alta sensibilidad y Hamamatsu ORCA-03G CCD de alta resolución) y conjuntos de filtros para DAPI, FITC, TRITC y Cy5.

Tabla 2. Resumen de datos para CTC capturadas en lechos anti-FAP α y anti-EpCAM de muestras clínicas (normalizadas a 1 ml).

Ab de afinidad	Parámetro	Control negativo (n = 5)	Tumor benigno (n = 4)	PDAC localizado operable, más tarde diagnosticado como metastásico (n = 4)	PDAC metastásico (n = 16)	Melanoma metastásico (n = 11)	CRC metastásico (n = 6)
FAP α	Promedio \pm DE	0,6 \pm 0,7	3,1 \pm 1,3	25,5 \pm 10,1	28,7 \pm 23,7	33,2 \pm 26,5	68,1 \pm 104,5
	Mediana	0,5	3,3	22,2	22,8	21	31,3
	Intervalo	0-2	1,5-3	17,5-40	4,75-80,0	8,2-89,5	12,5-280
EpCAM	Promedio \pm DE	0,6 \pm 0,5	2,5 \pm 1,5	25,0 \pm 2,6	24,5 \pm 18,9	73,0 \pm 87,6	36,6 \pm 37,7
	Mediana	0,5	2,5	23,5	20	50	24,3
	Intervalo	0-1,5	1-4	23,5-28	3,5-70,3	6,0-310,5	12-111

La Tabla 2 resume los datos de las CTC capturadas de muestras clínicas. Las muestras de sangre de pacientes y donantes sanos (controles negativos) se infundieron en un chip para CTC modificado con IgG o FAP α /EpCAM. Se presenta el número de células clasificadas como CTC en 1 ml de sangre. Las células se clasificaron como CTC utilizando tinción (DAPI+; CK+; CD45-). El número de mediciones se indica entre paréntesis.

En todas las muestras de sangre analizadas obtenidas de PDAC metastásico, melanoma y cánceres colorrectales se detectaron CTC en ambos lechos de afinidad. En el lecho anti-FAP α , la mayor sensibilidad se observó para las CTC obtenidas de sangre de pacientes con cáncer colorrectal. El melanoma metastásico y el PDAC mostraron una mediana similar, pero con valores promedio más altos para el melanoma. En el lecho anti-EpCAM, la mayor sensibilidad de la detección de CTC se informó en el melanoma, seguida de los pacientes con cáncer colorrectal y PDAC metastásico. Para todas las CTC relacionadas con la enfermedad metastásica, los recuentos de estas células fueron significativamente diferentes en comparación con los controles negativos y los tumores benignos.

La sangre de 4 pacientes inicialmente identificados/diagnosticados como pacientes con PDAC localizado y operable se analizó el día de la cirugía programada (OR) y se contaron las CTC. Los recuentos de CTC, sin embargo, fueron similares a los observados para la enfermedad PDAC metastásico. Tras el inicio de la cirugía y la inspección laparoscópica del páncreas y del área del abdomen de los pacientes, el diagnóstico se cambió a PDAC metastásico.

Los procedimientos descritos en el presente documento también se pueden usar para comparar el número de células seprasa+ con el de CTC EpCAM+ derivadas de un tumor. La proporción de CTC que expresan seprasa y CTC que expresan EpCAM se puede usar para determinar el potencial metastásico del tumor. El análisis de las CTC contadas en ambos lechos de afinidad para pacientes individuales que presentaban diferentes enfermedades mostró una subpoblación de células dominante variable. Los datos se resumen en la Tabla 3. Se observó un número mayor de CTC Fap+ en PDAC localizado y cáncer colorrectal metastásico, mientras que se observó que las células EpCAM+ eran dominantes en melanoma metastásico y PDAC metastásico. La mediana para la proporción FAP α /EpCAM fue de 1,21, 1,16, 0,87, 0,69 para PDAC local, cáncer colorrectal metastásico, PDAC metastásico y melanoma metastásico, respectivamente. El recuento de estas dos subpoblaciones y sus proporciones pueden servir como un marcador que indica el estadio de la enfermedad.

Tabla 3. Proporción de expresión de seprasa y EpCAM en CTC de varios cánceres

Proporción de células Fap α a EpCAM	PDAC localizado (n = 28)	PDAC metastásico (n = 16)	CRC metastásico (n = 6)	Melanoma metastásico (n = 11)
Fap α \geq EpCAM	70 %	44 %	83 %	36 %
EpCAM > Fap α	30 %	56 %	17 %	64 %

Ejemplo 3

Análisis de expresión de las CTC capturadas con el reactivo de afinidad dirigido a seprasa

Usando los procedimientos descritos en el presente documento, las CTC se capturaron, se liberaron, se contaron mediante detección de impedancia (no se realizó tinción) y se recogieron en un microtubo. Las CTC recogidas se centrifugaron y se lisaron usando ~ 20 μ l de solución de lisis de un kit Cell-to-CT™ disponible comercialmente (Life Technologies, Grand Island, N.Y.). La tecnología Cells-to-CT™ permite la transcripción inversa de lisados de 10–10⁵ células sin aislar ni purificar el ARN. La eliminación de la etapa de aislamiento del ARN agiliza y simplifica sustancialmente el análisis de la expresión génica de las células. De forma alternativa, la lisis de las CTC y el aislamiento del ARN se realizaron directamente usando el lecho de captura de CTC. Esto se puede realizar cuando se usa otro conjunto de chips conectados en serie, modificado con FAP α y EpCAM, para contar las células y caracterizar su fenotipo mediante inmunotinción.

Después de la lisis, las muestras se trataron con DNasa para eliminar el ADN residual de la muestra de ARN total (ARNT). Se realizaron reacciones de transcripción inversa tanto positivas como negativas (sin enzima RT) con 10 μ l de ARNT de CTC en un volumen total de 50 μ l. La reacción de RT se realizó con M-MuIV a 37 °C durante 60 minutos. Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar 15 niveles de expresión génica usando un ensayo SYBR Green en un instrumento 7900HT Applied Biosystems equipado con una placa de 384 pocillos. Se recogieron los perfiles de expresión génica de las CTC seprasa+ y EpCAM+ capturadas. Se evaluaron los siguientes genes (es decir, marcadores epiteliales, mesenquimatosos, EMT y CSC (células madre cancerosas)): EpCAM, KRAS, CD133, CD146, KRT19, CD34, GAPDH, CD24, FAP, ACT2, VIM, NANOG, CD44, CXCR4 y TWIST1 (Tabla 4).

Tabla 4. Marcadores de expresión génica evaluados en CTC aisladas

Gen	Función / Implicación
EpCAM	Marcador epitelial
KRAS	Oncogén, potencialmente contiene mutación
CD133	CD133+ muestra las propiedades de CSC
CD146	Activador de EMT
KRT19	Marcador epitelial
CD34	Marcador hematopoyético normal
GADPH	Gen constitutivo
CD24	Oncogén sobreexpresado en muchos tumores malignos humanos. Las células CD24+ CD44+ EpCAM+ tienen un potencial oncogénico 100 veces mayor
FAP	Marcador de fibroblastos (CAF)
ACT2	Marcador de EMT, activación asociada con un mal pronóstico
VIM	Regulación por incremento durante EMT
NANOG	Marcador de CSC

CD44	Participa en la proliferación celular, diferenciación, migración, señalización de supervivencia celular y angiogénesis. Asociado con actividades patológicas de células cancerosas.
CXCR4	Sobreexpresado en cánceres epiteliales sólidos, se ha observado que conduce a metástasis
TWIST1	Regulación por incremento durante EMT

5 Todos los valores de expresión génica se normalizaron al nivel de expresión de GAPDH, un gen constitutivo. En primer lugar, se evaluó la eficacia de las amplificaciones con cada pareja de cebadores a diferentes temperaturas de hibridación, tras lo que se determinaron las condiciones óptimas de termociclado para qPCR de ADNc sintetizado a partir del ARNm de las CTC. Un volumen de PCR de 10 µl contenía 1-2 µl de ADNc sintetizado.

10 El nivel de expresión del ARNm de EpCAM en las CTC EpCAM+ se comparó entre diferentes enfermedades. La expresión más alta se observó en el melanoma metastásico y el cáncer colorrectal metastásico. Tanto para PDAC localizado como metastásico, los niveles de expresión de ARNm de EpCAM fueron bajos, con el nivel más bajo para PDAC metastásico. El ARNm de EpCAM cuantificado mostró un amplio intervalo de niveles de expresión (4 órdenes de magnitud) en las CTC aisladas. Asumiendo la correlación de la expresión de ARNm y de proteína, la observación anteriormente mencionada indicaría que el dispositivo de captura de CTC puede aislar CTC incluso con baja expresión de antígenos en la superficie celular.

15 Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia a ejemplos específicos, será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de captura de células tumorales circulantes de una muestra, que comprende
 - 5 (i) poner en contacto la muestra con un reactivo de afinidad dirigido a seprasa de mamífero,
 - (ii) poner en contacto la muestra con un reactivo de afinidad dirigido a EpCAM de mamífero, y
 - 10 (iii) capturar las células retenidas en las etapas (i) y (ii), capturando así las células tumorales circulantes de la muestra,

en el que el reactivo de afinidad dirigido a seprasa y el reactivo de afinidad dirigido a EpCAM se inmovilizan cada uno sobre una superficie de un soporte sólido.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de afinidad dirigido a seprasa es un inhibidor competitivo o no competitivo de seprasa.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el reactivo de afinidad dirigido a seprasa es un anticuerpo, un aptámero de ácido nucleico, un aptámero peptídico o un ligando peptídico de seprasa.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el ligando peptídico de seprasa se selecciona entre ácido Ac-Gly-prolinaborónico (Ac-Gly-BoroPro) y difenilfosfonato de prolina (Gly-ProP(OPh)₂).
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de afinidad dirigido a EpCAM es un anticuerpo.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de afinidad dirigido a seprasa y el reactivo de afinidad dirigido a EpCAM se aplican de forma consecutiva o simultánea.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es una parte de un dispositivo microfluídico.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa de liberación de las células tumorales circulantes capturadas.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la liberación se logra mediante la adición de un exceso de agente de unión a seprasa soluble, mediante la adición de un compuesto de avidina o mediante fotoescisión o mediante degradación enzimática de un conector bifuncional.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el conector bifuncional contiene un sitio que se puede escindir enzimática o químicamente.
- 40 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es una muestra de tumor o una muestra de sangre de un paciente que tiene un tumor.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la detección de seprasa y EpCAM en las células capturadas.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende además la determinación de la proporción de células que expresan seprasa y células que expresan EpCAM.
- 50 14. Un procedimiento de detección de la presencia de un tumor maligno en un paciente mediante la captura de células tumorales circulantes de una muestra del paciente mediante un procedimiento de la reivindicación 1.
15. Un procedimiento de evaluación del riesgo de desarrollar un tumor metastásico en un paciente que tiene o ha tenido un tumor mediante la captura de células tumorales circulantes de una muestra del paciente mediante el procedimiento de la reivindicación 1.
- 55 16. El procedimiento de la reivindicación 14 o 15, en el que la muestra del paciente comprende sangre completa, secreciones corporales, cualquier fracción sanguínea que contenga células, un tumor fragmentado, una suspensión de células tumorales o un cultivo celular establecido a partir de una muestra del paciente, o el sobrenadante del cultivo, o un xenoinjerto establecido a partir de un tumor del paciente.
- 60 17. El procedimiento de la reivindicación 1 o 5, que comprende además una etapa de detección de uno o más de los siguientes biomarcadores: CD146, CK5, CK7, CK18, CK19, CD44, Cd44v6, EphB4, IGF-1R, BCL2, HER2, HER3, CA19-9, CEA, CD133, MUC1, N-cadherina, survivina, EGFR, KRAS, BRAF, p53, Pi3KCA, PTEN, KRT19, CD34, CD24, ACT2, VIM, NANOG, CXCR4 y TWIST1 en las células capturadas.
- 65

FIGURA 1

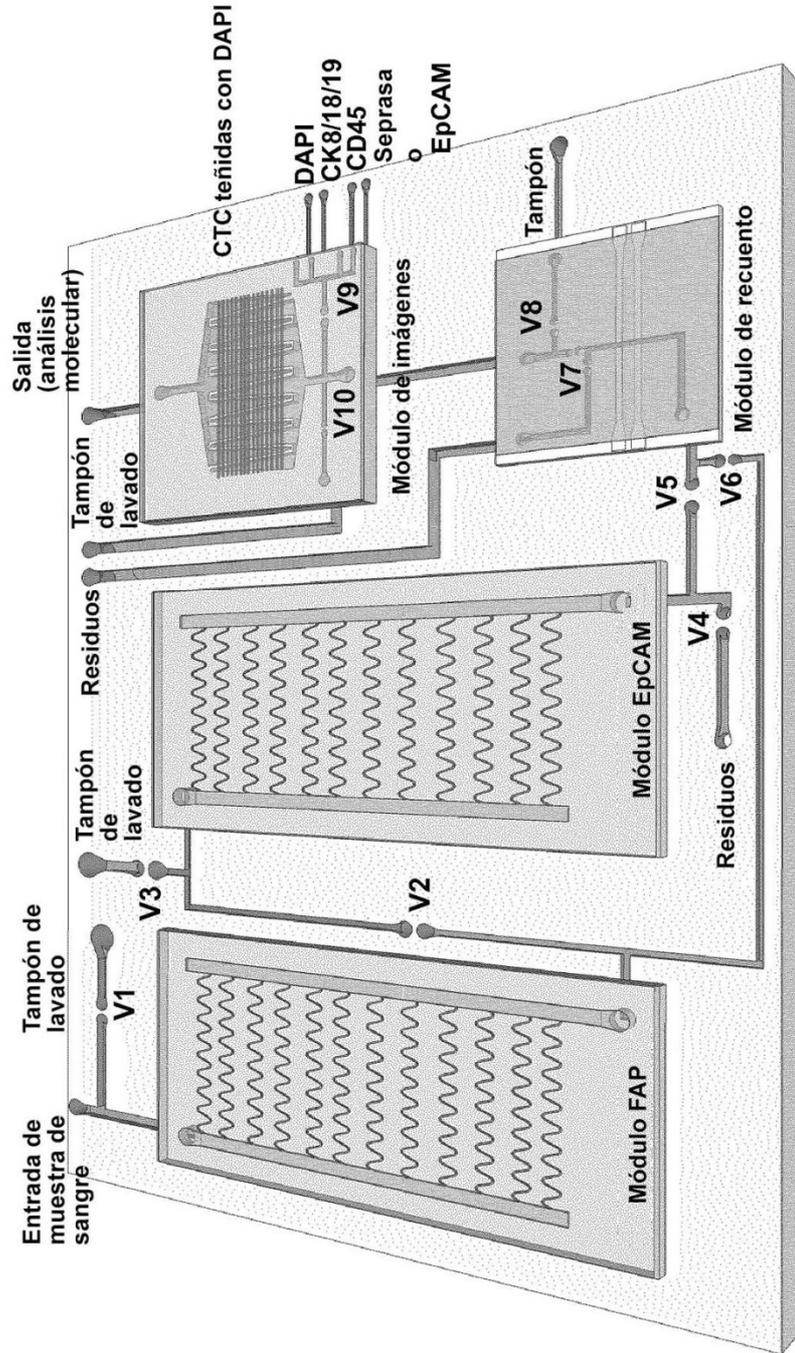


FIGURA 2

