

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 127**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2011 PCT/US2011/039596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11156468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2011 E 11735930 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2580594**

54 Título: **Un método para predecir resultados clínicos para pacientes con melanoma usando células de melanoma circulantes en sangre**

30 Prioridad:

08.06.2010 US 352441 P

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

12.06.2018

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
10355 Science Center Dr. No.210
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**RAO, GALLA, CHANDRA y
CONNELLY, MARK, C.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 672 127 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).

Un método para predecir resultados clínicos para pacientes con melanoma usando células de melanoma circulantes en sangre

Descripción

5

Antecedentes

10 El tratamiento de melanoma avanzado es complicado por su histopatología heterogénea y los cambios en su estructura que se acumulan durante la progresión del tumor. La enumeración y caracterización de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer metastásico de mama o colorrectal han demostrado proporcionar un pronóstico independiente e información predictiva que es clínicamente significativa y puede usarse para controlar la gestión de pacientes.

15 Las células tumorales circulantes (CTC) han demostrado ser un enlace fundamental entre cáncer primario, una etapa en la enfermedad cuya cura es posible, y enfermedad metastásica, que continua siendo la causa principal de muerte para la mayoría de malignidades. Los estudios clínicos han demostrado que CTC son biomarcadores poderosos de pronóstico y predictivos en cáncer metastásico de mama, y se han presentado hallazgos similares en cáncer de próstata y cáncer colorrectal. Estos datos muestran que CTC representan la biología subyacente que lleva a cáncer metastásico y sugieren que más análisis celulares y moleculares de estas células pueden revelar nuevos conocimientos sobre la regulación molecular de metástasis y respuesta a la terapia.

20 Los métodos para capturar, enumerar y caracterizar CTC se han modificado para capturar, enumerar y caracterizar células de melanoma circulantes (CMC) en sangre de pacientes. Véase Enumeración y Caracterización Automatizada de Células de Melanoma Circulantes en Sangre, Patente de Estados Unidos N° 12/254188, presentada el 20/10/2008. Aunque CMC se capturaron, enumeraron y caracterizaron mediante este método, no se conoció el valor predictivo con respecto a la supervivencia a corto plazo de pacientes con melanoma metastásico. Esta invención ofrece un método para predecir la supervivencia general para pacientes con melanoma metastásico.

25 US 2009/0136946 analiza un método para enumerar células cancerígenas circulantes, pero no analiza una etapa para predecir la supervivencia general de un paciente si el número de células de melanoma circulantes detectadas es mayor o menor que dos. Ulmer et al., 2004 analiza un método de análisis de células de melanoma circulantes que usa 50ml de sangre. Steen et al., 2008, proporciona una análisis de la bibliografía sobre células tumorales circulantes en melanoma y una descripción de una nueva técnica. Chandra et al., 2008, se refiere a la enumeración y caracterización automatizadas de células de melanoma circulantes en sangre. Medic et al., 2007, se refiere a marcadores moleculares de células de melanoma criculantes.

Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. Recuperación de números conocidos de células SK-Mel28 clavadas de sangre total. Las células SK-Mel28 clavadas en las muestras de donantes sanos (esto es, 0, 5, 18, 72, 280 y 1183 células) se clavarón en 7,5 mL de sangre de cinco donantes sanos en cada uno de los 2 días con un total de 5 muestras diferentes en cada nivel celular. El número de células clavadas se traza versus el número observado de células recuperadas.

35 Figura 2. Filas A-E representan objetos que se identificaron con el software CellTracks Analyzer II® como objetos que tienen tanto la señal DAPI como PE en una muestra de un paciente con melanoma. De derecha a izquierda, las imágenes en miniatura representan la señal Ki67 FITC, la señal CD45 y/o CD34 APC, la señal DAPI, la señal HMW-MAA PE y la señal de capa de DAPI (morado) y HMW-MAA (verde). La célula en la Fila A se excluye como una célula de melanoma como expresa CD45 y/o CD34, la célula en las Filas B y C se clasifican como célula de melanoma que no expresa Ki67 y la célula en las Filas D y E se clasifica como célula de melanoma que expresa Ki67.

40 Figura 3. Galería de imágenes típicas de CMC del CellTracks Analyzer II® obtenidas de 7,5 mL de sangre de paciente con melanoma.

45 Figura 4. Prevalencia de CMC en 7,5 mL de sangre de 55 donantes sanos, 79 muestras de 44 pacientes con melanoma metastásico, Panel A y el porcentaje de Ki67 que expresa CMC en 19 muestras de 16 pacientes con melanoma, Panel B.

50 Figura 5. Kaplan-Meier estima las probabilidades de Supervivencia General en pacientes con melanoma metastásico para aquellos con <2 células de melanoma circulantes por 7,5 ml de sangre total y aquellos en el grupo con ≥ 2 células de melanoma circulantes en 7,5 ml de sangre total. Se calcularon OS veces desde el tiempo de cada extracción de sangre. La supervivencia media es 12,1 meses para el grupo con < 2 CMC versus 2,0 meses para las personas con ≥ 2 CMC (P = 0,001 por el test log-rank; proporción de riesgo de muerte en pacientes con ≥ 2 células por 7,5 ml, 3,2).

65

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para predecir supervivencia general para pacientes con melanoma metastásico en una muestra de 7,5 mL de sangre que se ha obtenido de un paciente con melanoma metastásico, comprendiendo dicha mezcla una población celular mezclada sospechosa de contener células de melanoma circulantes; donde el método comprende: (a) enriquecer una fracción de dicho espécimen mediante enriquecimiento inmunomagnético usando un campo magnético aplicado externamente para separar partículas paramagnéticas acopladas a anticuerpos CD146, hasta la exclusión sustancial de otras poblaciones, conteniendo dicha fracción dichas células de melanoma circulantes; (b) confirmar integridad estructural de dichas células de melanoma circulantes para que estén intactas, donde dicha integridad estructural se determina mediante un tinte de ácido nucleico y un anticuerpo monoclonal específico para antígeno asociado de melanoma con alto peso molecular, y que además contenga CD45 y CD34 para excluir leucocitos co-enriquecidos y células endoteliales circulantes; (c) analizar dichas células de melanoma circulantes; donde dicho análisis se correlaciona con la progresión de la enfermedad; (d) evaluar el número de células de melanoma circulantes en dicha muestra de sangre; donde si el número es mayor que o igual a 2 se predice que la supervivencia general del paciente no será más de dos meses y si el número de células de melanoma circulantes es menor que 2, se predice que la supervivencia general del paciente será 12 meses.

Como aquí se usa, el término “enriquecer” significa aislar CMC de la muestra de sangre de la etapa (a). Los métodos de enriquecimiento incluyen el uso de anti CD146 acoplado a partículas magnéticas para capturar células de la muestra de sangre. El término “confirmar” significa determinar si las células aisladas son CMC u otros componentes celulares. Los métodos para confirmar incluyen tinción de CMC con diferentes anticuerpos monoclonales con etiquetas fluorescentes y los anticuerpo son CD45 y CD34 para excluir leucocitos y células endoteliales, y antígeno asociado con melanoma de alto peso molecular, HMW-MAA, para identificar células de melanoma. El término “analizar” significa evaluar las CMC capturadas para determinar si la CMC expresan una variedad de marcadores específicos de melanoma como HMW-MAA, MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por células T) y otros marcadores tales como Ki67. El método preferente para analizar significa determinar si las CMC expresan Ki67 y/o HMW-MAA. El término “evaluar” significa determinar cuántas CMC hay en la muestra y usar métodos que incluyen, aunque no se limitan a, análisis automatizado de imagen. El método preferente para evaluar es el uso de CellTracks Analyzer II®.

La invención se demuestra mediante los siguientes métodos y ejemplos. Estos ejemplos y métodos no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Los siguientes métodos se proporcionan para facilitar la práctica de la presente invención.

Pacientes y recogida de sangre. Se extrajo sangre de voluntarios sanos y pacientes con melanoma maligno en un tubo para extracción de sangre conservada y evacuada CellSave de 10 ml (Veridex LLC, Raritan, NJ) y se procesó en 72 horas.

Todos los pacientes se inscribieron del Departamento de Oncología Médica en la Universidad de Oxford en el Hospital Churchill usando un protocolo aprobado por el Comité de Ética de Investigación. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado por escrito. Se inscribieron cuarenta y cuatro pacientes, 25 hombres y 19 mujeres, y su rango de edad fue 31-81 (media 59). En el momento de la primera extracción de sangre 39/44 (86%) tenían enfermedad metastásica y 5 pacientes tenían enfermedad sin extirpar en fase II. 38/44 (78%) de los pacientes con enfermedad metastásica tenía enfermedad visceral, 5/44 (11%) no tenía implicación visceral y para 1 paciente no se registraron los sitios metastásicos. La duración media del seguimiento fue 10,1 meses. La sangre siempre se extrajo de pacientes con cáncer antes o un mínimo de 7 días después de la administración de terapia intravenosa. Cincuenta y cinco voluntarios sanos se incluyeron como controles y no tenían enfermedades conocidas ni fiebre en el momento de la extracción, ni historial de enfermedades malignas.

Cultivo celular y pulsación celular. La línea celular de melanoma SK-Mel28 se cultivó en matraces que contenían RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal bovino y posteriormente se extrajo sin tripsinización. Las suspensiones celulares se usaron solamente cuando su viabilidad como la evaluada por exclusión de azul de tripano excedió el 90%. Para determinar el número real de células, se añadieron 200 µL de amortiguador y 20 µL de gotitas fluorescentes (Beckman-Coulter, Inc., Miami, FL) que contenían aproximadamente 20.000 gotitas totales a una alícuota de 50 µL de las células SK-Mel28. Las células SK-Mel28 se tiñeron con anti HMW-MAA conjugado con PE para detección. Los tubos de duplicado que contenían gotitas solamente funcionaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur; BD Sciences, San Jose, CA) hasta que se aspiró el 100% de la muestra. Los tubos experimentales se analizaron después para por triplicado en un citómetro de flujo hasta que se contaron 10.000 gotitas en cada tubo. El número de células SK-Mel28 se determinó usando el número conocido de gotitas por volumen de unidad.

Preparación de muestra. 7,5 mL de sangre se transfirió a tubos de muestra CellTracks® AutoPred® de 15 mL y se mezclaron con 6,5 mL de amortiguador, centrifugaron a 800g durante 10 minutos y después se colocaron en el CellTracksAutoPred® (Veridex LLC) para preparación automática de muestra. Los reactivos se optimizaron para

captura y detección de células de melanoma y consistieron en ferrofluidos cubiertos con anticuerpos CD146 para enriquecer inmunomagnéticamente tanto las células de melanoma como las células endoteliales, un reactivo para mejora de captura para maximizar la eficiencia de captura, un anticuerpo conjugado con ficoeritrina que se enlaza con antígeno asociado a melanoma con alto peso molecular (HMW-MAA) (clon 9.2.27, Veridex LLC) para identificar células de melanoma, una mezcla de dos anticuerpos conjugados con alofococianina para identificar leucocitos (CD45, clon H130, Veridex LLC) y células endoteliales (CD34, clon 581, BD Biosciences), un anticuerpo conjugado con FITC que identifica la proteína Ki-67 (clon B56, BD Biosciences, San Jose, CA), el tinte nuclear 4',6-diamidino-3-fenilindol (DAPI) para identificar células nucleadas y amortiguadores para lavar, permeabilizar y volver a suspender las células. En la etapa final del proceso, las células se volvieron a suspender en el dispositivo de presentación celular MagNest® (Veridex LLC). El campo magnético generado por el dispositivo MagNest provoca que las células magnéticamente etiquetadas se distribuyan uniformemente sobre la superficie de análisis del cartucho, listas para análisis usando el CellTracks Analyzer®.

Análisis de muestra. El MagNest se coloca en el CellTracks Analyzer®, un microscopio de fluorescencia semi-automático con cuatro colores. Las imágenes que contenían eventos positivos de PE y DAPI se presentan en una galería para clasificación de los eventos por el usuario en base a la fluorescencia celular y a la morfología. Los criterios para un objeto se definirán como una célula de melanoma que incluye una morfología de redonda a ovalada, un núcleo visible (DAPI positivo), tinción positiva para HMW-MAA y tinción negativa para CD45 y CD34. Las células de melanoma se dividieron en KI67 + células Ki-67. Los resultados de la enumeración celular siempre se expresan como en número de células por 7,5 mL de sangre.

Precisión, sensibilidad y linealidad de detección de células de melanoma. Para experimentos de precisión, linealidad y sensibilidad, células SK-Mel28 se clavaron en 7,5 mL de sangre recogida en tubos conservantes CellSave en 6 niveles diferentes de células (0, 5, 18, 72, 280 y 1183). El número exacto de células clavadas en sangre se determinó mediante citometría de flujo. Las muestras se procesaron 24 horas después de clavar la sangre en un CellTracks AutoPrep® y se analizaron con un CellTracks Analyzer®. El análisis de muestras se realizó durante dos días diferentes con un total de 5 muestras diferentes en cada nivel celular.

Análisis estadístico

El final principal fue la supervivencia general, medida en el momento desde la fecha de la muestra hasta la fecha de la muerte por cualquier causa. Los pacientes que se perdieron en el seguimiento o que seguían vivos al final del estudio fueron censurados la última fecha que se conoció que estaban vivos o al final de la fecha del estudio. Si había múltiples muestras por paciente, se usó la última muestra para análisis de supervivencia. La supervivencia general se calculó usando el método Kaplan-Meier y se generó el cuadro de supervivencia. Los modelos de regresión de Cox se usaron para determinar las proporciones de riesgo (PR) de muerte. Los resultados se analizaron en SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Ejemplo 1

Recuperación de línea celular clavada en cultivo de tejido (SK-Mel28).

En este ejemplo, se describe la realización del ensayo usando sangre total clavada con células SK-Mel28. El protocolo usado para este estudio fue el siguiente. Se extrajo sangre total en tubos CellSave de voluntarios sanos y se clavaron con células SK-Mel28 de melanoma en cultivo de tejido. Se clavaron varios números de células SK-Mel28 en sangre, y se midió la recuperación. El número esperado de células SK-Mel28 clavadas en las muestras de donantes sanos (esto es, 0, 5, 18, 72, 280 y 1183 células) trazadas contra el número real de células SK-Mel28 observadas en las muestra en la Figura 1, y los resultados se resumen en la Tabla 1. La recuperación media de células clavadas fue 88%, con recuperación de 74% en el clavo más alto versus 88% en el clavo de 5 SK-Mel28. La correlación Pearson R^2 fue 0,99. Como se esperaba, el coeficiente de variación (CV) aumentó cuando el número de células clavadas disminuyó, oscilando entre 7% en las 1.183 células clavadas y 31% en las 5 células clavadas. La recuperación de células SK-Mel28 oscilo entre 64 y 120% y no disminuyo con menos números de células.

Tabla 1

Precisión de método medida por recuperación de células SK-Mel28 clavadas en 7,5 mL de sangre de cinco donantes sanos

5

	Conteo CMC esperado	Conteo CMC observado			% Recuperación		
		Media	SD	95%I	Media	95%CI	%CV
	0	0	0	0	0	0	0
10	5	4	1	3-5	88	64-112	31
	18	20	2	18-22	110	100-120	10
	72	63	11	53-73	87	74-100	17
	287	234	15	221-247	81	77-85	6
15	1183	880	56	831-929	74	70-78	7

Identificación de células de melanoma circulantes. Las imágenes en miniatura de una capa de HMW-MAA PE y HMW-MAA PE, DAPI, CD45/CD34 APC y Ki67 se presentan para que el operario las analice. La presencia de un núcleo, expresión de HMW-MAA, morfología celular y una falta de expresión de CD45 y CD34 son las características necesarias de una CMC. La Figura 2 muestra 6 eventos de un paciente de melanoma que se presentan al crítico. El Panel A muestra una tinción celular con DAPI y HMW-MAA pero también con CD34 y/o CD45 y por lo tanto no se clasifica como CMC. Los Paneles B, C, D y E muestran tinción celular con DAPI y HMW-MAA pero no con CD34 o CD45 y se clasifican como CMC. La CMC en los Paneles B y C no expresan Ki67 mientras que la CMD en los Paneles D y E sí lo hacen. Hay que señalar que las CMC en el Panel B contienen dos núcleos y no se tiñen con Ki67 mientras que la CMC en el Panel D parece estar dividiéndose activamente y de hecho expresa Ki67. El tamaño de las CMC y su proporción de núcleo con citoplasma varía en gran medida entre CMC entre pacientes con melanoma. La Figura 3 muestra una galería de imágenes de CMC de diferentes pacientes con una forma característicamente de redonda a ovalada y en núcleos intactos. Los tamaños celulares variaron en un rango de 4 µm a 30 µm. También se observaron pequeños grupos celulares y CMC con múltiples núcleos.

20

25

30

Ejemplo 2

Frecuencia de células de melanoma circulantes en voluntarios sanos y pacientes con melanoma

35

En este ejemplo, se describe la frecuencia de células de melanoma circulantes en voluntarios sanos. Se enumeraron CMC en 55 muestras de sangre de donantes sanos y 79 muestras de sangre de 44 pacientes con melanoma metastásico. La Figura 4, Panel A muestra el número de CMC detectadas en 7,5 mL de sangre del grupo de control y los pacientes. La evaluación de expresión de Ki67 se determinó en 19 muestras de 17 pacientes donde se detectaron CMC. El porcentaje de Ki67 + CMC osciló entre el 34 y 100% con una media de 85% (SD25). El Panel B de la Figura 4 muestra la expresión de Ki67 y el número de CMC detectadas en estas muestras. En los 55 donantes sanos se clasificaron tres células como CMC y estas tres no expresaron Ki67.

40

Ejemplo 3

Células de melanoma circulantes y supervivencia general en paciente con melanoma

45

Ninguno de los individuos en el grupo de control tuvo 2 o más CMC detectadas y se eligió este límite para discriminar entre grupos de pacientes. El tiempo OS medio para aquellos pacientes con <2 CMC fue 12,1 meses (95% CI 9,7 a 14,4) y fue significativamente más largo que el tiempo OS medio para aquellos pacientes con ≥2 CMC, 2,0 meses (95% CI 0 a 4,9) (Figura 5). Log-rank fue 0,001. La proporción de riesgo de muerte fue 3,2 (95% CI 1,6-6,5) por regresión de Cox. Los cuatro pacientes que murieron en un mes después de la extracción de sangre tenían números relativamente altos de CMC (2, 8, 10 y 8043 CMC/7,5 ml).

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para predecir supervivencia general para pacientes con melanoma metastásico en una muestra de sangre de 7,5 mL que se había obtenido de un paciente con melanoma metastásico, comprendiendo dicha mezcla una población celular mezclada sospechosa de contener células de melanoma circulantes; donde el método comprende:
- 10 (a) enriquecer una fracción de dicho espécimen mediante enriquecimiento inmunomagnético usando un campo magnético aplicado externamente para separar partículas paramagnéticas acopladas a anticuerpos CD146, hasta la exclusión sustancial de otras poblaciones, conteniendo dicha fracción dichas células de melanoma circulantes;
- 15 (b) confirmar integridad estructural de dichas células de melanoma circulantes para que estén intactas, donde dichas integridad estructural se determina mediante un tinte de ácido nucleico y un anticuerpo monoclonal específico para antígeno asociado de melanoma con alto peso molecular, y que además contenga CD45 y CD34 para excluir leucocitos co-enriquecidos y células endoteliales circulantes;
- 20 (c) analizar dichas células de melanoma circulantes; donde dicho análisis se correlaciona con la progresión de la enfermedad;
- (d) evaluar el número de células de melanoma circulantes en dicha muestra de sangre; donde si el número es mayor que o igual a 2 se predice que la supervivencia general del paciente no será más de dos meses, y si el número de células de melanoma circulantes es menor que 2, se predice que la supervivencia general del paciente será 12 meses.
- 25 2. El método como el reivindicado en la reivindicación 1, donde dicha integridad estructural se determina mediante un procedimiento seleccionado del grupo consistente en procedimientos inmunocitoquímicos, procedimientos FISH, procedimientos de citometría de flujo, procedimientos de citometría de imágenes y combinaciones de los mismos.
- 30 3. El método como el reivindicado en la reivindicación 1, donde se añade anti-Ki67 etiquetado con FITC para determinar la proporción de células de melanoma circulantes en ciclo celular activo en la circulación.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIG. 1

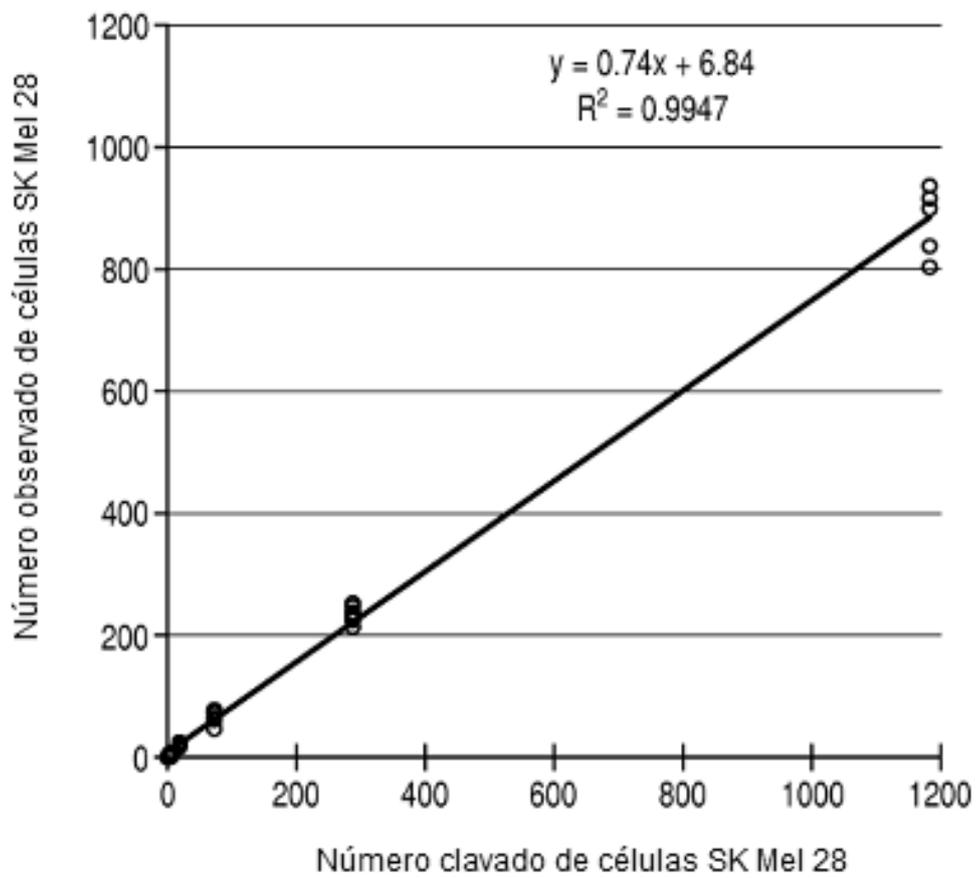


FIG. 2

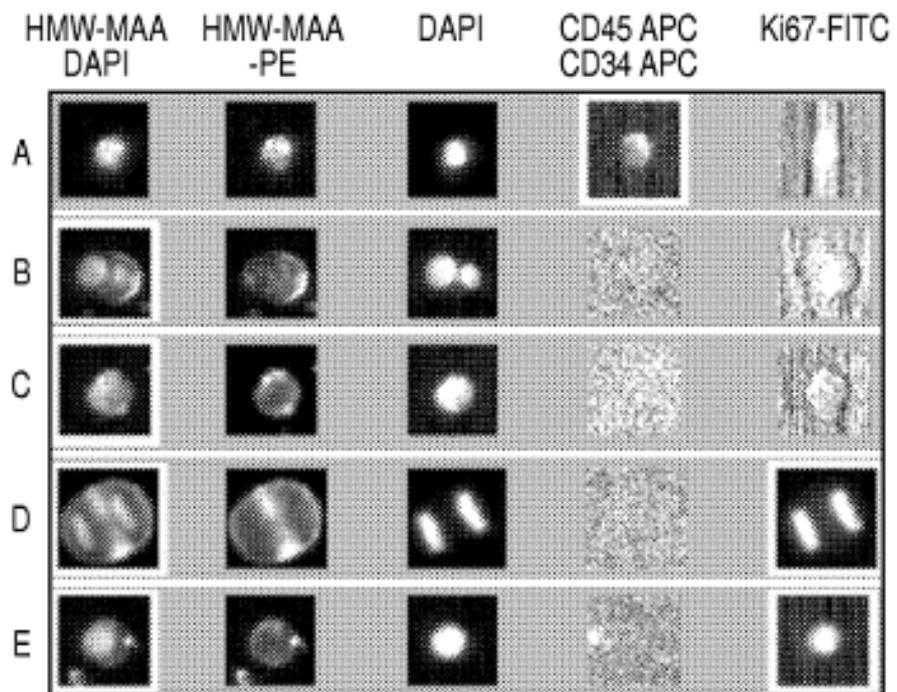


FIG. 3

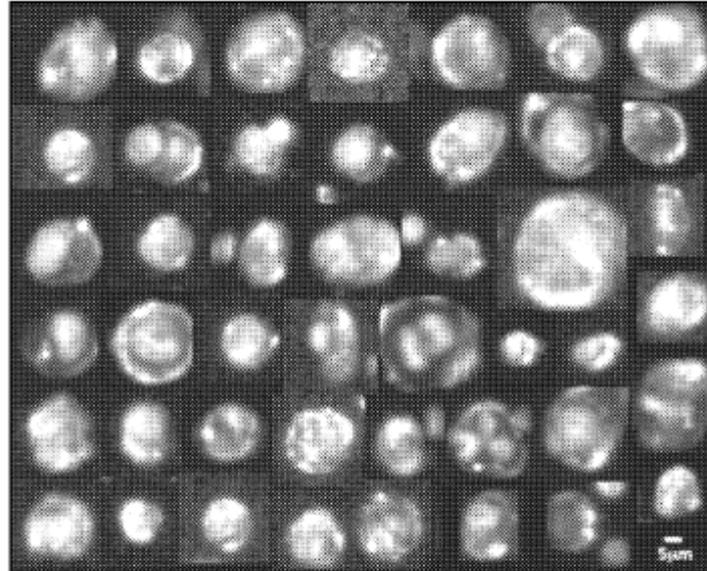


FIG. 4A

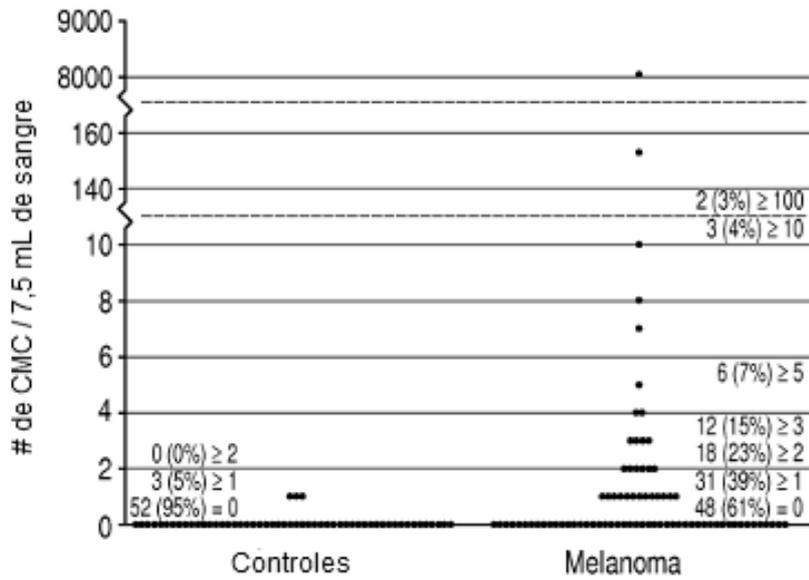


FIG. 4B

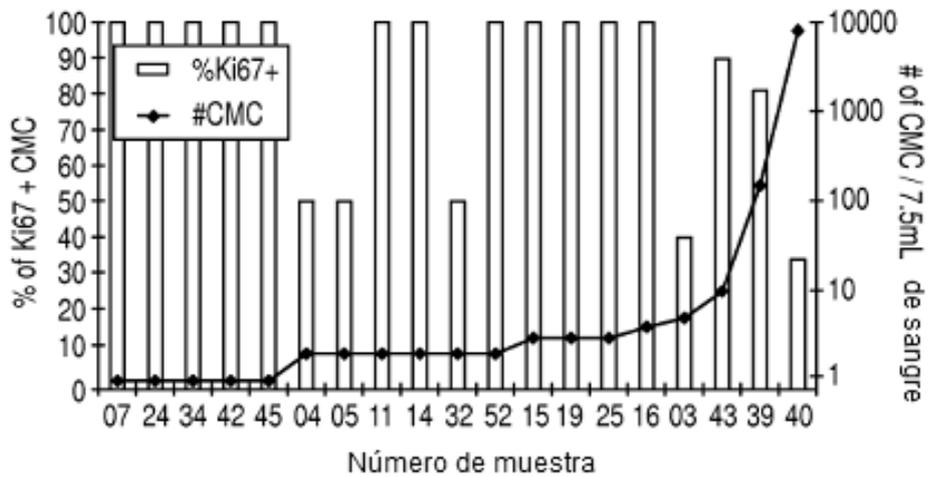
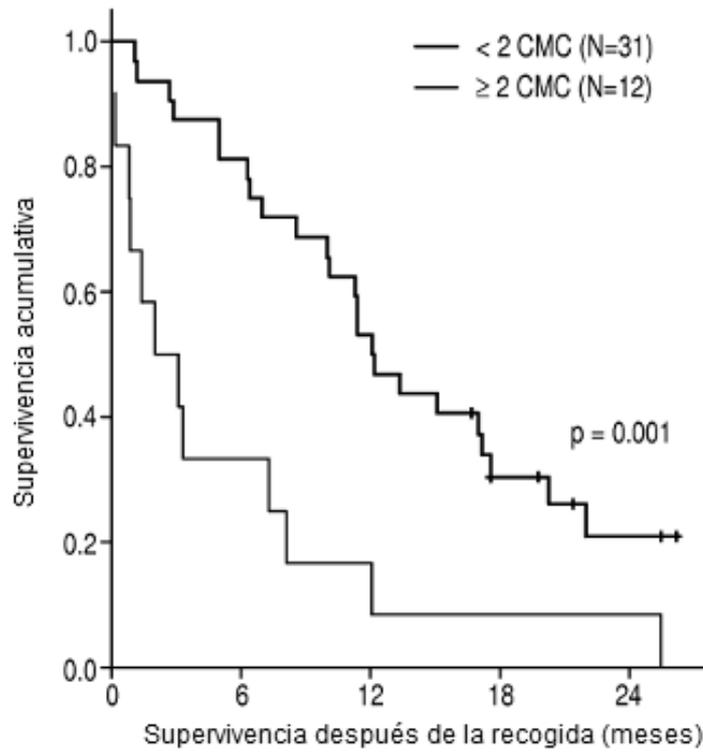


FIG. 5



Nº en riesgo					
< 2 CMC	32	26	17	8	4
≥ 2 CMC	12	4	2	1	1