

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 243**

51 Int. Cl.:

B01D 25/02 (2006.01)
B01D 39/16 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01D 29/00 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2013 PCT/US2013/043610**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181532**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2013 E 13797578 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2855663**

54 Título: **Captura, identificación y uso de un nuevo marcador de tumores sólidos en fluidos corporales**

30 Prioridad:

01.06.2012 US 201261654636 P
05.03.2013 US 201361773026 P
15.03.2013 US 201361787863 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2018

73 Titular/es:

CREATV MICROTECH, INC. (100.0%)
11609 Lake Potomac Drive
Potomac, MD 20854, US

72 Inventor/es:

ADAMS, DANIEL y
TANG, CHA-MEI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 680 243 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, identificación y uso de un nuevo marcador de tumores sólidos en fluidos corporales

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nº 61/654.636, presentada el 1 de junio de 2012, de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nº 61/773026, presentada el 5 de marzo de 2013, y de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Nº 61/787863, presentada el 15 de marzo de 2013.

Antecedentes

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la identificación de un biomarcador en sangre, que puede utilizarse para la detección de tumores sólidos y para controlar la eficacia de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia. La presente invención también se refiere al uso del biomarcador en combinación con células tumorales circulantes, con marcadores de cáncer de ADN sin plasma y suero, con marcadores de proteína asociados al cáncer y con otros biomarcadores.

Técnica relacionada

25 Cuando las células tumorales se separan de los tumores sólidos primarios, penetran en la circulación sanguínea o linfática, y finalmente abandonan la corriente sanguínea y entran en otro órgano o tejido para formar metástasis. El 90 % de las muertes relacionadas con el cáncer son causadas por el proceso metastásico. Los sitios metastásicos más comunes son el pulmón, el hígado, el hueso y el cerebro. Las células tumorales que se encuentran en la circulación reciben el nombre de células tumorales circulantes (CTC). Muchas publicaciones de investigación y ensayos clínicos muestran que las CTC tienen utilidad clínica (i) proporcionando información sobre supervivencia pronóstica y recurrencia del cáncer contando el número de células en la corriente sanguínea y (ii) proporcionando información sobre el tratamiento observando expresiones de proteínas, mutaciones genéticas y translocaciones en las CTC. Sin embargo, las CTC no pueden encontrarse sistemáticamente, incluso en pacientes en estadio IV.

35 Algunas afecciones médicas pueden diagnosticarse detectando la presencia de determinados tipos de células en el fluido corporal. En particular, las células indicativas o características de determinadas afecciones médicas pueden ser más grandes y/o menos flexibles que otras células encontradas en determinados fluidos corporales. En consecuencia, al recoger dichas células más grandes y/o menos flexibles de una muestra líquida de un fluido corporal, puede ser posible diagnosticar una afección médica en función de las células recogidas.

40 El documento WO2011 / 002649 enseña que se ha mostrado que las micropartículas relacionadas con tumores se correlacionan con el recuento de CTC y, por lo tanto, proporcionan un medio alternativo para evaluar la enfermedad metastásica. Leers et al (Am J Clin Pathol 2008; 129: 649-656) divulgan que los macrófagos circulantes que contienen antígeno prostático específico son una posible diana para la detección del cáncer de próstata. Caillou et al (PLoS ONE 2011; 6: e22567) investigaron el aumento de la densidad de los macrófagos asociados a tumores en cáncer anaplásico de tiroides. Wang et al (Cancer 2000; 88: 2787-2795) caracterizaron células circulantes de carcinoma de próstata aisladas de la sangre periférica.

Sumario

50 La presente invención se dirige a, y describe un, tipo de célula con características especiales que se encuentra en la sangre de pacientes con cáncer. En este documento se describe un tipo de célula denominada "célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer" (CAML, *Cancer Associated Macrophage-Like*) y se demuestra que dicha célula está asociada a la presencia de tumores sólidos en un paciente. Los datos presentados en este documento muestran que este tipo de célula tiene utilidad clínica porque puede utilizarse como biomarcador para una variedad de aplicaciones médicas. A través de microfiltración, utilizando microfiltros de precisión, este tipo de célula se ha encontrado sistemáticamente en la sangre periférica de cáncer de origen epitelial de estadio I a estadio IV.

60 Las CAML pueden utilizarse como un biomarcador para proporcionar un diagnóstico de cáncer, en particular, una detección precoz del cáncer, una detección precoz de la recurrencia del cáncer y una determinación de la mutación del cáncer. Las CAML también pueden utilizarse como biomarcador para determinar los ciclos de terapia apropiados, en particular, las células pueden utilizarse en una determinación rápida de la eficacia de la respuesta al tratamiento de quimioterapia y radioterapia.

Las CAML pueden utilizarse de forma independiente como un marcador de cáncer, y pueden utilizarse junto con las CTC, los ADN, las proteínas y otros biomarcadores libres en fluidos corporales para proporcionar una comprensión más completa de la enfermedad del paciente.

5 Más específicamente, y en una primera realización, la presente invención se refiere a métodos de exploración de
 10 cáncer en un sujeto, que comprenden detectar células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer
 (CAML) en una muestra de sangre de un sujeto, en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a)
 un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de
 aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada
 del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En aspectos particulares,
 cuando en la muestra biológica se detectan las CAML, el sujeto se identifica como que posiblemente tiene un
 carcinoma o un tumor sólido. En otros aspectos, cuando en la muestra biológica se detectan las CAML, el sujeto se
 15 identifica como que tiene un carcinoma o un tumor sólido. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta
 realización también incluyen detectar células tumorales circulantes (CTC) en la muestra biológica. En aspectos
 particulares de esta primera realización, el sujeto es un sujeto que se sospecha que tiene cáncer.

En una segunda realización, la presente invención se refiere a métodos para diagnosticar cáncer en un sujeto, que
 comprenden detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto, en donde cuando en la muestra de sangre
 se detectan las CAML, al sujeto se le diagnostica cáncer y en donde dicha célula CAML tiene las siguientes
 20 características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de
 célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma
 morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.
 En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta realización también incluyen detectar las CTC en la
 muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML y las CTC, al sujeto se le
 25 diagnostica cáncer.

En una tercera realización, la presente invención se refiere a métodos para detectar la recurrencia de cáncer en un
 sujeto, que comprenden detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto previamente tratado por cáncer,
 en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, se detecta recurrencia de cáncer y en donde dicha
 30 célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de
 aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a
 aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma
 de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta
 realización también incluyen detectar las CTC en la muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre
 35 se detectan las CAML y las CTC, se detecta la recurrencia del cáncer.

En una cuarta realización, la presente invención se refiere a métodos para confirmar un diagnóstico de cáncer en un
 sujeto, que comprenden detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto diagnosticado con cáncer, en
 donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, se confirma un diagnóstico de cáncer en el sujeto y
 40 en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño
 de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a
 aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma
 de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta
 realización también incluyen detectar las CTC en la muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre
 45 se detectan las CAML y las CTC, se confirma un diagnóstico de cáncer en el sujeto. En aspectos particulares, el
 diagnóstico inicial de cáncer es mediante mamografía, prueba de PSA, o presencia de CA125. En un aspecto
 particular, se sospecha que el sujeto tiene cáncer.

En aspectos de la primera a la cuarta realización, las CAML se detectan utilizando uno o más medios seleccionados
 50 del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, lisis de glóbulos rojos, FICOLL, una microplaca
 microfluídica y citometría de flujo, o una combinación de los mismos. En aspectos particulares, la metodología de
 exclusión por tamaño comprende el uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de
 tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 7-8 micrómetros son
 aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de un
 55 tamaño de aproximadamente 7-8 micrómetros son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos.

En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros
 uniforme.

60 En determinados aspectos de la primera a la cuarta realización, las CAML y las CTC se detectan simultáneamente
 utilizando un microfiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño. Los
 microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen un
 tamaño de poro de aproximadamente 7-8 micrómetros son aceptables e incluyen formas de poro redondas y
 rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de un tamaño de aproximadamente 7-8 micrómetros son

especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme.

5 En determinados aspectos de la primera a la cuarta realización, las CAML se detectan utilizando una microplaca microfluídica que se basa en la separación física en función del tamaño, separación hidrodinámica en función del tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas en función del tamaño.

10 En determinados aspectos de las realizaciones primera a cuarta, las CAML se detectan utilizando un ensayo de microfiltración a baja presión CellSieve™.

15 En aspectos de la primera a la cuarta realización, la muestra de sangre es sangre periférica. En el presente documento también se desvelan métodos en los que la muestra biológica es una o más seleccionada del grupo que consiste en ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. En otros aspectos la sangre es sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior o sangre de la vena yugular.

20 En aspectos de la primera a la cuarta realización, el cáncer es uno o más de un tumor sólido, cáncer en estadio I, cáncer en estadio II, cáncer en estadio III, cáncer en estadio IV, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer colorrectal.

25 En una quinta realización, la presente invención se refiere a métodos para controlar la eficacia de un tratamiento del cáncer, que comprende (a) determinar el número de CAML en una muestra de sangre de un sujeto antes del tratamiento del cáncer, y (b) comparar el número de CAML determinado en (a) con un número de CAML determinado a partir de una muestra de sangre similar del mismo sujeto en uno o más puntos temporales después del tratamiento. En determinados aspectos, los métodos comprenden además (c) determinar el número de CTC en la muestra de sangre de (a), y (d) comparar el número de CTC determinado en (c) con un número de CTC determinado a partir de la muestra de sangre de (b) y en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.

30

En aspectos de la quinta realización, un cambio en el número de CAML es una indicación de la eficacia del tratamiento, en donde el cambio es un aumento o una disminución en el número de CAML.

35 En aspectos de la quinta realización, el tratamiento del cáncer es quimioterapia o radioterapia.

40 En aspectos de la quinta realización, el número de CAML se determina utilizando uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, lisis de glóbulos rojos, FICOLL, una microplaca microfluídica y citometría de flujo, o una combinación de los mismos. En un aspecto particular, la metodología de exclusión por tamaño comprende el uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 7-8 micrómetros son aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de un tamaño de aproximadamente 7-8 micrómetros son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos.

45 En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme. En un aspecto particular, el número de CAML se determina utilizando una microplaca microfluídica que se basa en la separación física en función del tamaño, separación hidrodinámica en función del tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas en función del tamaño. En un aspecto particular, el número de CAML se determina utilizando un ensayo de microfiltración a baja presión CellSieve™.

50

55 En determinados aspectos de la quinta realización, los números de CAML y CTC se determinan simultáneamente utilizando un microfiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 7 a 8 micrómetros. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen poros de un tamaño de aproximadamente 7-8 micrómetros son aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme.

60 En aspectos de la quinta realización, la muestra de sangre es sangre periférica. En el presente documento también se desvelan métodos en los que la muestra biológica es una o más seleccionada del grupo que consiste en ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. En otros aspectos la sangre es sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior o sangre de la vena yugular.

En aspectos de la quinta realización, el cáncer es uno o más de un tumor sólido, cáncer en estadio I, cáncer en estadio II, cáncer en estadio III, cáncer en estadio IV, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer colorrectal.

5 En una sexta realización, la presente invención se refiere a una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer (CAML), en donde la célula tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En un aspecto de esta realización la célula tiene una o más o
10 cada una de las siguientes características adicionales: (d) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, en donde la citoqueratina se difunde, o se asocia con vacuolas y/o material ingerido; (e) fenotipo CD45 positivo; (f) expresión de EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*, moléculas de adhesión a células epiteliales) difusa con distribución casi uniforme; (g) expresión de uno o más marcadores de un tumor primario; (h) expresión de marcadores monocíticos CD11C y CD14; e (i) expresión de marcadores endoteliales CD146, CD202b y CD31. En un
15 aspecto particular, la célula tiene cada una de las características (f) - (i) adicionales.

En el presente documento también se desvela una célula tumoral circulante (CTC) aislada patológicamente definible, en donde la célula tiene una o más de las siguientes características: (a) núcleo de tipo canceroso; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde las citoqueratinas tienen un patrón filamentoso; y (c) fenotipo
20 CD45 negativo.

En el presente documento también se desvela una célula tumoral circulante (CTC) aislada, apoptótica, en donde la célula tiene una o más de las siguientes características: (a) núcleo de tipo canceroso; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde la citoqueratina está fragmentada en forma de manchas; y (c) fenotipo
25 CD45 negativo.

Breve descripción de los dibujos

30 Se obtendrá fácilmente una apreciación más completa de la presente invención y muchas de sus ventajas concomitantes, ya que dicha invención se comprenderá mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada cuando se tiene en cuenta en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

35 Las FIGS. 1A-1D muestran células tumorales circulantes encontradas en la sangre de pacientes con cáncer. Las imágenes en color fusionadas se generaron con DAPI (azul), CQ (citoqueratinas 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

40 Las FIGS. 2A-2D muestran células tumorales circulantes apoptóticas encontradas en la sangre de pacientes con cáncer. Las imágenes en color fusionadas se generaron con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

45 La FIG. La Fig. 3 muestra una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer (CAML) que se encuentra en la sangre de pacientes con cáncer. Esta imagen de color fusionada se generó con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

50 La FIG. 4 muestra una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer que se encuentra en la sangre de pacientes con cáncer. Esta imagen de color fusionada se generó con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

55 La FIG. 5 muestra una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer que se encuentra en la sangre de pacientes con cáncer. Esta imagen de color fusionada se generó con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y violeta CD45.

60 La FIG. 6 muestra una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer que se encuentra en la sangre de pacientes con cáncer. Esta imagen de color fusionada se generó con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

65 Las FIGS. 7A-7I muestran una galería de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer encontradas en la sangre de pacientes con cáncer. Las imágenes de color fusionadas se generaron con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

Las FIGS. 8A-8I muestran la expresión de distintas CQ 8, 18, 19, EpCAM y CD45, y el núcleo, y la imagen de color fusionada de cada una de las células en la FIG. 7. Las FIGS. 8B, 8C y 8D son de pacientes con cáncer de mama. Las FIGS. 8 A, 8F y 8G son de pacientes con cáncer de páncreas. Las FIGS. 8E, 8H y 8I son de pacientes con cáncer de próstata. Las imágenes de color fusionadas se generaron con DAPI (azul), CQ 8, 18 y 19 (verde), EpCAM (rojo) y CD45 (violeta).

La FIG. 9 es una gráfica de bigotes de diámetros citoplasmáticos de glóbulos blancos (GB), células tumorales circulantes (CTC) y células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML).

5 La FIG. 10 es una comparación de la presencia de células tumorales circulantes (CTC) capturadas mediante CellSearch[®] y de CTC patológicamente-definibles aisladas por microfiltración con CellSieve[™] y de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML) aisladas al mismo tiempo por microfiltración con CellSieve[™].

10 La FIG. 11 es una gráfica del número de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML) encontradas en la circulación de pacientes con cáncer de mama, de próstata y pancreático en diferentes estadios de cáncer.

15 La FIG. 12 es una gráfica del número de células CAML y CTC encontradas en las muestras de pacientes con cáncer de próstata.

La FIG. 13 es una gráfica del número de células CAML y CTC encontradas en las muestras de pacientes con cáncer de páncreas.

20 La FIG. 14 es una gráfica del número de células CAML y CTC encontradas en las muestras de pacientes con cáncer de mama.

25 La FIG. 15 es una gráfica del número de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML) encontradas en la circulación de pacientes con cáncer de mama, de próstata, pancreático y de pulmón en diferentes estadios de cáncer.

Las FIGS. 16A y 16B son gráficas del número de células CAML y CTC encontradas en las muestras de pacientes con cáncer de próstata, respectivamente.

30 Las FIGS. 17A y 17B son gráficas del número de células CAML y CTC encontradas en las muestras de pacientes con cáncer de páncreas, respectivamente.

Las FIGS. 18A y 18B son gráficas del número de células CAML y CTC encontradas en las muestras de pacientes con cáncer de mama, respectivamente.

35 La FIG. 19 es una gráfica del número de células CAML y CTC encontradas en los pacientes con cáncer de pulmón.

40 La FIG. 20 es una gráfica del número de células CAML y CTC encontradas en los pacientes con cáncer colorrectal.

La FIG. 21 es un ejemplo de una CAML de un paciente con cáncer pancreático, con tinción también para PDX-1.

La FIG. 22 es un ejemplo de una CAML de un paciente con cáncer de próstata, con tinción también para PSMA.

45 Las FIGS. 23A-B muestran tinción con H & E de células CAML. Se muestran dos células CAML representativas (A) y (B) al microscopio óptico. La flecha negra es una vacuola redonda localizada dentro del citoplasma de la CAML. Las flechas blancas muestran los núcleos individuales y la subsiguiente naturaleza polinuclear de las CAML.

50 La FIG. 24A es una gráfica del número de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML) en pacientes con cáncer de mama sin tratamiento y con tratamiento hormonal o quimioterapia y radioterapia.

55 La FIG. 24B es una gráfica del número de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML) en pacientes con cáncer pancreático sin tratamiento, y con quimioterapia y radioterapia.

La FIG. 25A muestra una CTC asociado a una CAML.

La FIG. 25B muestra una CTC unida a una CAML.

60 La FIG. 25C muestra una CTC unida a una CAML con fusión de membrana.

La FIG. 25D muestra una CAML que absorbió una célula CQ positiva.

65 La FIG. 26A muestra ejemplos de CAML de pacientes con cáncer de mama con tinción para CD11c, CD14 y TIE-2.

La FIG. 26B muestra ejemplos de CAML de pacientes con cáncer pancreático con tinción para CD11c, CD14 y TIE-2.

5 La FIG. La Fig. 26C muestra ejemplos de CAML de pacientes con cáncer de mama con tinción para CD11c, CD14 y CD146.

La FIG. 26D muestra ejemplos de CAML de pacientes con cáncer pancreático con tinción para CD11c, CD14 y CD146.

10 Descripción detallada

Las cuestiones definidas en la descripción, tales como una construcción detallada y elementos, no son más que las proporcionadas para ayudar a comprender globalmente a invención. Por consiguiente, los expertos habituales en la técnica reconocerán que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones de las realizaciones descritas en el presente documento.

20 El cáncer es la enfermedad más temida en el mundo, que afecta a todas las poblaciones y etnias en todos los países. Solo en los Estados Unidos, hay más de 10 millones de pacientes con cáncer, con 1,5 millones de nuevos casos de cáncer y casi 0,6 millones de muertes al año. Se estima que la muerte por cáncer en todo el mundo es de unos 8 millones de personal al año, de las cuales 3 millones de muertes se producen en países desarrollados donde los pacientes disponen de tratamiento.

25 Idealmente, existe un biomarcador que puede (i) proporcionar detección precoz de todos los carcinomas, especialmente para grupos de riesgo, tales como fumadores, para el cáncer de pulmón, (ii) confirmar otros indicios de cáncer, tales como PSA alto, para el cáncer de próstata, y/o (iii) proporcionar una detección precoz de la recurrencia del cáncer.

30 Los oncólogos necesitan saber cómo mejorar el tratamiento de los pacientes con cáncer recién diagnosticados. El patrón de ensayo actual es una biopsia de tejido, que se utiliza para determinar el subtipo de cáncer, ya que los fármacos terapéuticos son frecuentemente eficaces solo para subtipos específicos. El método de la biopsia varía según la ubicación, pero es invasivo y puede ser arriesgado.

35 Para controlar el tratamiento, los oncólogos necesitan saber cómo de bien está funcionando el fármaco en el paciente, si la dosis debe ajustarse y si la enfermedad se está propagando o remitiendo. Los métodos habituales para responder a estas cuestiones son la tomografía computarizada (TC) de rayos X y las imágenes por resonancia magnética (IRM), ambas costosas. Además, estos métodos no pueden proporcionar la información necesaria hasta que el tamaño del tumor haya cambiado de forma perceptible.

40 El 90 % de los pacientes con cáncer mueren por metástasis, no por el tumor primario. El proceso metastásico implica células tumorales que se separan de los carcinomas primarios (tumores sólidos de células epiteliales) y entran en la corriente sanguínea. Estas células cancerosas separadas se conocen como células tumorales circulantes (CTC). Las CTC tienen el potencial de ser útiles como una herramienta para determinar la terapia, controlar el tratamiento, determinar la recurrencia y proporcionar información pronóstica de supervivencia. Sin embargo, las CTC no pueden recogerse sistemáticamente de la sangre, incluso en cánceres de estadios III y IV.

45 En esta divulgación, se presenta un tipo de célula que se encuentra sistemáticamente en la sangre de pacientes con carcinoma en estadios I-IV. Estas células son células similares a macrófagos que contienen los mismos marcadores tumorales que el tumor primario y en este documento reciben el nombre de células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML).

50 Las CTC y las CAML se pueden encontrar a partir de la misma muestra del paciente al mismo tiempo mediante métodos de exclusión por tamaño, tales como mediante métodos de microfiltración. Los microfiltros pueden formarse con poros lo suficientemente grandes como para permitir que todos los glóbulos rojos y la mayoría de los glóbulos blancos atraviesen y retengan células más grandes tales como las CTC y CAML. También han implementado métodos de exclusión por tamaño mediante microplacas microfluídicas.

55 Las CAML tienen muchas utilidades clínicas cuando se utilizan en solitario. Además, las CAML pueden combinarse con otros marcadores tales como CTC, ADN y proteínas libres en sangre para mejorar aún más la sensibilidad y la especificidad de un diagnóstico. Esto es especialmente cierto para las CAMLS y las CTC porque estas células pueden aislarse e identificarse al mismo tiempo.

Células tumorales circulantes

65 Las CTC expresan diversas citoqueratinas (CQ). Las CQ 8, 18 y 19 son las que más se utilizan habitualmente en el diagnóstico, pero el estudio no debe limitarse a estas tres. La superficie de las CTC de tumores sólidos normalmente

expresa moléculas de adhesión a células epiteliales (EpCAM). Sin embargo, esta expresión no es uniforme ni consistente. Las CTC no deben expresar ningún CD45, porque este es un marcador de glóbulos blancos. En ensayos para identificar células asociadas a tumores, tales como CTC y CAML, basta con utilizar anticuerpos contra la CQ 8, 18 o 19 o anticuerpos contra CD45 o DAPI. Combinando la presencia de tinción con morfología, pueden identificarse CTC patológicamente definibles, CTC apoptóticas y CAML.

Las FIGS. 1A-1D muestran cuatro ejemplos de CTC patológicamente definibles. Una CTC patológicamente definible se identifica por las siguientes características:

- Tiene un núcleo "de tipo canceroso" teñido con DAPI. La excepción es cuando la célula está en división; el núcleo está condensado.
- Expresa al menos las CQ 8, 18 y 19. Las citoqueratinas tienen un patrón filamentoso.
- Carece de expresión CD45. Para evitar la pérdida de células CD45 de baja expresión, durante la adquisición de imágenes se utiliza una exposición prolongada.

Una CTC patológicamente definible, como se usa en la presente invención, incluye por tanto las CTC que tienen una, dos o tres de las siguientes características: (a) un núcleo de tipo canceroso; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde las citoqueratinas tienen un patrón filamentoso; y (c) un fenotipo CD45 negativo.

La FIG. 1A muestra una CTC de cáncer de próstata patológicamente definible que expresa EpCAM bien definida y la FIG. 1B muestra una CTC de cáncer de próstata patológicamente definible que expresa muy poca o ninguna EpCAM. La FIG. 1C muestra una CTC de cáncer de mama patológicamente definible que expresa EpCAM bien definida y la FIG. 1D muestra una CTC de cáncer de mama patológicamente definible que expresa muy poca o ninguna EpCAM.

Las FIGS. 2A-2D muestran ejemplos de CTC apoptóticas. Una CTC apoptótica se identifica por las siguientes características:

- Tiene un núcleo canceroso.
- Expresa al menos las CQ 8, 18 y 19; las citoqueratinas no tienen un patrón filamentoso, sino que aparecen fragmentadas en forma de manchas.
- No expresa CD45.

Una CTC apoptótica como se usa en la presente invención incluye, por tanto, las CTC que tienen una, dos o tres de las siguientes características: (a) un núcleo de tipo canceroso; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde la citoqueratina está fragmentada en forma de manchas; y (c) un fenotipo CD45 negativo (a) núcleo de tipo canceroso; (b) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, y en donde la citoqueratina está fragmentada en forma de manchas; y (c) fenotipo CD45 negativo.

Las FIGS. 2A y 2B muestran CTC apoptóticas de cáncer de mama que expresan muy poca o ninguna EpCAM en los estadios tempranos y centrales de la apoptosis, respectivamente. Las FIGS. 2C y 2D muestran CTC de cáncer de próstata en el estadio central de la apoptosis que expresa mucha y poca EpCAM, respectivamente.

Células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML)

En las mismas muestras de pacientes, se identificó otro tipo de célula. Este tipo de célula recibió el nombre de CAML. Las CAML tienen las siguientes características:

- Las CAML tienen un núcleo grande, atípico; pudiendo encontrarse en las CAML múltiples núcleos individuales, aunque son habituales nucleolos alargados fusionados de aproximadamente 14 µm a aproximadamente 65 µm.
- Las CAML pueden expresar al menos la CQ (citoqueratina) 8, 18 o 19, y la CQ está difusa o asociada a vacuolas y/o a material ingerido. La CQ es casi uniforme en toda la célula.
- Las CAML son la mayor parte del tiempo CD45 positivas.
- Las CAML son grandes, de un tamaño de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros.
- Las CAML adoptan cinco formas morfológicas distintas (forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga o amorfa).

El análisis adicional de las CAML muestra que también tienen las siguientes características:

- Si la CAML expresa EpCAM, la EpCAM se difunde o se asocia a vacuolas y/o a material ingerido, y son casi uniformes en toda la célula, pero no todas las CAML expresan EpCAM, porque algunos tumores expresan muy poca o ninguna EpCAM.
- Las CAML expresan marcadores asociados a los marcadores del origen tumoral; por ejemplo, si el origen del tumor es de cáncer de próstata y expresa PSMA, entonces la CAML de este paciente también expresa PSMA.

Otro ejemplo, si el origen del tumor primario es de cáncer pancreático y expresa PDX-1, entonces la CAML de este paciente también expresa PDX-1.

- Las CAML expresan marcadores monocíticos (por ejemplo, CD11c, CD 14) y marcadores endoteliales (por ejemplo, CD146, CD202b, CD31). Las CAML también tienen la capacidad de unirse fragmentos de Fc.

Las CAML de la presente invención incluyen, por lo tanto, las CAML que tienen las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. Las CAML de la presente invención también incluyen las CAML que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las siguientes características adicionales: (d) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, en donde la citoqueratina se difunde, o se asocia a vacuolas y/o a material ingerido; (e) fenotipo CD45 positivo (f) expresión de EpCAM difusa con distribución casi uniforme; (g) expresión de uno o más marcadores de un tumor primario; (h) expresión de marcadores monocíticos CD11C y CD14; e (i) expresión de marcadores endoteliales CD146, CD202b y CD31. En un aspecto particular, las CAML de la presente invención tienen cada una de las características (f) - (i) adicionales.

Las imágenes de las CAML de un paciente con cáncer de mama se muestran en las FIGS. 3-5 y en la FIG. 6 se muestran las de las CAML de un paciente con cáncer de próstata. La FIG. 7 contiene un collage de células CAML que muestra las cinco diferentes morfologías de las CAML y la variación de señal de muestras distintas de pacientes con cáncer de próstata, mama y pancreático: (7 A) pancreático, (7B) mama, (7C) mama, (7D) mama (7E) próstata (7F) pancreático, (7G) pancreático, (7H) próstata y (7I) próstata. Son ejemplos de variantes de morfología los siguientes: amorfa (7 A), oblonga (7B y 7G), huso (3, 5, 6, 7C, 7F y 7I), redonda (7D) y renacuajo (4, 7E y 7H). Las diferencias de color se producen a partir de los diversos grados de expresión de proteínas a partir de la reacción de los anticuerpos contra EpCAM, citoqueratina y CD45. La expresión de marcadores de cada una de las CAML en las Figs. 7A-I se muestran en detalle en las Figs. 8A-I.

La FIG. 9 muestra la gráfica de bigotes de los diámetros citoplasmáticos de glóbulos blancos (GB), CTC y CAML. La mediana de las diferencias de tamaño e intervalos entre GB, CTC y CAML capturados en el microfiltro de cáncer de próstata, mama y pancreático (n = 25 glóbulos blancos, n = 25 CAML y n = 25 CTC). Los diámetros se midieron utilizando la distancia entre los dos puntos más alejados de la célula utilizando el programa informático de medición Zen 2011. El valor medio de los glóbulos blancos fue de 12,4 μm , el de las CTC fue de 18,8 μm y el de las CAML de 43.5 μm .

Métodos de diagnóstico de uso de las CAML y las CTC

Como se sugirió anteriormente, las características exclusivas de las CAML y las CTC descritas en este documento las hacen muy adecuados para su uso en metodología clínica que incluyen métodos de exploración y diagnóstico de enfermedades tales como cáncer, y en el control del avance de la enfermedad.

La invención se refiere por tanto, en una primera realización, a métodos de exploración de cáncer en un sujeto, que comprenden detectar células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML) en una muestra de sangre de un sujeto, en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En aspectos particulares, cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, el sujeto se identifica como que posiblemente tiene un carcinoma o un tumor sólido. En otros aspectos, cuando en la muestra biológica se detectan las CAML, el sujeto se identifica como que tiene un carcinoma o un tumor sólido. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta realización también incluyen detectar células tumorales circulantes (CTC) en la muestra de sangre. En aspectos particulares de esta primera realización, el sujeto es un sujeto que se sospecha que tiene cáncer.

En una segunda realización, la invención se refiere a métodos para diagnosticar cáncer en un sujeto, que comprenden detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, al sujeto se le diagnostica cáncer, y en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta realización también incluyen detectar células tumorales circulantes (CTC) en la muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML y las CTC, al sujeto se le diagnostica cáncer.

En una tercera realización, la invención se refiere a métodos para detectar la recurrencia de cáncer en un sujeto, que comprenden detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto previamente tratado por cáncer, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, se detecta recurrencia de cáncer, y en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de

aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta realización también incluyen detectar las CTC en la muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML y las CTC, se detecta recurrencia de cáncer.

En una cuarta realización, la invención se refiere a métodos para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto, que comprenden detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto diagnosticado con cáncer, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, se confirma un diagnóstico de cáncer en el sujeto, y en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 μm ; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa. En determinados aspectos, los métodos incluidos en esta realización también incluyen detectar las CTC en la muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML y las CTC, se confirma un diagnóstico de cáncer en el sujeto. En aspectos particulares, el diagnóstico inicial de cáncer es mediante mamografía, prueba de PSA o presencia de CA125. En un aspecto particular, se sospecha que el sujeto tiene cáncer.

En cada una de estas realizaciones, las CAML se detectan utilizando medios apropiados que incluyen, pero no se limitan a, una o más de metodología de exclusión por tamaño, lisis de glóbulos rojos, FICOLL, un microplaca microfluídica y citometría de flujo, o una combinación de los mismos. Cuando se utiliza la metodología de exclusión por tamaño, esta puede comprender el uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen poros de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de un tamaño de aproximadamente 7-8 micrómetros son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme.

Como alternativa, las CAML pueden detectarse utilizando un microplaca microfluídica que se basa en medios que incluyen, sin limitación, separación física en función del tamaño, separación hidrodinámica en función del tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes o eliminación de células pequeñas en función del tamaño.

En cada una de estas realizaciones, las CTC también pueden detectarse junto con las CAML. Dicha detección puede ser detección simultánea o secuencial, y puede utilizar los mismos medios o diferentes medios. Por ejemplo, puede utilizarse detección simultánea utilizando un microfiltro que tiene un tamaño de poro que selecciona para ambos tipos de células. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen poros de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme.

Los métodos desvelados en el presente documento se pueden poner en práctica utilizando cualquier muestra biológica que se sospeche que contenga células CTC y/o CAML. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, una o más seleccionadas del grupo que consiste en ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. Los métodos de la invención se ponen en práctica utilizando una muestra de sangre. En un aspecto preferido, la muestra es sangre periférica. En otros aspectos, la sangre es sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior o sangre de la vena yugular.

El experto en la materia apreciará que los métodos proporcionados en estas realizaciones no están limitados a formas o a tipos de cánceres particulares, y que pueden ponerse en práctica junto con una amplia variedad de cánceres. Como ejemplos de cánceres se incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos, cáncer de estadio I, cáncer de estadio II, cáncer de estadio III, cáncer de estadio IV, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer colorrectal.

Control de la eficacia del tratamiento utilizando las CAML y las CTC

Como se sugirió anteriormente, las características exclusivas de las CAML y CTC descritas en la presente memoria también hacen que sean muy adecuadas para su uso controlando la eficacia de tratamientos de enfermedades.

La presente invención se refiere por tanto, en una quinta realización, a métodos para controlar la eficacia de un tratamiento del cáncer, que comprenden:

(a) determinar el número de CAML en una muestra de sangre de un sujeto antes del tratamiento del cáncer, y

(b) comparar el número de CAML determinado en (a) con un número de CAML determinado de una muestra de sangre similar del mismo sujeto en uno o más puntos temporales después del tratamiento.

5 Dadas las aptitudes de pronóstico asociadas a las CTC, los métodos de esta realización también pueden incluir las siguientes etapas adicionales:

(c) determinar el número de CTC en la muestra de sangre de (a), y

10 (d) comparar el número de CTC determinado en (c) con un número de CTC determinado a partir de la muestra de sangre de (b), y en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características: (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm; (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.

15 El experto en la materia entenderá que un cambio en el número de CAML y / o CTC será una indicación de la eficacia del tratamiento, en donde el cambio puede ser un aumento o una disminución en el número de CAML y/o CTC.

20 El tratamiento del cáncer particular no está limitado por este método, pero generalmente comprenderá quimioterapia y/o radioterapia.

25 Estos métodos pueden ponerse en práctica determinando el número de CAML utilizando uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, lisis de glóbulos rojos, FICOLL, un microplaca microfluídica y citometría de flujo, o una combinación de los mismos. Cuando se usa la metodología de exclusión por tamaño, esta puede comprender el uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen poros de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme. En un aspecto particular, el número de CAML se determina utilizando un microplaca microfluídica basada en medios que incluyen, pero sin limitación: separación física en función del tamaño, separación hidrodinámica en función del tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes, o eliminación de células pequeñas en función del tamaño. En otro aspecto particular las CAML se detectan utilizando un ensayo de microfiltración a baja presión CellSieve™.

35 Cuando se controlan ambos tipos de células, los números de las CAML y de las CTC se pueden determinar de manera secuencial o simultánea utilizando los mismos medios o medios diferentes. Por ejemplo, puede utilizarse detección simultánea utilizando un microfiltro con un tamaño de poro que seleccione ambos tipos de células. Los microfiltros adecuados pueden tener una variedad de tamaños y formas de poro. Los microfiltros que tienen poros de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son aceptables e incluyen formas de poro redondas y rectangulares. Los microfiltros que tienen poros redondos de aproximadamente 7-8 micrómetros de tamaño son especialmente óptimos cuando se utilizan microfiltros poliméricos. En un aspecto preferido, el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme.

45 Los métodos desvelados en el presente documento pueden ponerse en práctica utilizando cualquier muestra biológica que se sospeche que contenga células CTC y/o CAML. Las muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, una o más seleccionadas del grupo que consiste en ganglios linfáticos, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. Los métodos de la invención se ponen en práctica utilizando una muestra de sangre. En un aspecto preferido, la muestra biológica es sangre periférica. En otros aspectos, la sangre es sangre vena antecubital, sangre de vena cava inferior o sangre de vena yugular.

50 El experto en la técnica apreciará que los métodos proporcionados en esta realización no están limitados a formas o a tipos de cánceres particulares y que pueden ponerse en práctica junto con una amplia variedad de cánceres. Como ejemplos de cánceres se incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos, cáncer de estadio I, cáncer de estadio II, cáncer de estadio III, cáncer de estadio IV, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer colorrectal.

Análisis de los resultados biológicos y clínicos de las CAML

60 Los macrófagos asociados a tumores (MAT) son macrófagos diferenciados y especializados que se encuentran en la mayoría de los tumores y que pueden utilizarse como indicadores de pronóstico de invasividad o supresión tumoral. Los MAT, acumulados en el estroma de monocitos circulantes, son necesarios para la intravasación, migración, extravasación y angiogénesis de las células tumorales. Los tumores atraen a monocitos a través de quimioatrayentes (MCP-1, CCL-2). A su vez, los MAT secretan citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (por ejemplo, MMP-1, CXCL12) que estimulan las células tumorales con el potencial de convertirse en células tumorales

circulantes (CTC). Los MAT y las células tumorales migran después a través del sistema linfático, o se intravasas a través de las barreras capilares intratumorales en la circulación periférica.

La evidencia patológica que detalla las etapas de diseminación iniciales de las CTC a través de una cascada metastásica sigue sin ser concluyente. Típicamente, una cascada de diseminación de células cancerosas requiere 3 etapas: separación de CTC del tumor, alejamiento de la masa original y migración al sistema circulatorio. Aunque varias teorías explican aspectos selectos de esta cascada (células progenitoras endoteliales, células madre mesenquimáticas cancerosas, células cancerosas híbridas, etc.), ninguna explica completamente los tres procesos. Recientemente, los estudios *in vivo* han demostrado que las células monocíticas circulantes están intrincadamente implicadas en la invasividad, motilidad y potencial metastásico de las células tumorales. Se han documentado interacciones entre células del linaje mielóide y células tumorales en pacientes y se han modelado en ratones, lo que sugiere una ruta para la intravasación, aunque el mecanismo para la etapa de diseminación final aún no se ha establecido.

En el presente documento se describe la existencia de CAML, una célula circulante gigante muy diferenciada (de tipo macrófago) aislada de la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, próstata y pancreático, que en teoría podría ser un MAT diseminado (MATD). Este tipo de célula se aisló utilizando el microfiltro CellSieve™ (Creatv MicroTech) con dimensiones de poro de precisión y distribución uniforme. La microfiltración con CellSieve™ de 7,5 ml de sangre periférica completa se realiza a baja presión sin dañar a las células, lo que permite la identificación histológica de la morfología celular. Esta célula gigante se define como una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer" (CAML, *Cancer Associated Macrophage-Like*), ya que exhibe una expresión de CD14 +, vacuolas de material fagocitado y se encuentra exclusivamente en pacientes con cáncer (figuras 3-7 y tabla 1). Se propone que esta población celular, que no se encuentra en individuos sanos, podría servir como un contundente biomarcador celular de una respuesta inmunitaria innata previamente indefinida a la agresividad del cáncer, y para controlar respuestas inducidas por la quimioterapia y la radioterapia. Las observaciones de estas células gigantes que interactúan con las CTC en circulación confirman la evidencia de que la respuesta inmunitaria innata del paciente tiene un efecto observable en la migración de las CTC. Los marcadores TIE-2 positivos expresados por estos macrófagos sugieren un papel de CAML como iniciadores celulares de la neovascularización dentro de las metástasis tumorales. Se han descubierto evidencia de apoyo *in vivo* que CAML puede jugar un papel asociado en la migración de CTC en circulación. y controlar las respuestas inducidas por la quimioterapia y la radioterapia. Las observaciones de estas células gigantes que interactúan con los CTC en circulación confirman la evidencia de que la respuesta inmune innata del paciente tiene un efecto observable en la migración de los CTC. Los marcadores TIE-2 positivos expresados por estos macrófagos sugieren un papel de CAML como iniciadores celulares de la neovascularización dentro de las metástasis tumorales. Se han descubierto pruebas de confirmación *in vivo* de las CAML puede jugar un papel asociado a la migración de las CTC en circulación.

Los macrófagos fusionados gigantes son una célula poco conocida que se encuentra en una multitud de tejidos. Son híbridos de células multinucleadas que se originan de linaje mielóide implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen fagocitosis de tejido extraño y necrótico, reabsorción e inflamación tisular. Se descubre que las CAML son células gigantes que presentan núcleos agrandados, CD45+ y muestran características de tinción citoplasmática difusa de células epiteliales: citoqueratina 8, 18, 19 y moléculas de adhesión a células epiteliales (EpCAM) (Figuras 3-8). En las CAML se pueden encontrar múltiples núcleos individuales, aunque son habituales los núcleos fusionados grandes (de 14-64 µm de diámetro) (Figuras 3-8). El citoplasma de CAML, definido por un borde de citoqueratina, tiene una longitud que varía de 21-300 µm y en el filtro se encuentra con cinco fenotipos morfológicos distintos (forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga o amorfa) (Figuras 3-8).

Aunque la identificación de estas células es sencilla debido a su tamaño extremo, gran perfil nuclear y firma citoplasmática, tienen fenotipos muy heterogéneos. La expresión de citoqueratina, EpCAM y CD45 varía desde ausencia de expresión a expresión muy intensa (Figuras 8A-8H). Esta heterogeneidad se muestra también en las cinco estructuras celulares, en los intervalos de tamaño y en los diversos perfiles nucleares (Figuras 8A-8H). La alta heterogeneidad de expresión de los marcadores implica que las CAML representan estadios diferentes a lo largo de las rutas de diferenciación o que son el producto de una fagocitosis celular inespecífica con diferentes tipos de células. Esto no es sorprendente ya que los macrófagos son un tipo de células muy plásticas capaces de diferenciarse en numerosos fenotipos celulares.

El reconociendo de que las CAML podrían servir como un indicador de pronóstico independiente de la progresión del cáncer, similar a la enumeración de CTC, se comparó el número de CAML y CTC utilizando el ensayo de microfiltración a baja presión CellSieve™ (Creatv MicroTech, Inc) y la prueba de células tumorales circulantes con CellSearch® (Veridex, LLC). Ha sido un reto aislar las CTC debido a su rareza y aparición limitada (10-50 %) en pacientes con cáncer con enfermedad metastásica. La enumeración y el fenotipado del MAT podrían tener utilidad pronóstica, pero actualmente carece de pruebas secuenciales, rastreando la progresión primaria a metastásica, ya que esto requeriría numerosas biopsias invasivas de tumores. La enumeración de las CTC enriquecidas mediante los sistemas CellSearch® y CellSieve™ se compararon directamente con la enumeración de las CAML aisladas mediante CellSieve™ utilizando sangre de 29 pacientes con cáncer (Figura 10). Mientras que CellSearch® utiliza anticuerpos EpCAM para enriquecer las CTC, CellSieve™ utiliza exclusión por tamaño. Ambas tecnologías

identifican fenotípicamente las CTC utilizando un panel de anticuerpos anti citoqueratina 8, 18 y 19, tinción nuclear DAPI y ausencia de anti CD45. Empleando un recuento de CTC de ≥ 1 , la sensibilidad del sistema CellSieve™ fue del 72 % [21 de 29 pacientes; mama = 15/21 (71 %), próstata = 6/8 (75 %)], mientras que la del sistema CellSearch® fue del 58% [15 de 29 pacientes; mama = 9/21 (43 %), próstata = 6/8 (75 %)]. La captura de CAML fue positiva en el 97 % (28 de 29) de las muestras analizadas (Figura 10). Curiosamente, la única muestra CAML negativa fue un paciente con cáncer de mama tratado con bisfosfonatos, una clase de fármacos que inhiben la formación de osteoclastos, una célula mielóide gigante del hueso compuesta por células fusionadas. Por lo tanto, como la especificidad de las CAML es del 100 % para las muestras analizadas, la presencia de CAML puede proporcionar un método para pruebas secuenciales no invasivas para su uso como un indicador pronóstico de enfermedad metastásica para una amplia gama de pacientes con cáncer.

Para evaluar la sensibilidad y especificidad de las CAML para su aplicabilidad como una indicación pronóstica de enfermedad metastásica, se examinaron muestras de pacientes con cáncer en estadio temprano a tardío y de sujetos sanos. Las muestras de 76 pacientes se procesaron en microfiltros CellSieve™. La distribución de los estadios incluyó, estadio I (n = 8), estadio II (n = 9), estadio III (n = 13), estadio IV (n = 24), estadio desconocido (n = 22) en tres tipos de cáncer: mama (n = 29), pancreático (n = 27) y próstata (n = 20) (Tabla SI). Se incluyeron pacientes recién diagnosticados y no tratados (n = 36), así como pacientes sometidos a terapias no quirúrgicas (n = 40) (Tabla 1). El estudio incluyó sujetos sanos (n = 30), incluidos dos con enfermedad benigna, un fibroadenoma y un carcinoma de células basales. En este grupo de control no se encontraron CAML (Tabla 1). Se encontraron CAML en el 97 % (36 de 37) de los pacientes con cáncer en estadio III/IV, en el 77 % (13 de 17) en estadio I/II y en el 93 % (71 de 76) de todos los pacientes independientemente del tipo de cáncer (Figura 11). Se encontraron CAML en el 85 % (próstata) (figura 12), 93 % (pancreático) (figura 13) y 97 % (mama) (figura 14) de los pacientes. En muestras de cáncer de próstata las CAML fueron ligeramente inferiores en número, posiblemente debido al hecho de que 6 de 20 pacientes con cáncer de próstata estaban en estadio I. Aunque el análisis de CTC en microfiltros proporcionó una positividad global de 54 % en todos los pacientes evaluados, las CAML proporcionaron 93 % de sensibilidad en toda la misma cohorte (Figuras 12-14 y Tabla 1). Aunque se deben evaluar más estudios de pacientes con diversas dolencias, estos hallazgos demuestran que la presencia de CMAL podría proporcionar una evaluación contundente y ampliamente aplicable del estado del cáncer.

Tabla 1. Resumen de datos de sujetos sanos, de pacientes con CAML y de pacientes con CTC separados por estadio, tipo de cáncer y tipo de terapia. Las CTC se encuentran en un pequeño porcentaje de pacientes en estadio I y II, mientras que las CAML se encuentran en muchos pacientes en estadio I-IV. Los números de CTC entre los pacientes son muy variables con una desviación estándar (DE) de > 300 %. Las CAML tienen una DE mucho más baja, 110 %, y cuyos números parecen correlacionarse con el estadio y el tratamiento.

Sujeto	Nº de pacientes	CAML positivas (%)	Media CAML±DE	Mediana CAML	Intervalo CAML	CTC positivas (%)	Media CTC±DE	Mediana CTC	Intervalo CTC
Normales, Sanos	28	0	0±0	0	0-0	0	0±0	0	0-0
Sin neoplasia	2	0	0±0	0	0-0	0	0±0	0	0-0
Estadio I	8	63	10,8±20,9	3	0-61	38	4,6±11,9	0	0-34
Estadio II	9	89	8,0±9,6	3	0-28	22	1,6±3,1	0	0-28
Estadio III	13	100	15,8±12,5	9,5	2-43	62	13,3±30,2	3,5	0-108
Estadio IV	24	96	21,3±23,8	8	0-82	75	57,2±172,4	3	0-682
Desconocido	22	95	6,2±4,5	5,5	0-20	45	4,8±17,5	0	
Tipo de Cáncer	76	93	13,4±17,4	6	0-82	54	22,5±100,3	1	0-682
Mama (IBC)	14	93	24,9±24,0	23,5	0-82	71	11,4±28,1	3	0-108
Mama (IDC)	8	100	15,9±16,1	10,5	1-41	100	9,0±17,0	3,5	Jan-51
Mama (desconocido)	7	100	15,0±14,2	8	2-32	71	106,3±254,2	5	0-682
Próstata	20	85	9,0±14,3	3	0-64	35	3,3±7,9	0	0-34
Pancreático	27	93	9,5±14,5	5	0-72	41	24,8±106,5	0	0-541
Tipo de terapia	76								
Sin tratamiento	36	86	4,4±4,0	3,5	0-19	42	20,2±92,0	0	0-541
Hormonoterapia	13	92	11,8±16,7	8	0-64	69	6,2±9,6	3	0-34
Quimioterapia	24	100	26,2±21,9	27	2-82	58	8,9±22,6	2	0-108
Desconocida	3	100	26,3±11,6	25	13-34	100	229,3±392,0	4	2-682

- 5 A medida que se recogieron más muestras, se obtuvieron datos adicionales de CAML. La figura 15 presenta recuentos de CAML de 122 pacientes con información sobre estadificación para cáncer de mama, pancreático, de próstata y de pulmón no microcítico (NSCLC, *non-small cell lung cancer*). Para el estadio I, un paciente con cáncer pancreático y seis pacientes con cáncer de próstata, no tenían ninguna CAML. Para el estadio II, un paciente con
- 10 cáncer pancreático y un paciente con cáncer de próstata no tenían ninguna CAML. Para el estadio IV, un paciente con cáncer de mama, un paciente con cáncer de pulmón y tres pacientes con cáncer pancreático no tenían ninguna CAML.
- 15 Las figuras 16A y 16B presentan números de CAML y CTC de datos de pacientes con cáncer de próstata obtenidos hasta la fecha, respectivamente. No se tenía información de estadificación de ningún paciente. El porcentaje de pacientes con cáncer de próstata con CAML fue del 81 % (30/37) (Figura 16A), donde se sabía que 13 eran de estadio Etapa I. El porcentaje de pacientes con cáncer de próstata con CTC patológicamente definibles fue del 32 % (12/37) (Figura 16B).
- 20 Las figuras 17A y 17B presentan números de CAML y CTC de datos de pacientes con cáncer pancreático obtenidos hasta la fecha, respectivamente. No se tenía información de estadificación de ningún paciente. El porcentaje de pacientes con cáncer pancreático con CAML fue del 93 % (71/76) (Figura 17A), donde se sabía que 11 eran de estadio I. Dos muestras tenían CTC patológicamente definibles mayores de 80. Las muestras n.º 13 y 53 tenían 83 y 541 CTC patológicamente definibles, respectivamente. El porcentaje de pacientes con cáncer de próstata con CTC patológicamente definibles fue del 23 % (18/76) (Figura 17B).
- 25 Las figuras 18A y 18B presentan los números de CAML y CTC de datos de pacientes con cáncer de mama obtenidos hasta la fecha, respectivamente. No se tenía información de estadificación de ningún paciente. El porcentaje de pacientes con cáncer de mama con CAML fue del 97 % (36/37) (Figura 18A), donde se sabía que solo uno era de estadio I. Un paciente de estadio IV no tenía ningún CAML porque estaba tomando los bisfosfonatos. Cuatro muestras tenían CTC patológicamente definibles mayores de 110. Las muestras n.º 17, 27 y 30 tenían 978, 682 y 707 CTC patológicamente definibles, respectivamente. El porcentaje de pacientes con cáncer de mama con CTC patológicamente definibles fue del 84 % (31/37) (Figura 18B).
- 30 La figura 19 presenta números de CAML y CTC de datos de pacientes con NSCLC obtenidos hasta la fecha. No se tenía información de estadificación de ningún paciente. El porcentaje de pacientes con NSCLC con CAML fue del 88 % (7/8). El porcentaje de pacientes con NSCLC con CTC patológicamente definibles fue del 38 % (3/8).
- 35 La FIG. 20 presenta números de CAML y CTC de datos de pacientes con cáncer colorrectal obtenidos hasta la fecha. Todos los pacientes estaban en estadio IV. El porcentaje de pacientes con cáncer colorrectal fue del 100 % (4/4) para esta muestra de pequeño tamaño. El porcentaje de pacientes con cáncer colorrectal con CTC patológicamente definibles fue del 25 % (1/4).
- 40 En todos estos datos, las CAML se encontraron en un número mucho mayor de pacientes que las CTC.
- 45 Aunque se deben evaluar más estudios de pacientes con diversas dolencias, estos hallazgos demuestran que la presencia de CMAL ofrece una evaluación contundente y ampliamente aplicable del estado del cáncer para carcinomas.
- 50 Se propone que CAML representa un MAT especializado que se inicia en el sitio del tumor y se disemina en la circulación. Esto sería coherente con publicaciones previas que caracterizan a los MAT en el sitio del tumor primario, así como con las observaciones de que las CAML parecen CD14+, tienen tejido epitelial engullido y aparecen exclusivamente en pacientes con cáncer. Para entender el origen de las CAML, se examinó si surgían de monocitos circulantes o directamente de los MATD. Como los MAT y los monocitos se presentarían con marcadores proteicos similares, se evaluó la presencia de marcadores engullidos en órganos específicos, homosecuencia 1 pancreática y duodenal (PDX-1, *Pancreatic Duodenal Homeobox-1*) para pacientes con cáncer pancreático o antígeno de membrana específico de próstata (PSMA, *Prostate-Specific Membrane Antigen*) para pacientes con cancer de próstata. PDX-1 es un marcador de diferenciación y desarrollo que se encuentra en los órganos endocrinos de adultos, concretamente en las células pancreáticas. El PSMA es una glucoproteína de membrana, que se expresa
- 55 en gran cantidad en células de próstata. Después de aislar y enumerar las CAML, se volvieron a teñir las muestras de CAML previamente identificadas con PSMA o PDX-1. Se observó una reacción positiva a PDX-1 en todas las CAML de muestras pancreáticas (Figura 21), mientras que se encontró PSMA en todas las CAML de muestras de próstata (Figura 22). Aunque es posible que la fusión celular o la ingestión de desechos se produzca fuera del sitio del tumor, la alta concentración de marcadores, junto con la escasez de restos de tumores en la circulación hacen que esto sea poco probable. En cambio, este conjunto de tinciones de biomarcadores se interpretó como evidencia
- 60 de que las CAML son un subtipo de MATD, y que la tinción se produjo a partir de restos necróticos fagocitados, o de células neoplásicas engullidas del sitio del tumor.

Tabla 2. Marcadores de células utilizados para analizar las CAML. (+) Positivo en la mayoría de los tipos de células; (-) negativo en la mayoría de los tipos de células; (+/-) poblaciones de células heterogéneas para este marcador y pueden ser positivas o negativas; (*) encontrado solo en células de pacientes con cáncer de páncreas; (φ) encontrado solo en células de pacientes con cáncer de próstata; (♦) una pequeña población de subconjuntos en monocitos es positiva para este marcador; (o) los monocitos son una subpoblación de glóbulos blancos y expresan estos marcadores.

Tipo de célula	PDX-1	PSMA	CD11c	CD14	CD146	TIE-2 (C202b)	Citoqueratina 8, 18 y 19	EpCAM (CD326)	CD45 (LCA)
CCAMLC	+(*)	+(‡)	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
CTC de mama	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-
CTC de próstata	-	+	-	-	-	-	+	+/-	-
CTC de páncreas	+	-	-	-	-	-	+	+/-	-
Célula epitelial	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Monocito	-	-	+	+	-(♦)	-(♦)	-	-	+
Célula endotelial	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Glóbulo rojo	-	-	-(o)	-(o)	-	-	-	-	+

La FIG. 23 muestra la tinción con H & E de CAML. Las muestras de pacientes con cáncer de mama se identificaron mediante DAPI fluorescente y tinciones de citoqueratina. Los filtros se volvieron a teñir con Hematoxilina y Eosina Y. Se muestran dos células CAML representativas bajo un microscopio óptico. La flecha bloqueada es una vacuola redonda ubicada dentro del citoplasma de la CAML. Las flechas abiertas muestran los núcleos individuales y la naturaleza polinuclear subsecuente de las CAML (A) Un CAML de forma ovalada que tiene 3 núcleos visibles y una vacuola (B) CAML de forma redonda que tiene 5 núcleos visibles.

Para probar más si las CAML son un subtipo de MATD, se compararon los regímenes de terapia y los cambios temporales en el número de CAML en relación con la progresión y la estabilidad del cáncer. Presumimos que si las CAML se asocian con fagocitosis de restos celulares debido a citotoxicidad en el sitio del tumor, es decir, derivadas de MAT, entonces los pacientes que no responden a la quimioterapia o que experimentan solo hormonoterapia no producirían residuos celulares adicionales y por lo tanto no tendrían ningún cambio en CAML números. Por el contrario, los pacientes que responden a la quimioterapia tendrían un aumento en CAML. El análisis de los regímenes terapéuticos mostró que solo la quimioterapia, no hormonal ni la no terapia se asociaba con un aumento en los niveles de CAML en pacientes con cáncer de mama (Figura 24A) y pacientes con cáncer pancreático (Figura 24B). Para pacientes con cáncer de páncreas, CAML para el promedio de quimioterapia es 16.4 CAML, y para ninguna terapia es 4.1. Encontramos que los pacientes no tratados y tratados con hormonas, que deben mostrar pocos cambios en el tamaño del tumor, tienen un número bajo de LAMC <0,4-0,6 / ml de sangre (Figuras 24A-B). Por el contrario, si se utilizó un régimen terapéutico de quimioterapia, los números de CAML aumentaron a 3,9 / ml. Estos datos sugieren que las CAML pueden proporcionar una representación sensible de la fagocitosis en el sitio del tumor que podría cuantificar una respuesta inmunespecífica de la célula en la medida de los restos celulares causados por la quimioterapia.

Las CTC se originan en un sitio tumoral, circulan en sangre periférica y tienen la capacidad de sembrar sitios metastásicos. Sin embargo, el camino para el desprendimiento de CTC y la invasión al sistema circulatorio es un proceso complejo. Analizamos CAML aisladas de muestras de pacientes para evidenciar una interacción CTC / CAML. Se encontraron CTC unidos a CAML en 3 de 72 pacientes, todos en enfermedad metastásica (Figuras 25A-25C). Además, se encontraron tres casos de CAML con células englobadas que parecían tener un fenotipo neoplásico / CTC (Figura 25D). Representando el 7% de los pacientes, la interacción observada de un par doble CTC y CAML es indicativo de dos posibilidades. Primero, estas células se unen mientras están en circulación, lo que implica que las CAML son una respuesta inmune activa a las células cancerosas en la sangre. Segundo, estas células se unen al tumor primario y se diseminan juntas hacia la circulación, lo que implica una vía similar de intravasación. En cualquier caso, este emparejamiento de células sugiere que las CAML pueden desempeñar un papel en la respuesta inmune a la migración de células cancerígenas en la sangre periférica de pacientes con cáncer.

Los monocitos circulantes tienen la capacidad de entrar en cualquier compartimento tisular del cuerpo, incluidos los nódulos linfáticos, la médula ósea, la mayoría de los órganos, e incluso cruzan la barrera hematoencefálica. Las células progenitoras endoteliales angiogénicas (CPE) con potencial neovascular pueden derivarse de macrófagos, y los macrófagos TIE-2 + (CD202b) están intrincadamente implicados en la vascularización del tumor. Recientes experimentos in vitro y de ratón in vivo han demostrado que las CPE derivadas de monocitos CD14 + / CD11c + se diferencian en células endoteliales CD146 + / TIE-2 + capaces de actividad pro-angiogénica. Como las CAML presentaron un fenotipo de huso tipo EPC, analizamos CAML para evidencia de esta vía. Después de identificar las muestras positivas para CAML, se tiñeron CAML con paneles de marcadores monocíticos, CD 11c y CD 14, así como marcadores endoteliales angiogénicos, CD146 o TIE-2 (Figs. 26A-26D). Observamos CAML positivos tanto para marcadores monocíticos como endoteliales. El marcador monocítico CD11c fue el más reactivo, se encontró en

5 todos las CAML teñidos, mientras que un marcador monocítico secundario CD14 fue el menos reactivo, a veces negativo. El marcador pro-angiogénico (TIE-2) y el marcador endotelial (CD 146) se tiñeron positivamente en CAML, pero la intensidad de la tinción fue intermitente. Los hallazgos de superposición endotelial / monocítica no son sorprendentes, ya que los monocitos circulantes tienen una alta heterogeneidad morfológica y marcadora. Incluso hoy en día existe un gran debate sobre el sistema fagocítico mononuclear para su clasificación como células endoteliales, células derivadas de médula ósea y células monocíticas que expresan marcadores superpuestos y tienen vías de desarrollo similares. Sin embargo, la presencia de CD146, o TIE-2,

10 Aunque muchos estudios se han centrado en la diseminación de CTC, los MAT pueden estar implicados en la siembra, la proliferación y la neovascularización de metástasis. Mientras que los estudios previos proporcionan evidencia de la infiltración vascular de las células tumorales a través de la asistencia de macrófagos, nuestros resultados ahora también proporcionan evidencia de la interacción de los macrófagos con las células tumorales en la circulación. Nuestra hipótesis es que las CAML que se originan en el tumor primario se diseminan a la circulación. También demostramos que las CAML se unen y migran a través de la circulación unida a los CTC, posiblemente diseminándose en conjunto. Finalmente, describimos las CAML que expresan pro-angiogénicos TIE-2 / CD146, lo que indica la capacidad de neovascularizar un microambiente metastásico. Estos datos proporcionan evidencia clínica de que las células proangiogénicas migran a CTC, lo que sugiere un vínculo entre intravasación,

20 Captura de CAMLS y CTC

25 Las células más grandes y / o menos flexibles que otras células presentes en un fluido corporal se pueden recoger filtrando el fluido corporal. Por ejemplo, las células diana indicativas de una afección se pueden recoger pasando un fluido corporal a través de un filtro que tiene aberturas que son demasiado pequeñas para que las células diana pasen, pero lo suficientemente grandes como para que otras células pasen a través de ellas. Una vez recolectados, se puede realizar cualquier cantidad de análisis de las células diana. Dichos análisis pueden incluir, por ejemplo, identificar, contar, caracterizar expresiones de marcadores, obtener análisis moleculares y / o cultivar las células recolectadas.

30 Las CAML, las CTC patológicamente definibles y las CTC apoptóticas son más grandes que los glóbulos rojos y la mayoría de los glóbulos blancos. Se ha demostrado que el uso de un microfiltro de precisión que tiene un tamaño de poro y una distribución de poros precisos proporciona una alta eficiencia de captura y un estándar bajo de desviación. Los microfiltros CellSieve™ (Creatv MicroTech) son un ejemplo de microfiltros de precisión. Los microfiltros CellSieve™ son transparentes y no fluorescentes, lo que los hace ideales para el análisis de imágenes microscópicas. Los tamaños de poro de 7-8 micras eliminaron todos los glóbulos rojos y el 99.99% de los glóbulos blancos. Los métodos para fabricar microfiltros que producen tamaño y distribución de poros uniformes se describen en WO 2011/139445, y PCT / US 12/66390, ambos incorporados aquí como referencia en su totalidad. Los microfiltros fabricados mediante un método de grabado de pistas tienen poros ubicados al azar que pueden superponerse y dar como resultado poros efectivamente grandes. Podrían perder algunos CAML y CTC.

40 Existen muchos otros métodos para capturas de CTC. Algunos también pueden ser adoptados para capturar CAML. Generalmente se dividen en las siguientes categorías:

- 45 • Dado que las CAML son grandes en comparación con la mayoría de las células sanguíneas, cualquier método basado en el tamaño es adecuado para capturarlas. Los microfiltros son ideales para la captura de CAML y CTC. También son adecuadas las tecnologías de microplacas microfluídicas que clasifican, seleccionan, agrupan, atrapan, concentran células grandes o eliminan células pequeñas por tamaño.
- 50 • La inmunocaptura utiliza ferrofluidos, perlas magnéticas, microplacas microfluídicas, etc., recubiertos con anticuerpos para la selección de CAML o eliminación de otras células.
- 55 • La lisis de glóbulos rojos también se puede utilizar para recoger CAML. El volumen de muestra resultante requiere placas en múltiples portaobjetos de vidrio.
- FICOLL.
- Citometría de flujo.
- Una variedad de microplacas microfluídicas que utilizan una variedad de principios biológicos y físicos.

60 Resumen de servicios clínicos

Estos resultados confirman la idea de que las CAML proporcionan un fuerte indicador de la presencia de cáncer.

65 La sensibilidad y especificidad de la utilidad de las CAML puede mejorarse adicionalmente en combinación con la detección simultánea de CTC.

5 El cribado del cáncer es una estrategia utilizada en una población para identificar una enfermedad no reconocida en individuos sin signos o síntomas, con una enfermedad sintomática o no reconocida. Como tal, las pruebas de detección son algo únicas ya que se realizan en personas aparentemente en buen estado de salud. Una prueba de detección no es una prueba de diagnóstico. La prueba de diagnóstico es un procedimiento que se realiza para confirmar o determinar la presencia de una enfermedad en un individuo sospechoso de tener la enfermedad.

Las CAML pueden utilizarse como un diagnóstico de cáncer para proporcionar diagnósticos no invasivos adicionales para confirmar otras técnicas de detección, tales como mamografía, PSA y CA125.

10 Como las CAML se pueden encontrar en estadios I y II de cáncer, las CAML pueden utilizarse como cribado para la detección temprana de carcinomas de origen epitelial, especialmente para pacientes de alto riesgo de cánceres de pulmón, páncreas, colorrectales y de otro tipo que no tienen detección temprana métodos. La especificidad del tipo de cáncer puede determinarse mediante tinción para varios marcadores específicos del sitio del cáncer. Algunos ejemplos son (i) utilizar anticuerpos contra PSMA para identificar específicamente el cáncer de próstata, (ii) utilizar anticuerpos contra PDX-1 para identificar específicamente cáncer de pulmón, (iii) anticuerpos contra CA125 para cáncer de ovario y (iv) toxina cloro para identificar glioma.

20 De manera similar, las CAML pueden utilizarse para determinar la recurrencia temprana del cáncer cuando el cáncer estaba en remisión. Actualmente, la TC y la IRM se utilizan para controlar el tumor del paciente, lo que requiere que el tumor cambie de tamaño sustancialmente para notar la diferencia. Por lo tanto, los pacientes pueden perder un tiempo valioso al comenzar el tratamiento cuando solo se producen cambios sutiles en el tamaño. Los CAML, solos o en combinación con CTC, pueden proporcionar una detección temprana del regreso del cáncer. La prueba de sangre no invasiva de CAML y CTC tiene un costo mucho menor que la CT y la MRI.

25 La capacidad de rastrear CAML proporciona una oportunidad novedosa para controlar rutinariamente la respuesta de necrosis y quimioterapia o radioterapia. Si la quimioterapia no funciona, el número de CAML no aumentará. Esto se puede utilizar en paralelo con la detección de CTC. Si el tratamiento está funcionando, la cantidad de CTC patológicamente definibles disminuirá y aumentará el número de CTC apoptóticas. Sin embargo, los CTC no siempre se pueden detectar. Si los CTC se detectan al mismo tiempo que los CAML, se puede mejorar la sensibilidad y la especificidad. Para muchos cánceres, hay una gran variedad de agentes de quimioterapia. Si el paciente no responde a un tipo de quimioterapia, el paciente puede cambiar rápidamente a otro.

35 Posiblemente, las CAML también pueden utilizarse para determinar subtipos de cáncer o mutaciones, translocaciones o amplificación de genes. Hay una cantidad de núcleos cancerosos en cada CAML. Por lo tanto, el análisis molecular del núcleo para la mutación genética, defectos genéticos, translocaciones de genes puede proporcionar información para determinar los tratamientos. Existen medicamentos que se dirigen específicamente a ciertas mutaciones genéticas, translocaciones o amplificaciones.

40 Las CAML pueden utilizarse junto con las CTC, o en paralelo, para el análisis molecular. Los monocitos circulantes tienen la capacidad de entrar en cualquier compartimento tisular del cuerpo, incluidos los ganglios linfáticos, la médula ósea, la mayoría de los órganos, e incluso cruzan la barrera hematoencefálica. La detección de CAML no se limita a la sangre, sino que también se puede encontrar en los ganglios linfáticos, la médula ósea, el líquido cefalorraquídeo, la mayoría de los órganos y la orina.

45 El volumen de sangre utilizado típicamente para la detección de CTC es de 7,5 ml. Volúmenes más grandes de sangre proporcionarán más sensibilidad y consistencia, pero volúmenes más pequeños tales como de 3,5 ml pueden ser suficientes. Para muchos métodos de detección de CTC, grandes volúmenes de sangre no son prácticos por una variedad de razones. Sin embargo, la microfiltración de sangre para capturar CTC y/o CAML permite una mayor flexibilidad para aumentar el tamaño de la muestra. Se ha demostrado que los volúmenes de sangre de 50 ml se exploran con éxito utilizando microfiltros CellSieve™ con 160.000 poros. El volumen recomendado de sangre para capturar CAML sería de 7,5 ml o un volumen superior.

REIVINDICACIONES

1. Un método de exploración de cáncer en un sujeto, que comprende detectar, en una muestra de sangre de un sujeto, células circulantes similares a macrófagos asociadas a cáncer (CAML), en donde dicha célula CAML tiene las siguientes características:
- (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;
 - (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y
 - (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.
2. El método de la reivindicación 1, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, el sujeto se identifica como que posiblemente tiene un carcinoma o un tumor sólido.
3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende detectar células tumorales circulantes (CTC) en la muestra de sangre.
4. Un método para diagnosticar cáncer en un sujeto, que comprende detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, al sujeto se le diagnostica cáncer, y donde dicha célula CAML tiene las siguientes características:
- (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;
 - (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y
 - (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.
5. Un método para detectar la recurrencia del cáncer en un sujeto, que comprende detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto previamente tratado por cáncer, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, se detecta la recurrencia del cáncer, y donde dicha célula CAML tiene las siguientes características:
- (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;
 - (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y
 - (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.
6. Un método para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto, que comprende detectar las CAML en una muestra de sangre de un sujeto diagnosticado con cáncer, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML, se confirma un diagnóstico de cáncer en el sujeto, y donde dicha célula CAML tiene las siguientes características:
- (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;
 - (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y
 - (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.
7. El método de la reivindicación 4, de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, que adicionalmente comprende detectar las CTC en la muestra de sangre, en donde cuando en la muestra de sangre se detectan las CAML y las CTC, al sujeto se le diagnostica cáncer, o se detecta recurrencia de cáncer, o se confirma un diagnóstico de cáncer en el sujeto.
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde el diagnóstico inicial de cáncer fue mediante mamografía, prueba de PSA, o presencia de CA125.
9. El método de la reivindicación 1 o 4, en donde el sujeto es un sujeto que se sospecha que tiene cáncer.
10. Un método para controlar la eficacia de un tratamiento del cáncer, que comprende (a) determinar el número de CAML en una muestra de sangre de un sujeto antes del tratamiento del cáncer, y (b) comparar el número de CAML determinado en (a) con un número de CAML determinado a partir de una muestra de sangre similar del mismo sujeto en uno o más puntos temporales después del tratamiento, comprendiendo además opcionalmente dicho método (c) determinar el número de CTC en la muestra biológica (a), y (d) comparar el número de CTC determinado en (c) con un número de CTC determinado a partir de la muestra de sangre de (b), y donde dicha célula CAML tiene las siguientes características:
- (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;

- (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y
- (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.

5 11. El método de la reivindicación 10, donde un cambio en la forma de un aumento o una disminución en el número de CAML es una indicación de eficacia del tratamiento, donde preferentemente el tratamiento del cáncer es quimioterapia o radioterapia.

10 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicha célula CAML tiene expresión del marcador monocítico CD14.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde dicha célula CAML tiene una o más o cada una de las siguientes características adicionales:

15 (d) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, donde la citoqueratina se difunde, o se asocia con vacuolas y/o material ingerido; y/u

opcionalmente, donde la célula tiene una o más o cada una de las siguientes características adicionales:

- 20 (e) fenotipo CD45 positivo;
- (f) expresión de EpCAM difusa con distribución casi uniforme;
- (g) expresión de uno o más marcadores de un tumor primario;
- (h) expresión de marcadores monocíticos CD11C y CD14; e
- 25 (i) expresión de marcadores endoteliales CD146, CD202b y CD31.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde las CAML se detectan utilizando uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, lisis de glóbulos rojos, FICOLL, una microplaca microfluídica y citometría de flujo, o una combinación de los mismos, preferentemente en donde la metodología de exclusión por tamaño comprende el uso de un microfiltro;

30 o preferentemente en donde las CAML se detectan utilizando una microplaca microfluídica que se basa en la separación física en función del tamaño, separación hidrodinámica en función del tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentración de células grandes, o eliminación de células pequeñas en función del tamaño; o en donde las CAML se detectan utilizando un ensayo de microfiltración a baja presión CellSieve™.

35 15. El método de la reivindicación 3 o reivindicación 7 o reivindicación 10, donde las CAML y las CTC se detectan simultáneamente utilizando un microfiltro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 7-8 micrómetros, preferentemente donde el microfiltro tiene geometría de poros de precisión y distribución de poros uniforme.

40 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, donde la muestra de sangre es sangre periférica.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un tumor sólido, cáncer en estadio I, cáncer en estadio II, cáncer en estadio III, cáncer en estadio IV, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer colorrectal.

45 18. Una célula circulante similar a macrófago asociada a cáncer (CAML) aislada, donde la célula tiene las siguientes características:

- 50 (a) un núcleo atípico grande que tiene un tamaño de aproximadamente 14-64 µm;
- (b) un tamaño de célula que varía de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros; y
- (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en una forma de huso, de renacuajo, redonda, oblonga y amorfa.

55 19. La célula aislada de la reivindicación 18, en donde la célula tiene una expresión de marcador monocítico CD14.

20. La célula aislada de la reivindicación 18 o de la reivindicación 19, en donde la célula tiene una o más o cada una de las siguientes características adicionales:

60 (d) expresión de una o más de citoqueratina 8, 18 y 19, en donde la citoqueratina se difunde, o se asocia con vacuolas y/o material ingerido; y/u

opcionalmente, en donde la célula tiene una o más o cada una de las siguientes características adicionales

- 65 (e) fenotipo CD45 positivo;
- (f) expresión de EpCAM difusa con distribución casi uniforme;

- (g) expresión de uno o más marcadores de un tumor primario;
- (h) expresión de marcadores monocíticos CD11C y CD14; e
- (i) expresión de marcadores endoteliales CD146, CD202b y CD31.

5

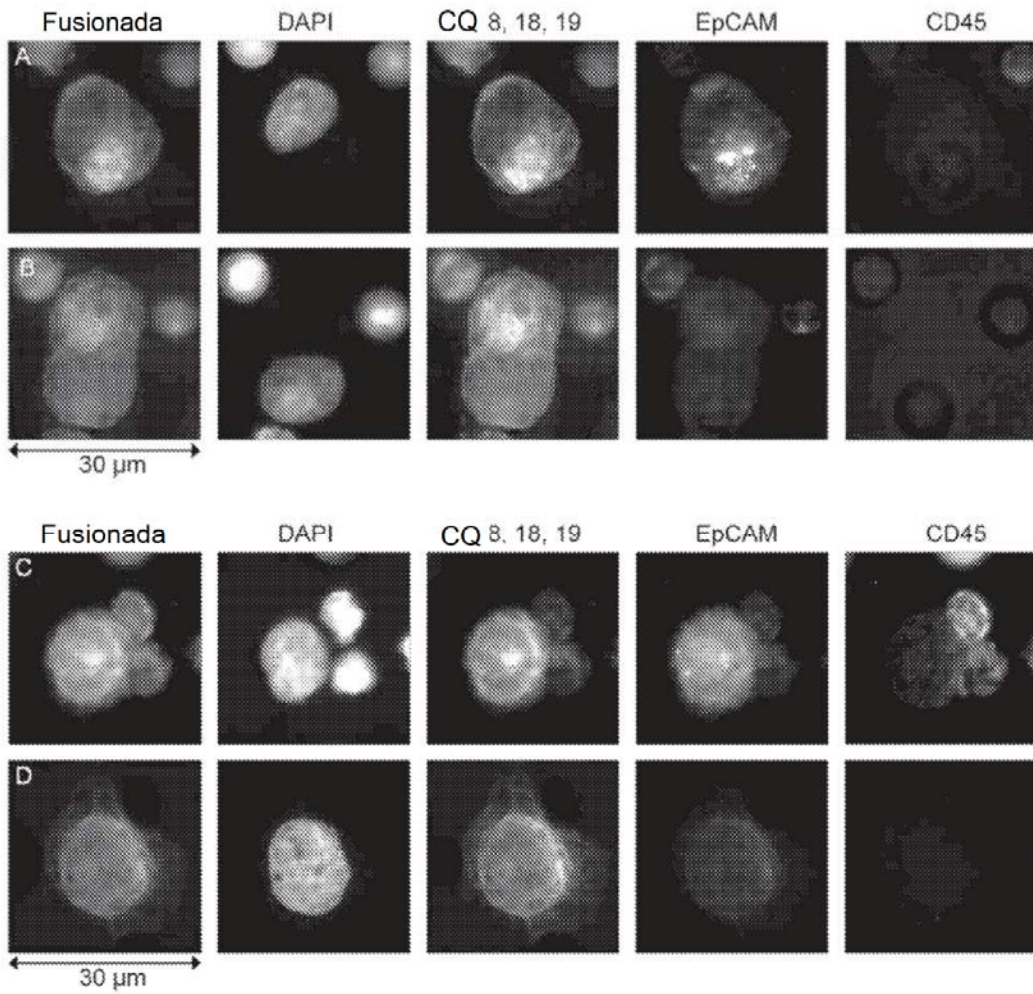


FIG. 1

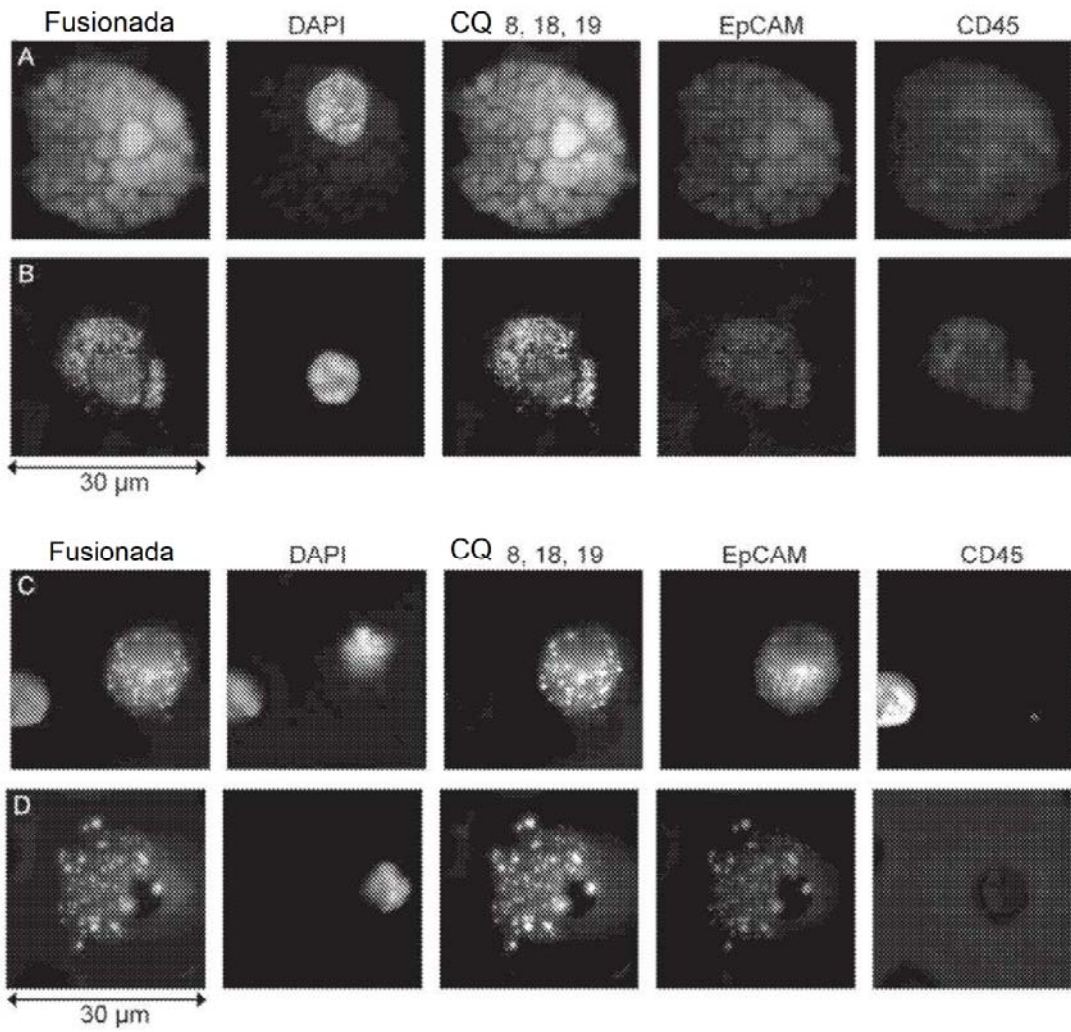


FIG. 2

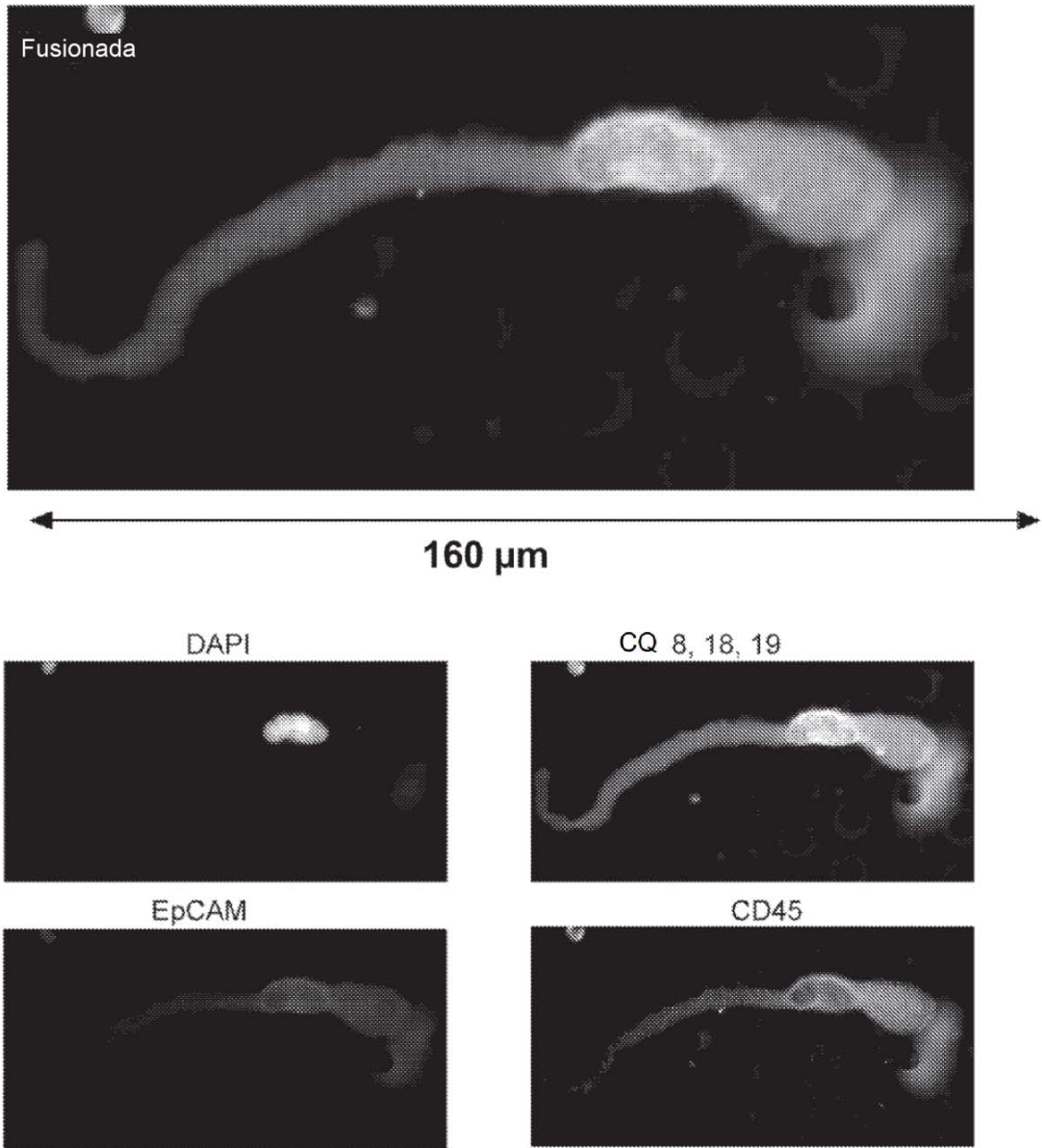


FIG. 3

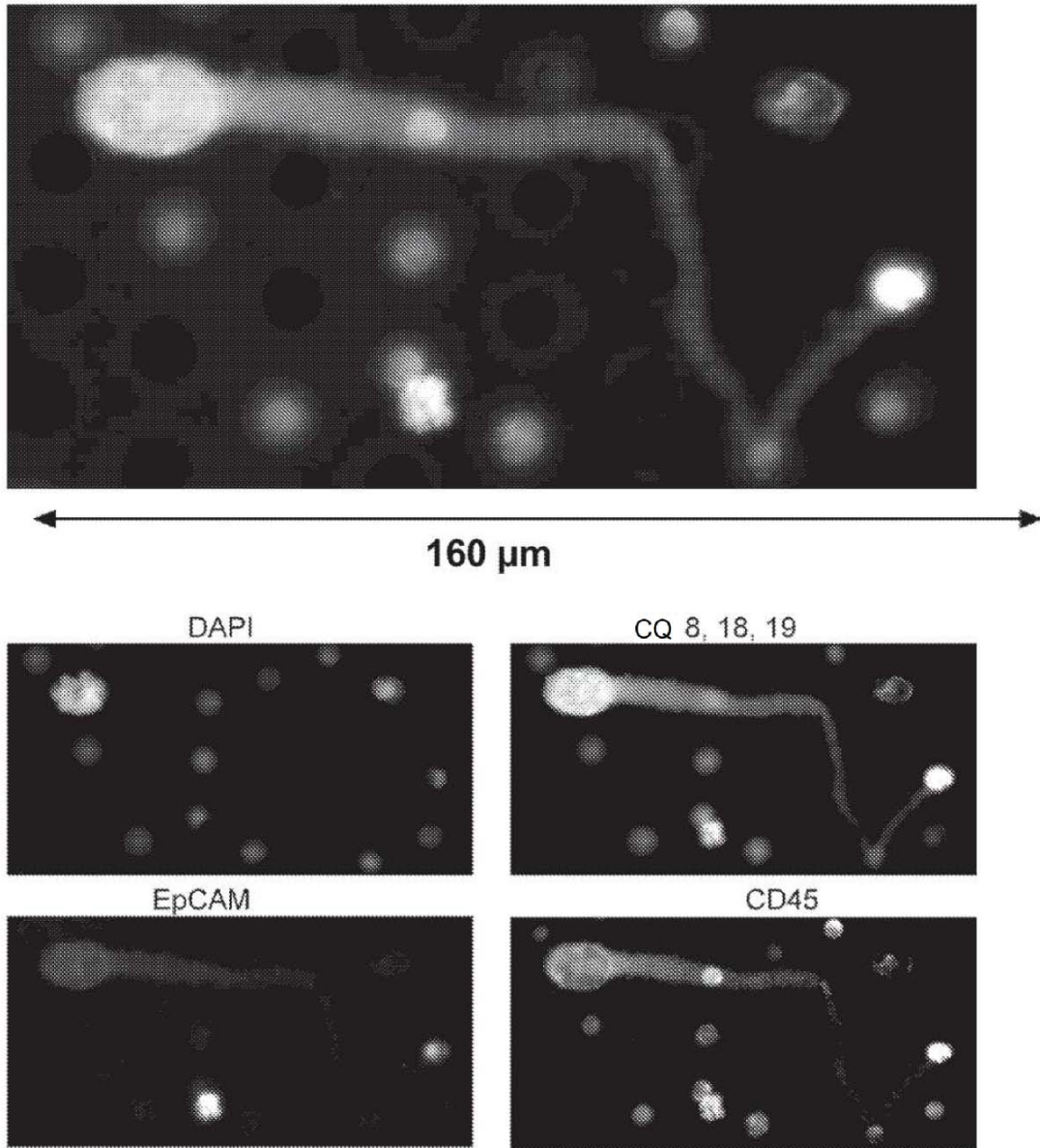


FIG. 4

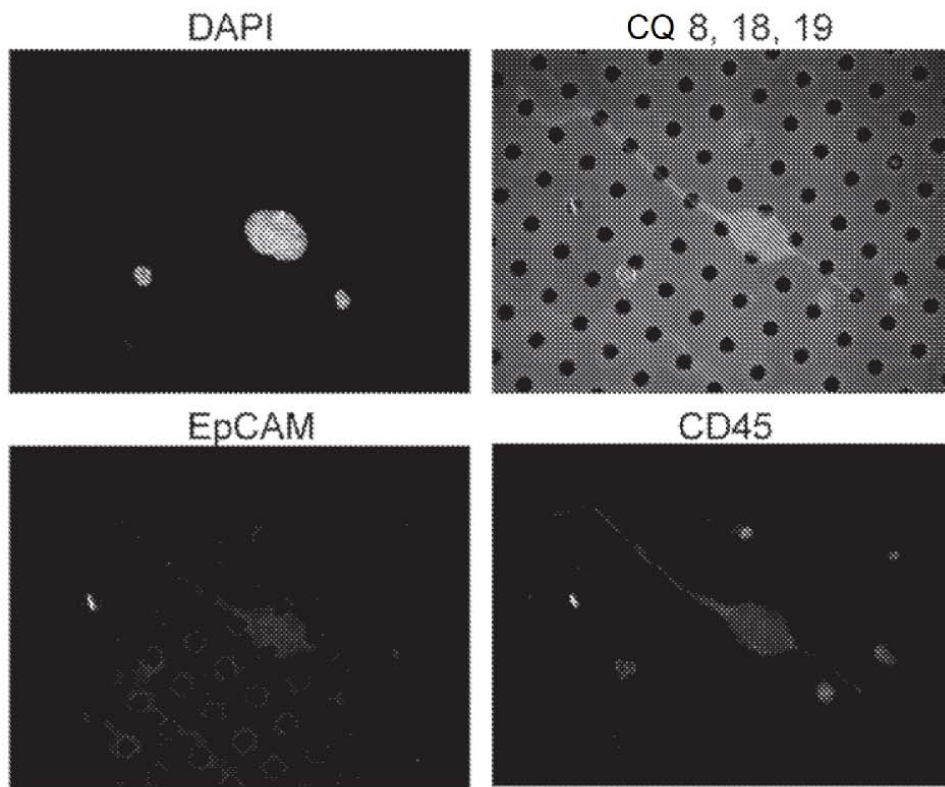
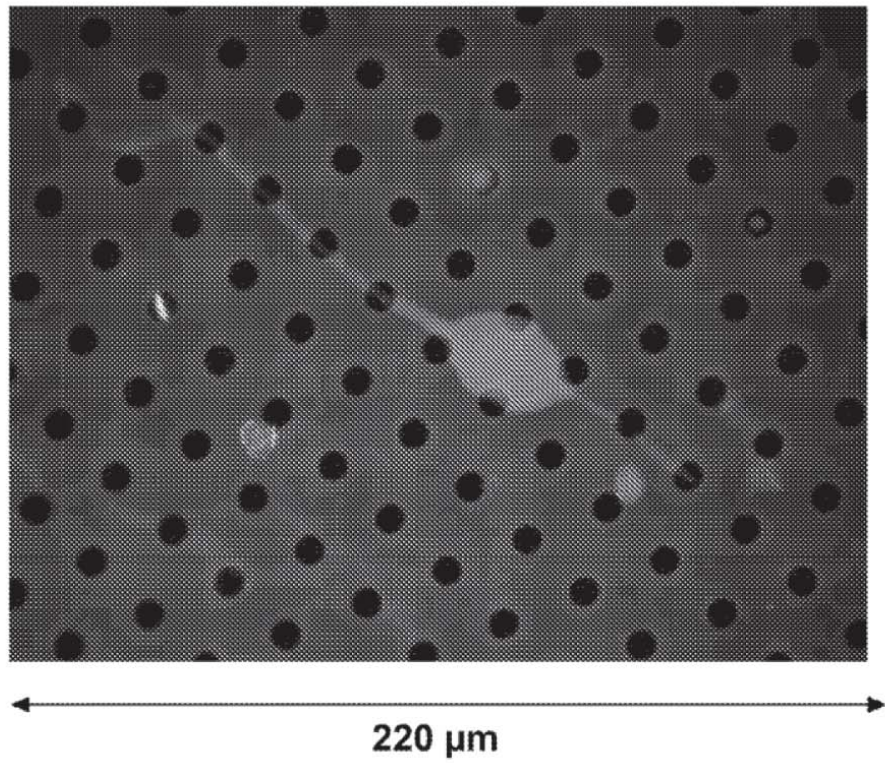


FIG. 5

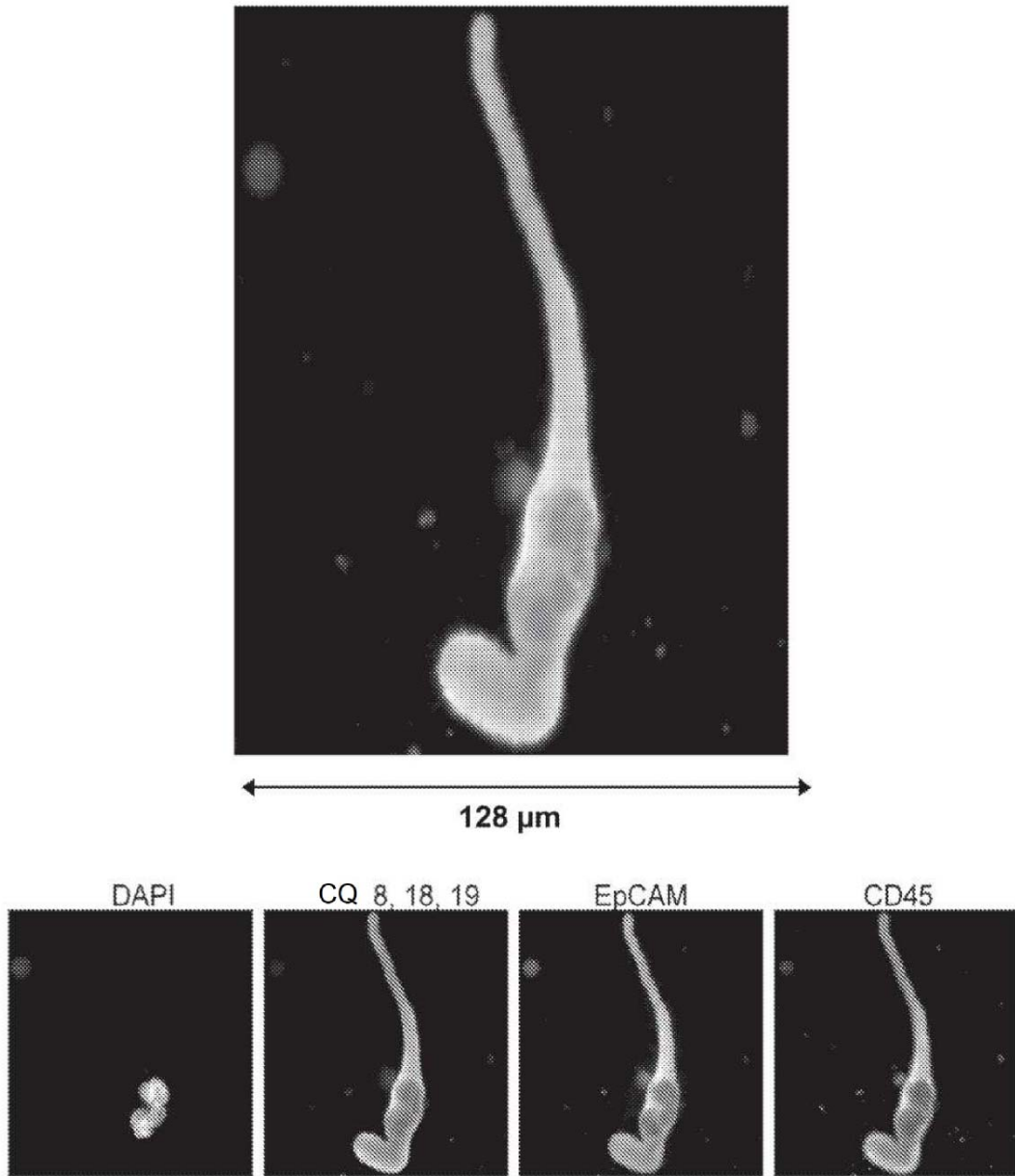


FIG. 6

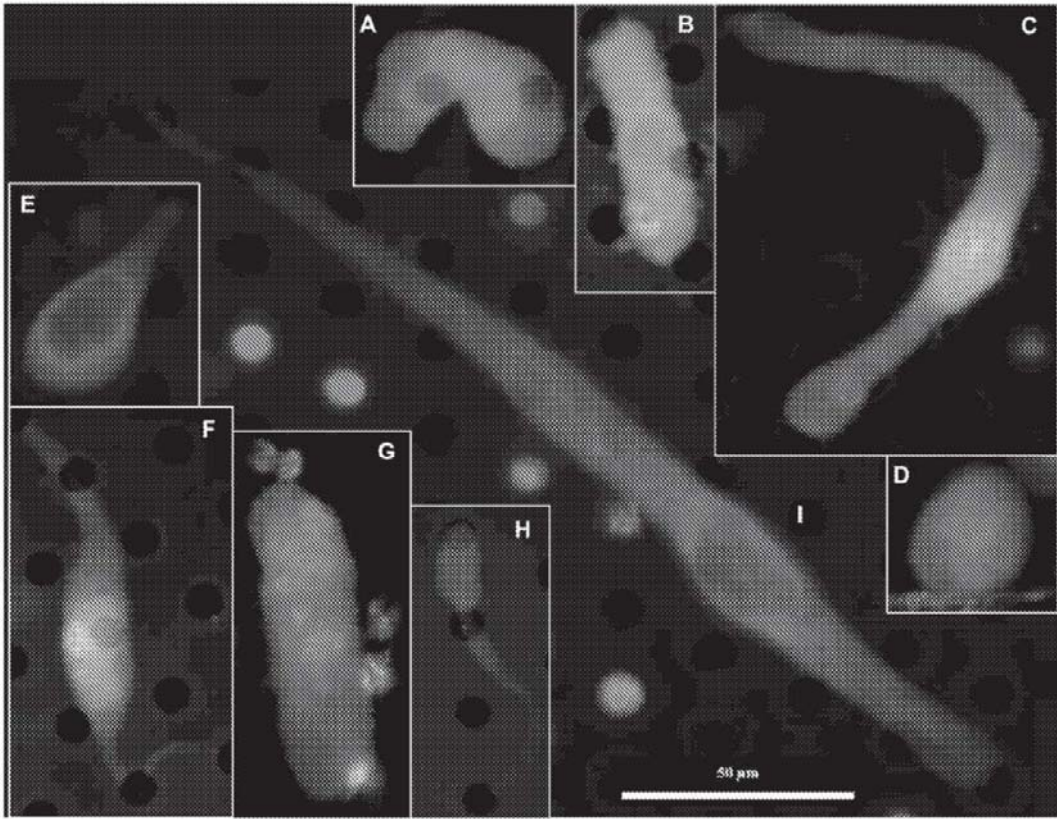
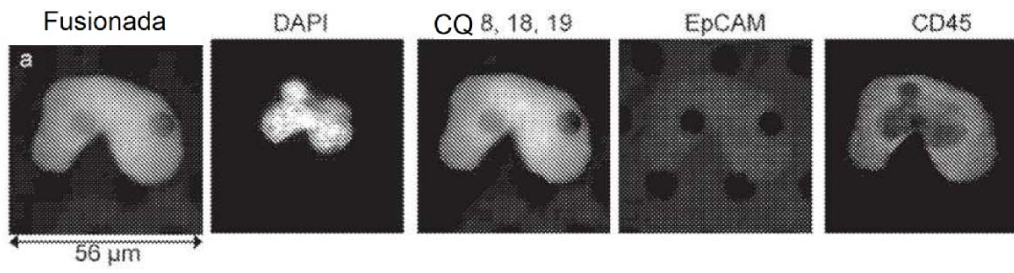
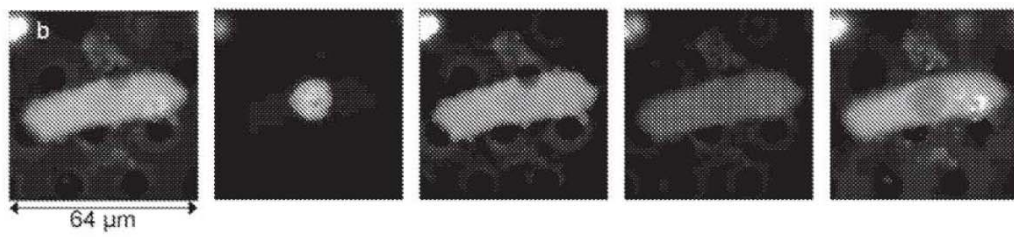


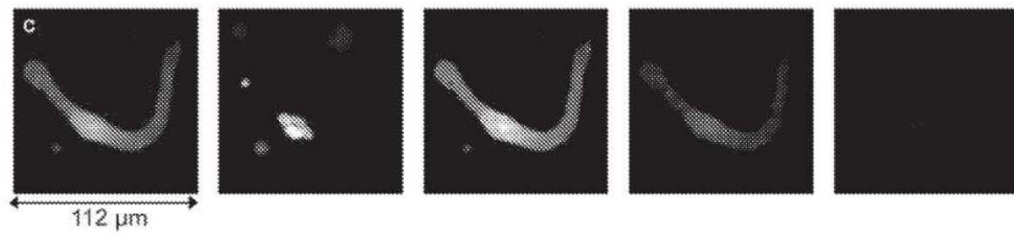
FIG. 7



(A)

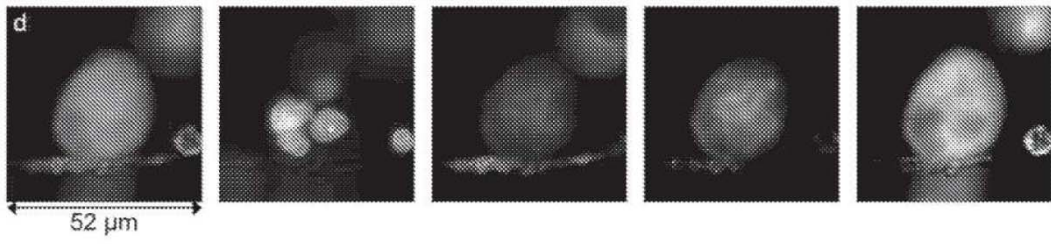


(B)

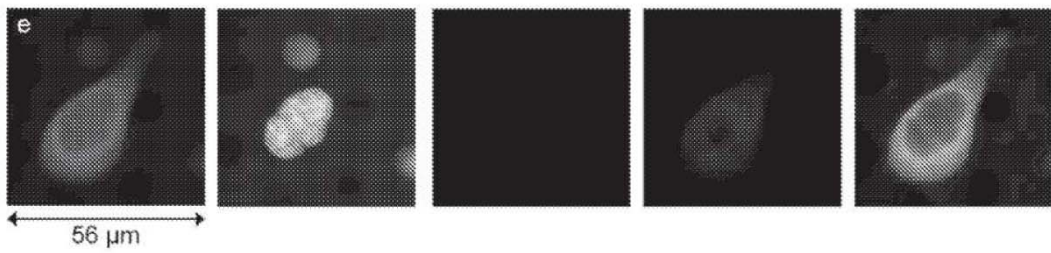


(C)

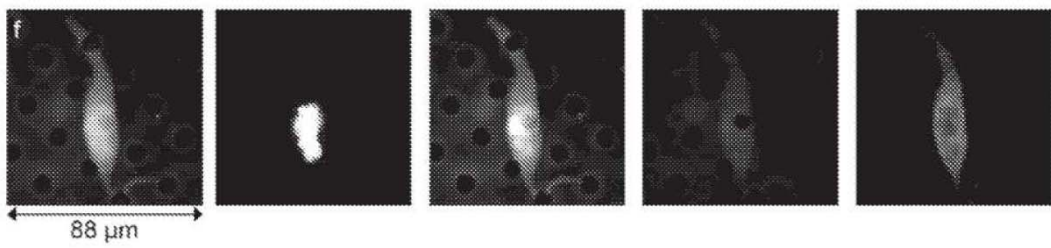
FIGS. 8A-8C



(D)



(E)

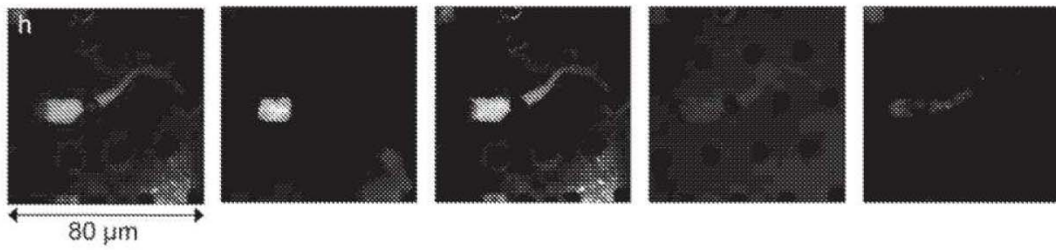


(F)

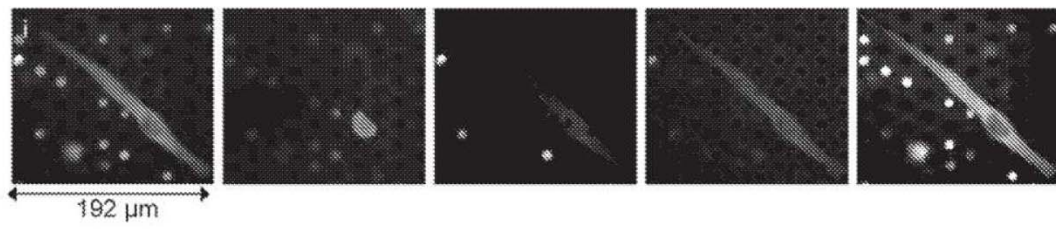
FIGS. 8D-8F



(G)



(H)



(I)

FIGS. 8G-8I

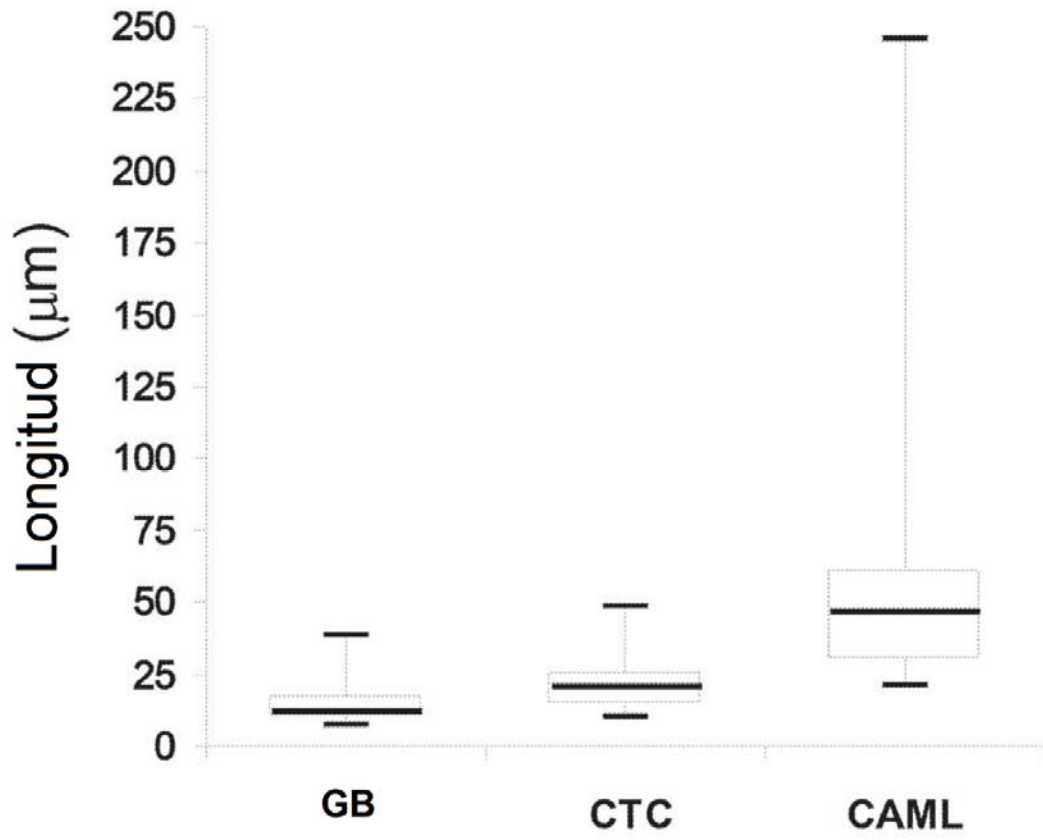


FIG. 9

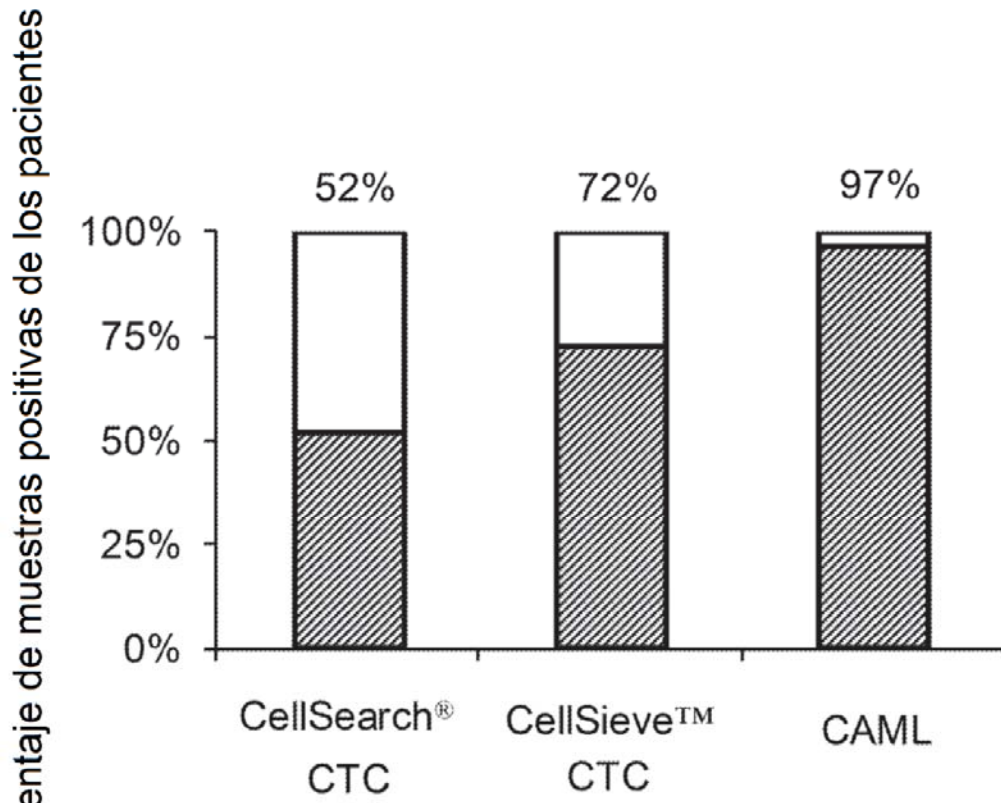


FIG. 10

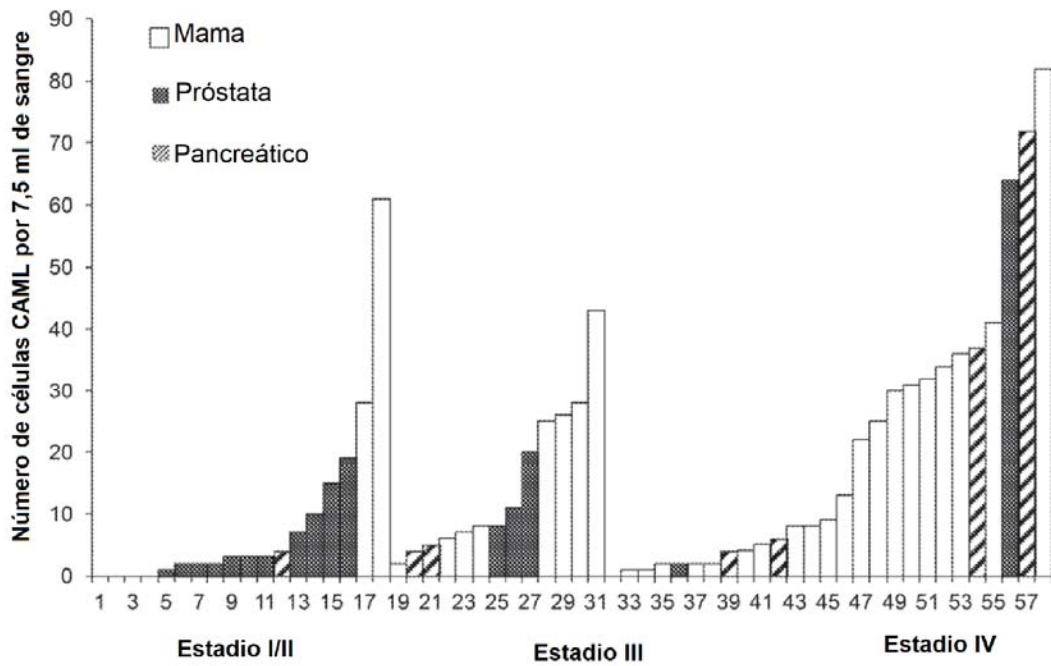


FIG. 11

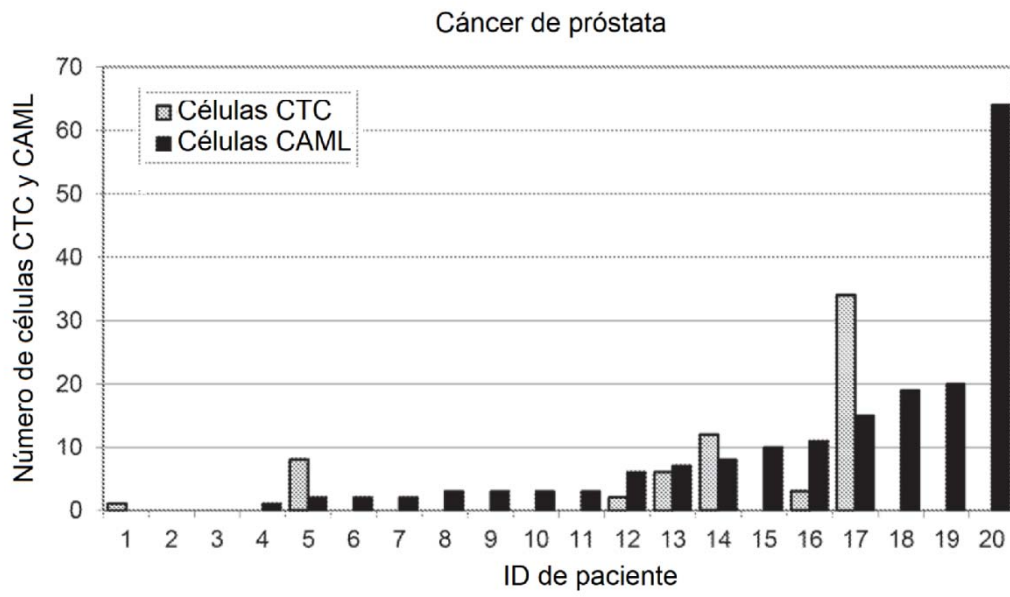


FIG. 12

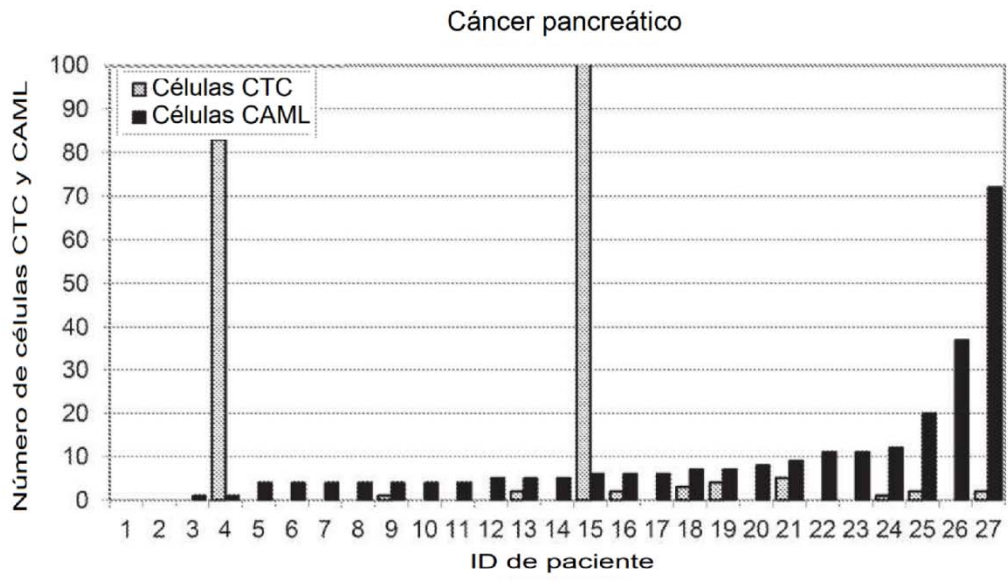


FIG. 13

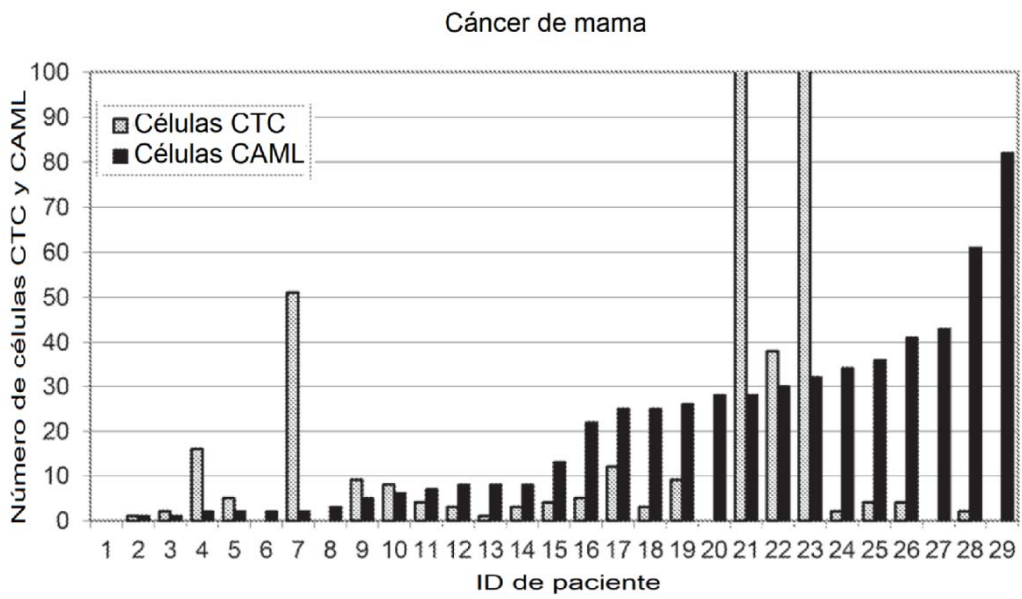


FIG. 14

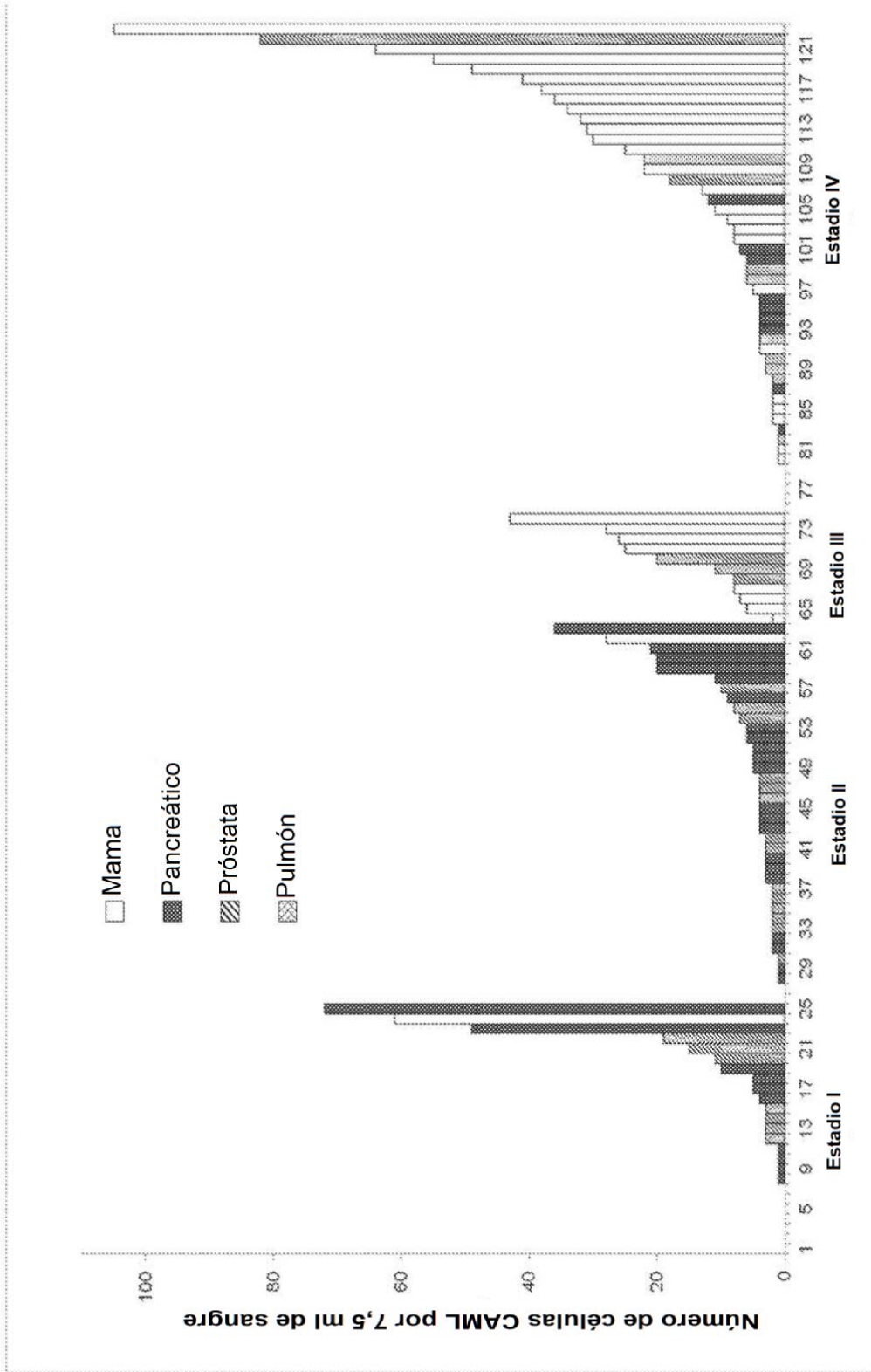


FIG. 15

Cáncer de próstata

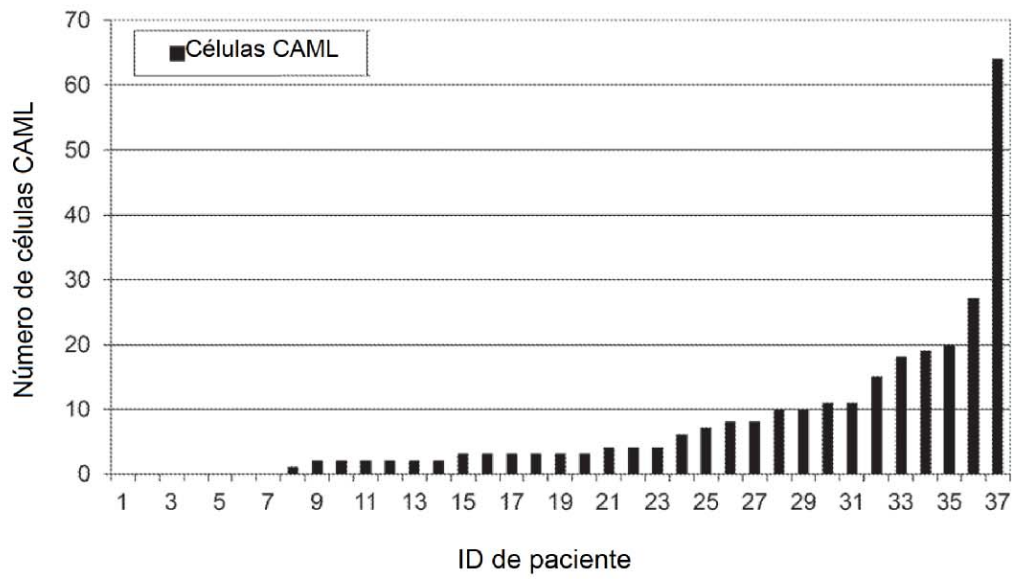


FIG. 16A

Cáncer de próstata

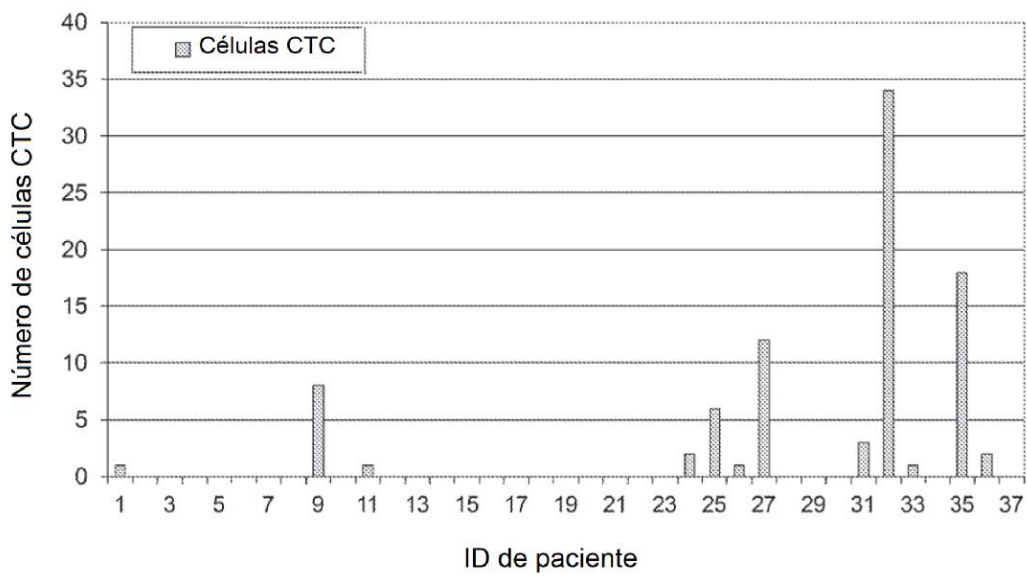


FIG. 16B

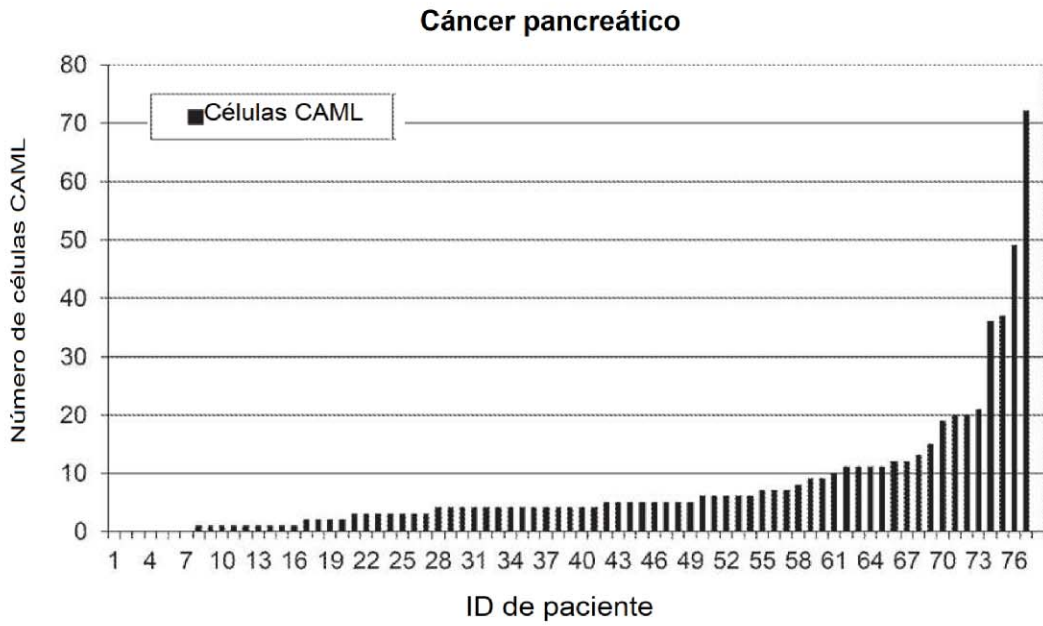


FIG. 17A

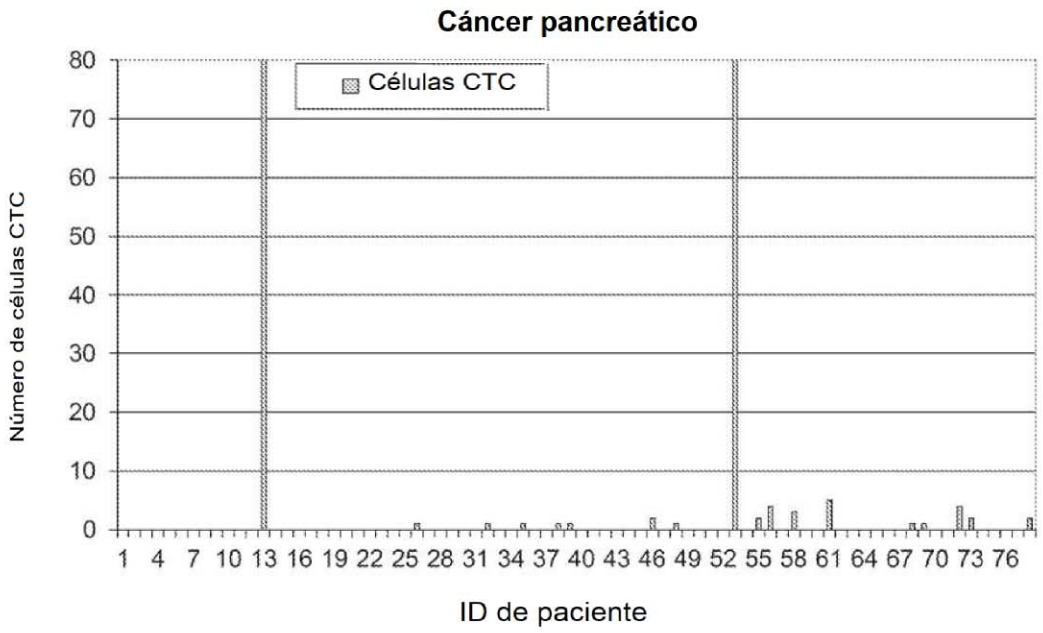


FIG. 17B

Cáncer de mama

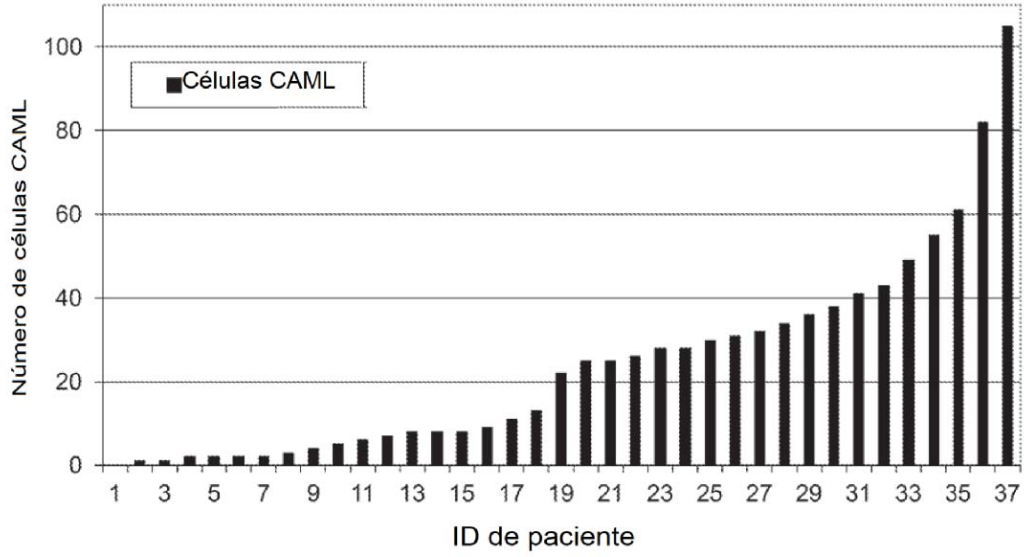


FIG. 18A

Cáncer de mama

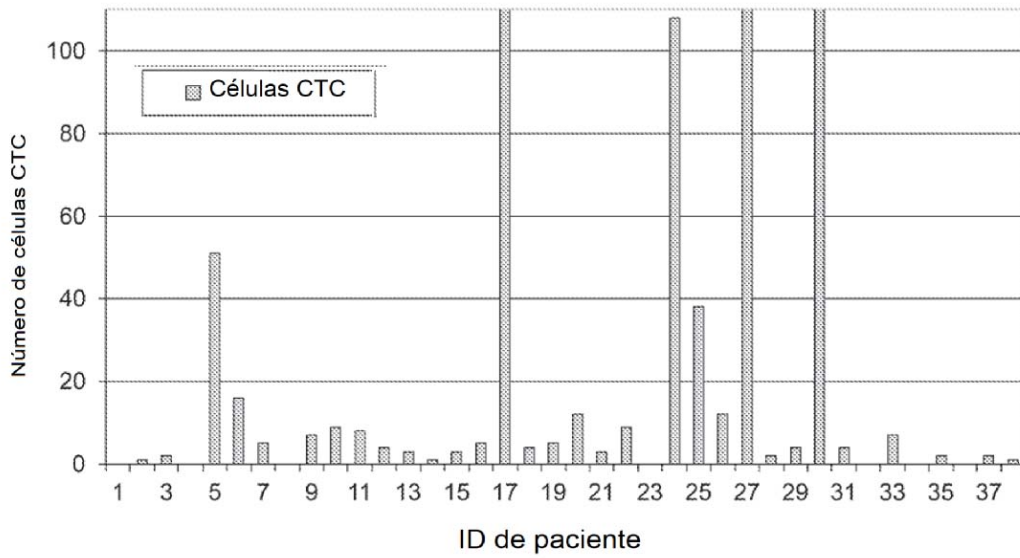


FIG. 18B

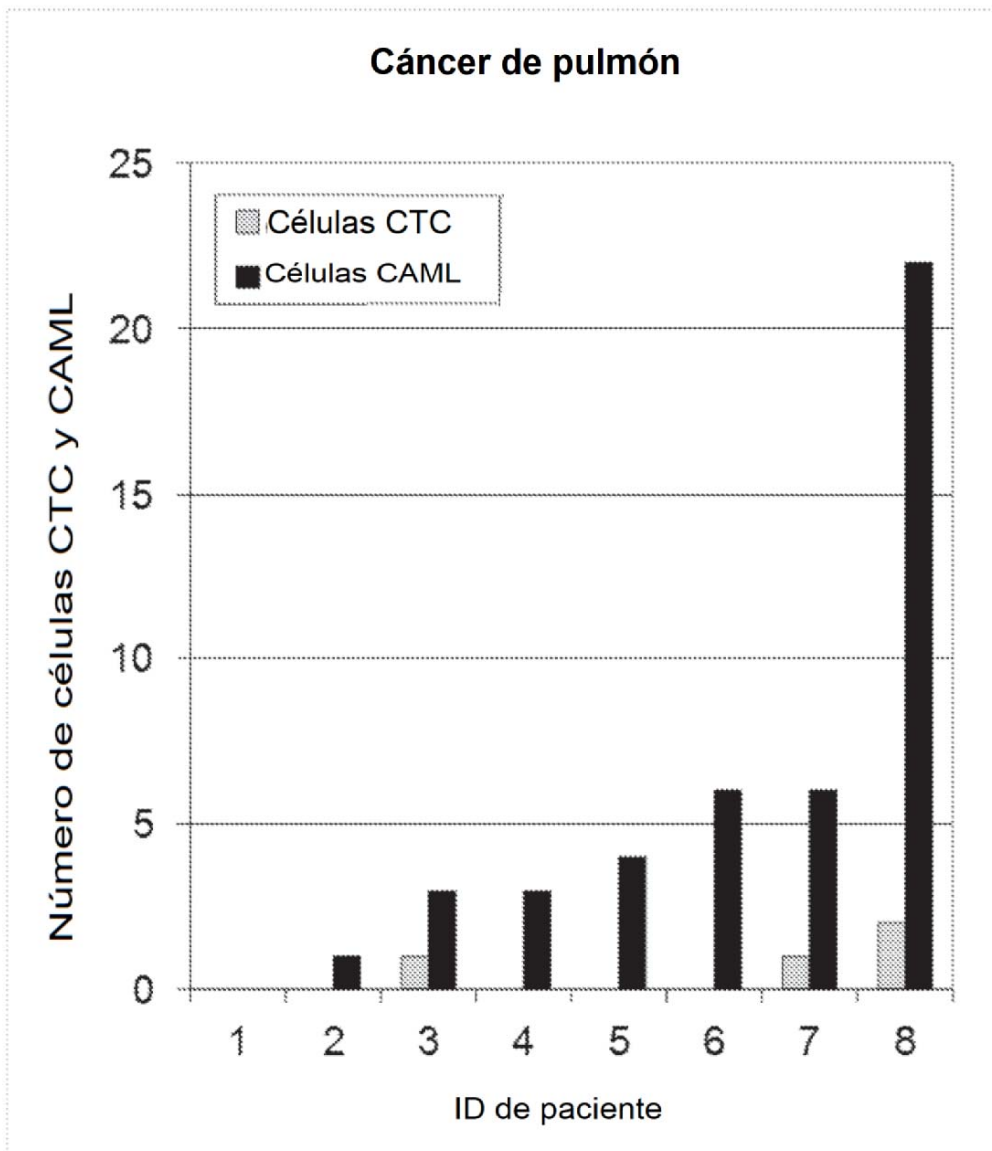


FIG. 19

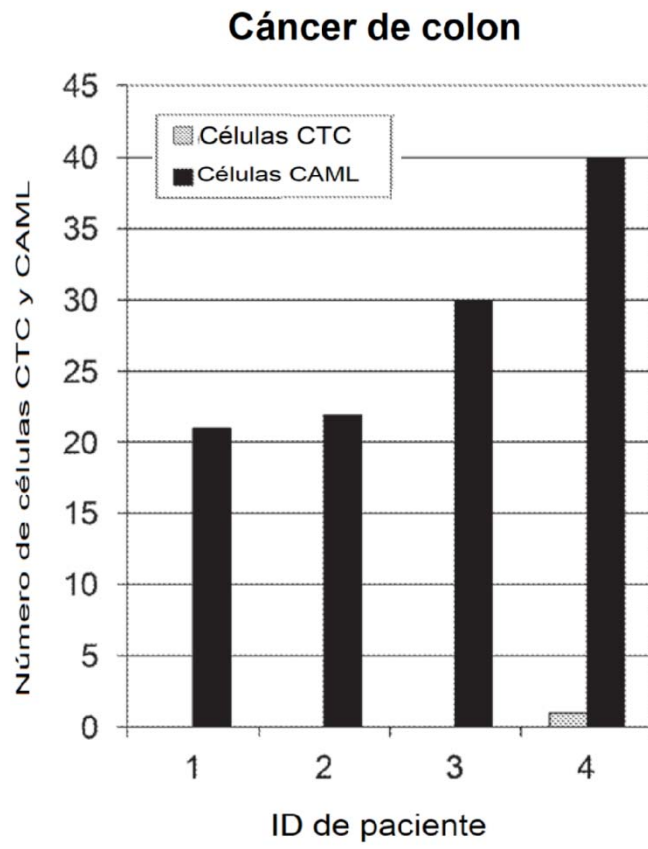


FIG. 20

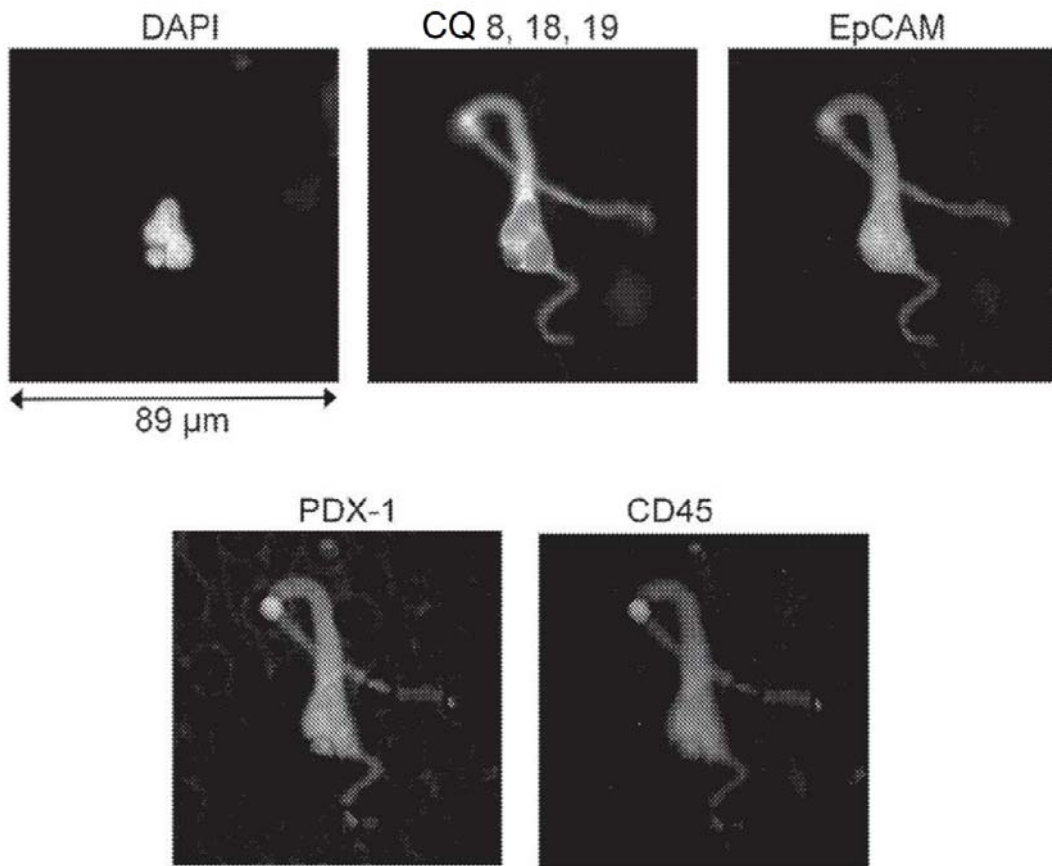


FIG. 21

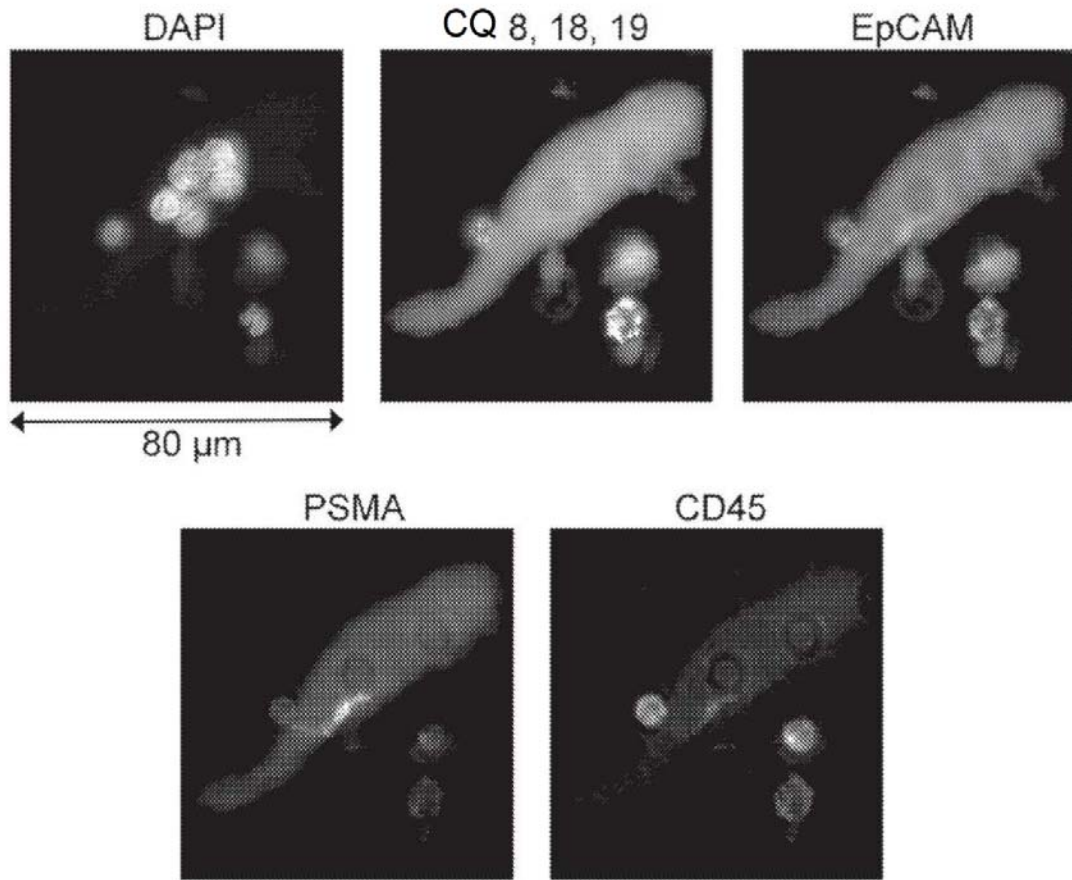


FIG. 22

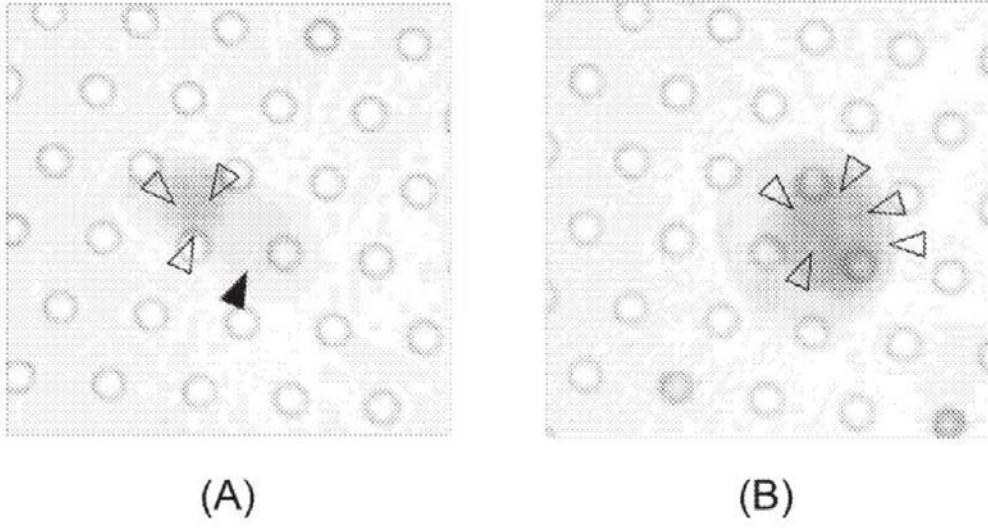


FIG. 23

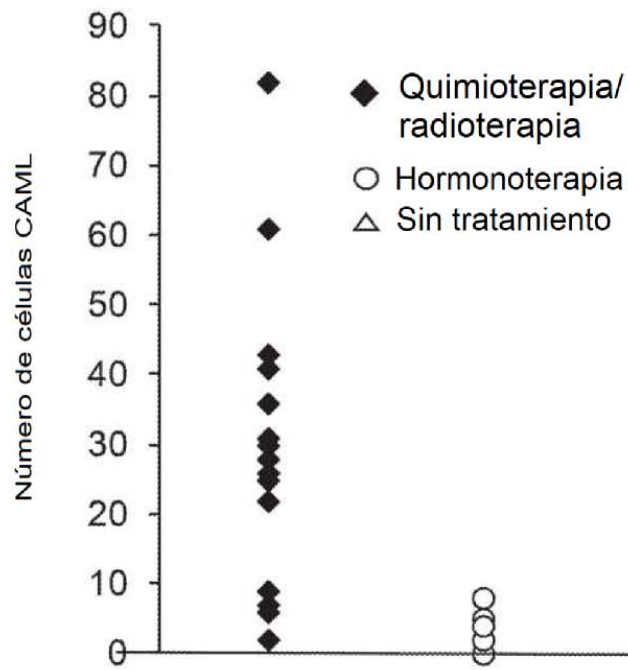


FIG. 24A

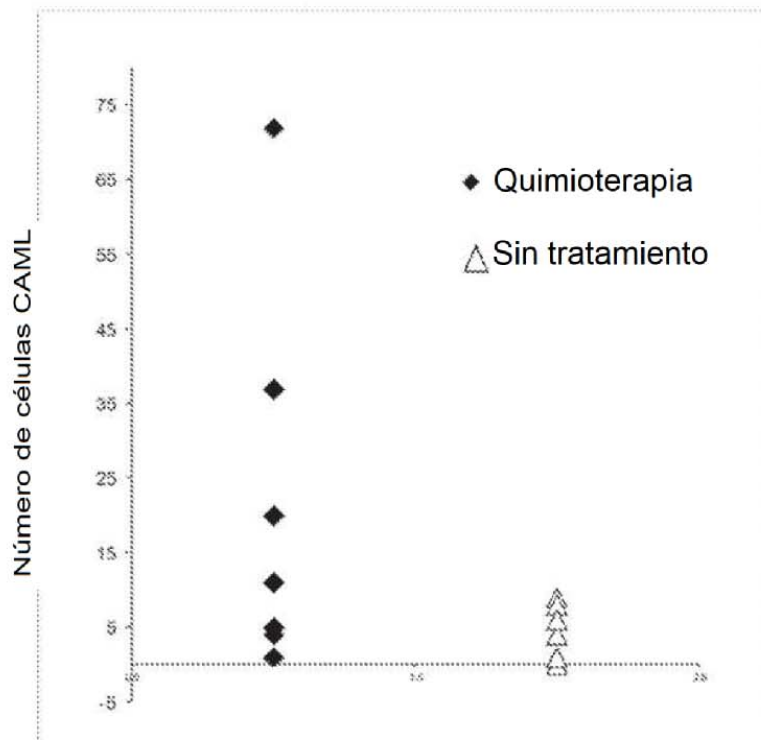


FIG. 24B

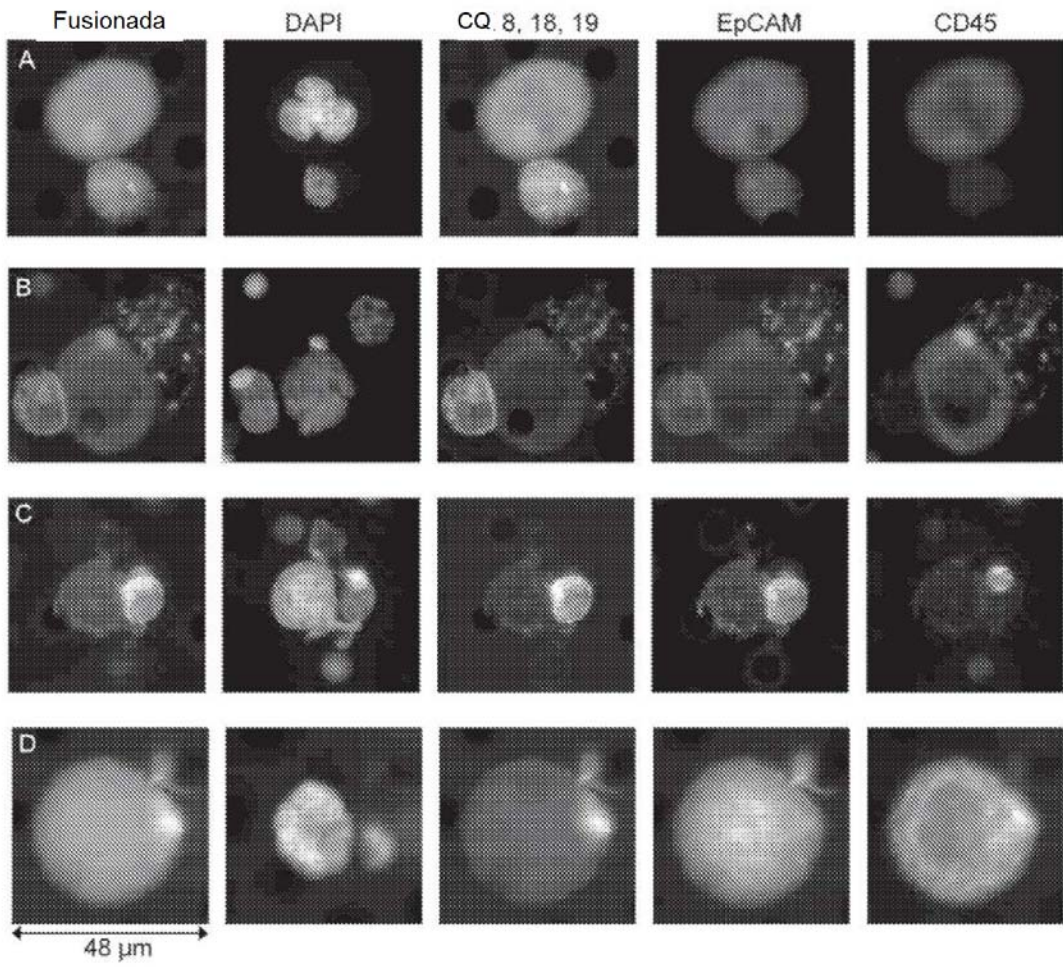


FIG. 25

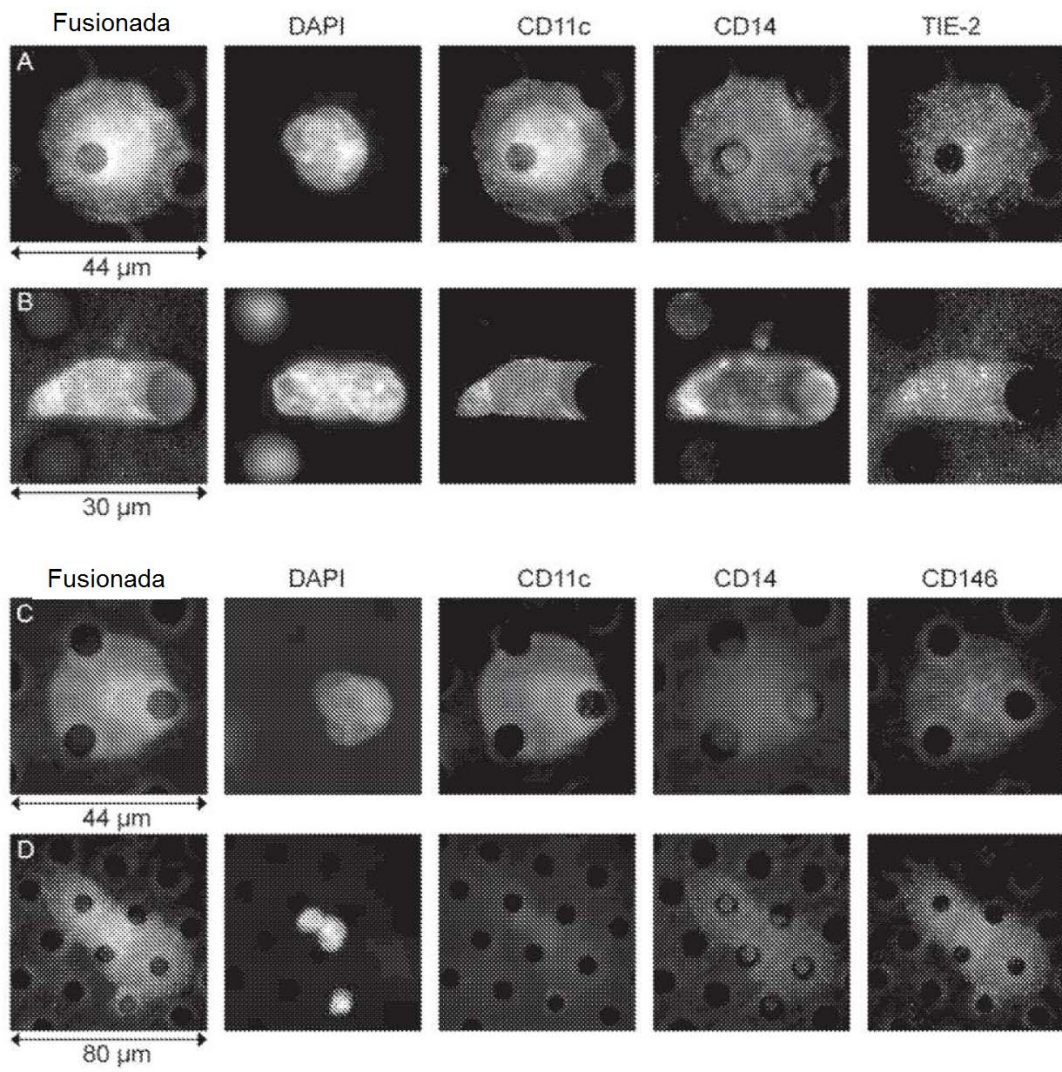


FIG. 26