

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 232**

51 Int. Cl.:

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: **22.01.2013** **PCT/IB2013/050547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013** **WO13111054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2013** **E 13708526 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019** **EP 2807485**

54 Título: **Procedimientos de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 y procedimientos de diagnóstico de cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero**

30 Prioridad:

24.01.2012 US 201261590066 P

17.01.2013 US 201361753665 P

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

09.09.2019

73 Titular/es:

PFIZER INC. (50.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US y
EPIC SCIENCES, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

GERBER, HANS-PETER;
MARRINUCCI, DENA;
PIRIE-SHEPHERD, STEVEN y
TUCKER, ERIC

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 724 232 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

Procedimientos de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 y procedimientos de diagnóstico de cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere, en general, a un procedimiento de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en un sujeto mamífero y a procedimientos de diagnóstico de cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero.

Antecedentes de la invención

- 10 El antígeno 5T4 humano se expresa en numerosos tipos de cáncer y está sustancialmente ausente en los tejidos normales. Recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales de alta afinidad que se unen específicamente al antígeno 5T4 y se han conjugado agentes citotóxicos a los anticuerpos 5T4 para formar conjugados de fármacos de anticuerpos para su uso en el tratamiento del cáncer positivo para 5T4 (patentes US Nº 8.044.178 y 8.309.094). De esto se deduce que una evaluación de la expresión de 5T4 podría ser un enfoque útil para identificar pacientes con cáncer positivo para 5T4. Un enfoque sería la detección del antígeno 5T4 en células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con cáncer.

- 15 Se han observado células tumorales circulantes en la sangre periférica de pacientes con cánceres derivados de epitelio en concentraciones ultra bajas (Kraeft et al., Clin Cancer Res 10: 3020-3028, 2004). Se ha demostrado que el número de estas células está correlacionado con el resultado para cohortes de pacientes con cáncer de mama metastásico con enfermedad progresiva en el momento del muestreo (Cristofanilli et al., N Engl J Med 351: 781-791, 2004). Por esta razón, su caracterización tiene un considerable interés biomédico con el fin de comprender cómo pueden desplazarse estas células a través del torrente sanguíneo a sitios anatómicamente distantes y formar una enfermedad metastásica. Por consiguiente, la identificación de las CTCs asociadas con el cáncer positivo para 5T4 podría proporcionar una valiosa herramienta de diagnóstico para la identificación de los pacientes.

- 20 En la actualidad, las CTCs se detectan y analizan principalmente por medio de marcadores inmunocitoquímicos, tales como EpCam, y del uso de tinción nuclear con DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol), una tinción fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en A-T en el ADN. Aunque estos enfoques han tenido éxito en la enumeración y en la distinción de las CTCs, difieren de los enfoques citopatológicos estándar, ya que omiten la correlación con la tinción morfológica estándar de la que depende la patología diagnóstica. Esto crea dificultades para comparar las CTCs con las células tumorales de otros sitios obtenidas mediante procedimientos de diagnóstico rutinarios. Aunque la capacidad para detectar CTCs tiene el potencial de ayudar en el tratamiento diagnóstico e individualizado del cáncer y en la eficacia del tratamiento, la comprensión de la biología de las CTCs podría mejorarse incluyendo procedimientos citopatológicos estándar. Existe una necesidad en la técnica de utilizar imágenes de alta resolución detalladas de las CTCs con procedimientos de tinción de patología diagnóstica convencionales y microscopía de campo claro para conferir la posibilidad de realizar un diagnóstico citopatológico estándar de células de carcinoma positivas para 5T4 circulantes y avanzar en la adopción de un diagnóstico usando CTCs-positivas para 5T4 en la clínica. El documento WO2007/089911 se refiere a procedimientos de detección de células tumorales circulantes y de diagnóstico de cáncer en un sujeto mamífero para indicar la presencia de cáncer metastásico o en estadio temprano. El documento WO2010/070276 se refiere a un procedimiento para detectar un cáncer positivo para 5T4 en un sujeto, que comprende identificar y/o aislar exosomas en una muestra del sujeto; y detectar el 5T4 asociado al exosoma.

Resumen de la invención y divulgación

- 40 La invención se define en las reivindicaciones. En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer positivo para 5T4, que comprende: analizar una muestra de sangre del sujeto, en el que la muestra de sangre comprende una población de células; colocar la muestra de sangre sobre un sustrato; detectar la presencia o la ausencia de un primer marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células nucleadas; detectar la presencia o la ausencia de un segundo marcador en la muestra de sangre que se une a las células tumorales circulantes; detectar la presencia o la ausencia de un tercer marcador en la muestra de sangre que se une a la población de células o un subconjunto de la población de células que no se ha determinado que sean células tumorales; detectar la presencia o la ausencia de un cuarto marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células tumorales circulantes en el que dicho cuarto marcador es el antígeno 5T4 humano; y, analizar la población de células detectada por los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes.

En otra realización, el procedimiento para detectar la presencia o la ausencia de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en un mamífero sospechoso de tener cáncer positivo para 5T4 indica la presencia de cáncer positivo para 5T4 en estadio temprano, un estado libre de enfermedad o un estado de enfermedad no medible en el sujeto mamífero.

En otra realización, la presencia o ausencia de las células tumorales circulantes en la muestra de sangre indica la gestión de la terapia durante la terapia de cáncer positivo para 5T4 o la recuperación del cáncer.

En otra realización, la población de células es una población de células mixta, el sustrato es un sustrato plano, un dispositivo microfluídico o un cartucho que contiene una población de células enriquecida.

5 En otra realización, la colocación de la muestra de análisis en el sustrato forma una monocapa biológica.

En otra realización, la población de células se analiza por medio de detalle nuclear, contorno nuclear, presencia o ausencia de nucleolos, calidad de citoplasma o cantidad de citoplasma, en el que dicho análisis usa DAPI.

10 En otra realización, la población de células se analiza midiendo células intactas con una alta relación nuclear a citoplásmica, células intactas con una baja relación nuclear a citoplásmica, células apoptóticas tempranas o células apoptóticas tardías, e identificando las células tumorales circulantes.

En otra realización, el primer marcador, el segundo marcador, el tercer marcador y el cuarto marcador son marcadores fluorescentes.

En otra realización, el primer marcador es una tinción citológica para identificar la célula tumoral circulante por medio de la morfología, el tamaño o la relación nuclear a citoplásmica.

15 En otra realización, la tinción citológica es DAPI.

En otra realización, la tinción citológica es la tinción de Wright-Giemsa.

En otra realización, el segundo marcador o el tercer marcador es un marcador específico de célula.

En otra realización, el marcador específico de célula es citoqueratina, CD45, y según la presente divulgación, M30, receptor de quimiocinas, CXCR1, CXCR4, CD44, CD24, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, EGFR o HuR.

20 En otra realización, la detección de la presencia del primer marcador, la presencia del segundo marcador, la presencia del tercer marcador o la presencia del cuarto marcador, comprende además analizar la población de células por medio de unión celular al sustrato, escanear la población de células en el sustrato y tomar imágenes de las células mediante microscopía digital usando reubicación.

25 En otra realización, la detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en la muestra de sangre indica la presencia de cáncer positivo para 5T4, en el que dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinomas de vejiga, de mama, de cuello uterino, colorrectal, de endometrio, de riñón, de hígado, de pulmón, de esófago, de ovario, de próstata, de páncreas, de piel, de estómago y de testículos. Preferiblemente, dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinomas colorrectal, de mama, pancreático y de células de pulmón no pequeñas.

30 En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer positivo para 5T4, que comprende: analizar una muestra de sangre del sujeto, en el que la muestra de sangre comprende una población de células; colocar la muestra de sangre sobre un sustrato; detectar la presencia o la ausencia de un primer marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células nucleadas; detectar la presencia o la ausencia de un segundo marcador en la muestra de sangre que se une a las células tumorales circulantes; detectar la presencia o la ausencia de un tercer marcador en la muestra de sangre que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células que no se ha determinado que sean células tumorales; detectar la presencia o la ausencia de un cuarto marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células tumorales circulantes en el que dicho cuarto marcador es antígeno 5T4 humano; y, analizar y cuantificar la población de células detectada por los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes.

40 En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento en el que dicha cuantificación del antígeno 5T4 humano en las células tumorales circulantes se usa para generar una puntuación H, en la que dicha puntuación H se usa para seleccionar una población de pacientes con cáncer positivo para 5T4, y en la que dichas células tumorales circulantes se caracterizan utilizando un ensayo de 5T4 de 4 colores optimizado.

45 En otra realización, la divulgación proporciona un procedimiento de cribado de un conjugado anticuerpo-fármaco para el tratamiento del cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer, que comprende: administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado anticuerpo-fármaco al sujeto sospechoso de tener cáncer; analizar una muestra de sangre del sujeto antes y después del tratamiento con el fármaco candidato, en el que la muestra de sangre comprende una población de células sospechosas de contener células tumorales circulantes positivas para 5T4; colocar la muestra de sangre sobre un sustrato; detectar la presencia o la ausencia de un primer marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células nucleadas; detectar la presencia o la ausencia de un segundo

marcador en la muestra de sangre que se une a las células tumorales circulantes; detectar la presencia o la ausencia de un tercer marcador en la muestra de sangre que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células que no se ha determinado que sean células tumorales; detectar la presencia o la ausencia de un cuarto marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células tumorales circulantes en el que dicho cuarto marcador es antígeno 5T4 humano; y analizar la población de células detectada por los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto para identificar la célula tumoral circulante en la muestra de sangre antes del tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con después del tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco, en el que un cambio en la relación de las células tumorales circulantes positivas para 5T4 a las células tumorales circulantes negativas para 5T4 en la muestra de sangre después del tratamiento en comparación con la relación de las células tumorales circulantes positivas para 5T4 a negativas para 5T4 en la muestra de sangre antes del tratamiento puede indicar la eficacia del conjugado anticuerpo-fármaco para reducir las células tumorales circulantes positivas para 5T4, en el que dicho compuesto conjugado anticuerpo-fármaco es anti-5T4-A1-mcMMAF.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer positivo para 5T4, que comprende: analizar una muestra de sangre del sujeto, en el que la muestra de sangre comprende una población de células; colocar la muestra de sangre sobre un sustrato; detectar la presencia o la ausencia de células nucleadas usando un primer marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a células nucleadas en el que dicho primer marcador es DAPI; detectar la presencia o la ausencia de un segundo marcador en la muestra de sangre que se une a las células tumorales circulantes en el que dicho segundo marcador es citoqueratina; detectar la presencia o la ausencia de un tercer marcador en la muestra de sangre que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células que no se ha determinado que sean células tumorales, en el que dicho tercer marcador es CD45; detectar la presencia o la ausencia de un cuarto marcador en la muestra de sangre que se une selectivamente a las células tumorales circulantes en el que dicho cuarto marcador es antígeno 5T4 humano; y, analizar la población de células detectada por los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1a compara el intervalo de expresión de 5T4 utilizado en el cálculo de una puntuación H.

La Fig. 1b proporciona líneas celulares de calibración que representan los umbrales establecidos para la expresión baja, media y alta de 5T4 en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

La Fig. 2a muestra el gráfico de dispersión de la expresión de 5T4 para CTCs individuales y agrupaciones de CTC de muestras de pacientes con CPNM analizadas con el ensayo de diagnóstico de 5T4 de 4 colores, optimizado.

La Fig. 2b muestra los datos de 17 muestras de pacientes con CPNM analizadas con el ensayo diagnóstico de 5T4 de 4 colores optimizado y las puntuaciones H calculadas usando las líneas celulares de calibración.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la técnica a la que se pertenece la invención. Aunque en la práctica puede usarse cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para ensayar la presente invención, en la presente memoria se describen los materiales y los procedimientos preferidos. En la descripción y en las reivindicaciones de la presente invención, se usará la siguiente terminología.

5T4 se refiere al antígeno oncofetal 5T4, una glucoproteína transmembrana altamente glicosilada de 72 kDa que comprende un núcleo no glicosilado de 42 kDa (véase la patente US N° 5.869.053). El 5T4 humano se expresa en numerosos tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinomas de vejiga, de mama, de cervix, de colon, de endometrio, de riñón, de pulmón, de esófago, de ovario, de próstata, de páncreas, de piel, de estómago y de testículos. Se ha demostrado que las células altamente tumorígenas, denominadas también células madre cancerosas o células iniciadoras de tumores, tienen niveles elevados de expresión de 5T4 (documento WO2010/111659). Los anticuerpos anti-5T4 incluyen anticuerpos que se unen específicamente al antígeno 5T4 humano (véase la patente US N° 8.044.178).

"Monocapa biológica" se refiere a una muestra de sangre que puede existir en varios estados de separación o de purificación celular. Por ejemplo, la monocapa biológica puede purificarse parcialmente y puede contener células mononucleares y otras células después de que haya ocurrido la lisis de los glóbulos rojos.

"La clasificación de la población de células antes de montar la muestra en un sustrato" se refiere a la eliminación de un subconjunto de la población de células de la muestra, por ejemplo, la muestra de sangre. La clasificación puede ocurrir por lisis celular selectiva y centrifugación de una subfracción de células. La clasificación puede ocurrir también usando un marcador celular fluorescente y una clasificación de células activada por fluorescencia. La clasificación de células para un

marcador celular puede ocurrir como una selección positiva para células tumorales circulantes o como una selección negativa para eliminar células no tumorales.

El "sustrato" contiene la muestra de ensayo, por ejemplo, una muestra de sangre que contiene células montadas para su detección y análisis. En un aspecto, el sustrato puede ser plano. En un aspecto adicional, el sustrato puede tener cierta curvatura.

"Sujeto", "sujeto mamífero" o "paciente" se refiere a cualquier paciente o sujeto mamífero al que pueden aplicarse los procedimientos de la invención. "Mamífero" se refiere a pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales, tales como conejos, ratas, ratones y otros animales. En una realización ejemplar, de la presente divulgación, para identificar los pacientes sometidos a tratamiento según los procedimientos de la divulgación, se emplean procedimientos de cribado aceptados para determinar los factores de riesgo asociados con una enfermedad o afección objetivo o sospechada, por ejemplo, cáncer positivo para 5T4, o para determinar el estado de una enfermedad o afección existente en un sujeto. Estos procedimientos de cribado incluyen, por ejemplo, exámenes convencionales para determinar los factores de riesgo que pueden estar asociados con la enfermedad o la afección objetivo o sospechada. Estos y otros procedimientos de rutina permiten al médico seleccionar pacientes que necesitan terapia mediante el uso de los procedimientos y de las formulaciones de la divulgación.

"Muestra de sangre", "espécimen de sangre", "muestra de ensayo" y "muestra de sangre" se usan indistintamente y se definen como la cantidad de sangre extraída o tomada de un sujeto, generalmente mediante una estructura de punción venosa o de punción transcutánea de una vena con un estilete o cánula rígido afilado que transporta un catéter de plástico flexible o mediante una aguja de acero fijada a una jeringa o un catéter, para su uso en pruebas médicas que incluyen pruebas de diagnóstico.

"Cáncer", "tumor maligno", "tumor sólido" o "trastorno hiperproliferativo" se usan como términos sinónimos y se refieren a cualquiera de una serie de enfermedades que se caracterizan por una proliferación incontrolada, anormal, de células positivas para 5T4, la capacidad de las células positivas para 5T4 afectadas para diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y el sistema linfático a otras partes del cuerpo (es decir, se metastatizan), así como cualquiera de una serie de características estructurales y/o características moleculares.

Un "primer marcador", un "segundo marcador", un "tercer marcador" y un "cuarto marcador" identifican una célula tumoral circulante mediante una tinción citológica o mediante un marcador específico de la célula y se definen en las reivindicaciones. En la divulgación más amplia pueden preverse más marcadores. El primer marcador es una tinción citológica que incluye, pero que no se limita a, DAPI, tinción de Wright-Giemsa o tal como se divulga otras tinciones citológicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, B.F. Atkinson, Atlas of Diagnostic Cytopathology. 2ª edición, W.B. Saunders Company, Ed., 2003. Los marcadores segundo y tercero son marcadores específicos de célula que incluyen, pero que no se limitan a, marcadores para citoqueratina, CD45, y según la divulgación M30, receptor de quimiocinas, CXCR1, CXCR4, CD44, CD24, isoformas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), o factor de estabilidad de ARNm HuR. El cuarto marcador se refiere al antígeno 5T4.

Estos marcadores identifican diversos tipos de células, incluyendo células de origen hematopoyético, citoqueratinas en células epiteliales, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, CD44, receptor de superficie celular que reconoce ácido hialurónico, receptores de quimiocinas, tales como CXCR1 o CXCR4.

"Clasificación" en el contexto de células, tal como se usa en la presente memoria, se refiere tanto a la clasificación física de las células, tal como puede conseguirse usando, por ejemplo, un clasificador de células activadas por fluorescencia, así como al análisis de células basado en la expresión de marcadores de superficie celular, Por ejemplo, análisis FACS en ausencia de clasificación.

"Análisis de la población de células mediante detalle nuclear, contorno nuclear, presencia o ausencia de nucleolos, calidad del citoplasma o cantidad de citoplasma" y "análisis de la población de células mediante la medición de células intactas con una alta relación nuclear a citoplásmica, células intactas con una baja relación nuclear a citoplásmica, células apoptóticas tempranas o células apoptóticas tardías, e identificación de células tumorales circulantes" pueden ocurrir utilizando técnicas y procedimientos analíticos, tal como se describe en BF Atkinson, id.

La "gestión de la terapia contra el cáncer o la recuperación del cáncer" se refiere a las pruebas de diagnóstico in vivo o in vitro para determinar la etapa de progresión del cáncer o la efectividad de un tratamiento de terapia contra el cáncer particular.

"Células tumorales circulantes (CTC)" se refiere a células tumorales intactas o a grupos de células tumorales que son positivas para pan citoqueratina y negativas para CD45. Las CTCs incluyen también células que son positivas para 5T4 y negativas para CD45; células que son positivas tanto para pan citoqueratina como para 5T4 y negativas para CD45; y, células que son morfológicamente consistentes con células malignas. Anteriormente, se ha informado acerca de

procedimientos para categorizar y detectar las CTCs (documentos WO2011/028905, WO2011/050103 y US2009/0317836).

"Puntuación H" es una puntuación ponderada que suma los porcentajes de CTCs dentro de cada categoría (baja, media y alta) multiplicados por sus respectivos valores de categoría, generando una puntuación entre 0 y 300.

- 5 Existen varios procedimientos de detección de células tumorales circulantes conocidos en la técnica. El bajo nivel de concentración de células epiteliales malignas en las muestras de sangre, aproximadamente una de cada 10^6 a 10^7 células nucleadas totales, las hace difíciles de detectar. La detección y la enumeración de CTCs se ha intentado con varios procedimientos, que incluyen: PCR, citometría de flujo, enfoques inmunológicos basados en imágenes, técnicas inmunomagnéticas, técnicas microfluídicas y tecnología de microchip.
- 10 Por ejemplo, el sistema AdnaTest Breast Cancer® utiliza la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar células tumorales circulantes (AdnaGen AG, Langenhagen, Alemania; OncoVista, Inc., San Antonio, TX). La prueba presenta un procedimiento de enriquecimiento de CTC que utiliza una mezcla patentada de esferas inmunomagnéticas revestidas con uno de los tres anticuerpos contra antígenos de superficie epitelial. El número de CTCs se determina a continuación indirectamente mediante un procedimiento de RT-PCR semicuantitativo.
- 15 El CellSearch System™ (Veridex LLC, Warren, NJ) fue desarrollado con el propósito de detectar las CTCs en sangre entera. El sistema CellSearch implica una técnica de mezclado de una muestra de sangre con partículas de hierro revestidas con un anticuerpo que se adhiere a las células epiteliales. A continuación, las células epiteliales son distinguidas de los leucocitos por los anticuerpos que han sido marcados con un tinte fluorescente de manera que las células cancerosas puedan distinguirse y contarse fácilmente.
- 20 OncoQuick™ (Greiner Bio-One-, Inc. Longwood, FL) es otro sistema de ensayo que se ha desarrollado para detectar células tumorales circulantes. Este sistema es un sistema de gradiente de densidad mejorado que combina la centrifugación con gradiente de densidad y las técnicas basadas en el sistema inmunológico.
- Un procedimiento de enumeración del número de CTCs en una muestra de un paciente que comprende hacer fluir dicha muestra a través de un dispositivo microfluídico que enriquece de manera selectiva una o más células tumorales circulantes se describe en la solicitud de patente US N° 2010/0233693. El dispositivo microfluídico puede enriquecer una o más CTCs en base al tamaño, a la afinidad, a la deformabilidad o a la forma.
- 25 Un procedimiento de aislamiento y de análisis de las CTCs utilizando un dispositivo de micro-canales se describe en la solicitud de patente US N° 2010/0255479. Este procedimiento permite capturar objetivos biológicos de la solución marcando previamente o mezclando previamente una muestra que contiene una CTC con un compañero de enlace que se une específicamente a las células para mejorar la captura de la CTC en un dispositivo de micro-canales.
- 30 Cada uno de los procedimientos indicados anteriormente de detección de células tumorales circulantes requiere una etapa de enriquecimiento celular. Una característica distintiva de la presente invención es un ensayo sin enriquecimiento que demuestra la capacidad de identificar un número significativo de CTCs en una mayoría de los pacientes con cáncer positivo para 5T4.
- 35 Un aspecto de la presente invención se refiere en general a un procedimiento de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 (CTCs) en un sujeto mamífero o un procedimiento de diagnóstico de un cáncer positivo para 5T4 en estadio temprano en un sujeto mamífero. La presente invención se refiere además a un procedimiento de cribado de un compuesto candidato a fármaco en un sujeto mamífero para el tratamiento de un cáncer positivo para 5T4.
- 40 Se proporciona un procedimiento de detección de CTCs positivas para 5T4 en el sujeto mamífero que comprende obtener del mamífero sospechoso de tener cáncer, una muestra de sangre que comprende una población de células mixtas sospechosas de contener CTCs, montar las células sanguíneas y las CTCs en un sustrato para formar una monocapa biológica, detectar en la monocapa biológica un primer marcador que se une selectivamente a las células nucleadas, detectar en la monocapa biológica un segundo marcador que se une a las CTCs, detectar en la monocapa biológica un tercer marcador que se une a la población de células mixta o a un subconjunto de la población de células mixta, detectar en la monocapa biológica un cuarto marcador que se une selectivamente a las células positivas para 5T4, analizar la población de células detectada por los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto para identificar las CTCs; la presencia de las CTCs en la muestra de sangre que indica la presencia de cáncer positivo para 5T4 o cáncer positivo para 5T4 en estadio temprano en el sujeto mamífero. La presencia o la ausencia de las CTCs en la muestra de sangre puede indicar la presencia de un estado libre de enfermedad o un estado de enfermedad no medible en el sujeto mamífero.
- 45 El procedimiento proporciona un protocolo de unión celular para identificar células derivadas de epitelio dentro de una muestra de sangre, junto con un procedimiento de detección de CTCs positivas para 5T4 en la sangre de pacientes con cáncer. En este protocolo, los glóbulos blancos (GBs) vivos, por ejemplo, los leucocitos y otras células de la sangre se aíslan en un portaobjetos, por ejemplo, como una monocapa biológica. Los leucocitos incluyen, pero no se limitan a:
- 50

linfocitos T; monocitos, eosinófilos y neutrófilos, implicados en la fagocitosis; y basófilos implicados en la respuesta inflamatoria.

El procedimiento proporciona además el marcado fluorescente de los glóbulos blancos y las CTCs unidos en portaobjetos adhesivos revestidos especialmente. Las células se marcan de manera fluorescente con un primer marcador que se une selectivamente a las células nucleadas en el que dicho primer marcador es DAPI, un segundo marcador que se une a las células tumorales circulantes en el que dicho segundo marcador es citoqueratina (CK) un componente esencial de las CTCs, un tercer marcador que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células que no se ha determinado que sean células tumorales, dicho tercer marcador es CD45, y un cuarto marcador que se une selectivamente a las células tumorales circulantes en el que dicho cuarto marcador es el antígeno 5T4 humano. A continuación, el portaobjetos se escanea en busca de sitios de fluorescencia y se analiza con computación de alto rendimiento que utiliza algoritmos que ponderan los parámetros celulares detectados por los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes.

El procedimiento proporciona además procedimientos que utilizan microscopía fluorescente y el protocolo de unión celular para investigar la prevalencia de las CTCs en pacientes con cáncer positivo para 5T4. Una ventaja adicional del procedimiento permite a un patólogo reubicar y examinar las células de interés para la confirmación y la caracterización patológica. En la presente divulgación, el protocolo incluye además eliminar el cubreobjetos y/o solubilizar el medio de montaje soluble en agua en cada portaobjetos teñido fluorescentemente y volver a teñir las mismas células usando un segundo marcador de células, por ejemplo, una tinción de Wright-Giemsa estándar, para proporcionar información adicional acerca de la morfología, del tamaño y de la heterogeneidad de las CTCs. Las células raras individuales CK⁺ conocidas y las agrupaciones de células raras localizadas mediante cálculos de alto rendimiento y el protocolo de unión celular pueden evaluarse morfológicamente. Aunque las imágenes fluorescentes de las CTCs han ayudado a su identificación verificada, la tinción de Wright-Giemsa ha proporcionado información citológica adicional sobre las CTCs. En un aspecto adicional de la divulgación, el procedimiento puede usarse para evaluar diferentes marcadores celulares que son específicos para un estado de enfermedad, un tipo de célula o un estado de célula.

La capacidad de detectar y caracterizar las CTCs tiene el potencial de ayudar en el diagnóstico y en el tratamiento individualizado de pacientes con cáncer positivo para 5T4s. Debido a su rareza, se requieren procedimientos especiales para investigar las CTCs. La presente divulgación proporciona un enfoque de biopsia en fase fluida que permite el uso de procedimientos citopatológicos estándar para la caracterización morfológica detallada de las CTCs en la sangre obtenida de pacientes con cáncer y proporciona detalles de las características citológicas de un espectro de CTCs sin usar enriquecimiento basado en proteínas de superficie. Las células nucleadas recuperadas de la sangre entera se depositan en portaobjetos adhesivos, se marcan de manera inmunofluorescente y se analizan para detectar CTCs positivas para 5T4 mediante microscopía digital. La combinación de estas técnicas con los procedimientos de tinción de rutina permite la identificación y la evaluación de las CTCs mediante microscopía óptica. Usando procedimientos patológicos convencionales para observar las células, las CTCs exhiben un alto grado de pleomorfismo inter- e intra- pacientes en preparaciones de sangre entera, y las CTCs intactas se identifican con relaciones de relación nuclear a citoplásmica tanto altas como bajas junto con las CTCs que exhiben signos apoptóticos. Las observaciones morfológicas sugieren que el espectro completo de células presentes en los sitios de tumores primarios y metastásicos puede verse también circulando en la sangre, y además proporciona un posible marco de clasificación morfológica dentro del cual investigar las propiedades de los subconjuntos celulares implicados en la metástasis.

Microscopía Digital Automatizada. Las coordenadas de las células prospectivas se introducen al sistema de imágenes de eventos raros (REIS), un sistema de microscopía digital de escaneo completamente automatizado. Los componentes de hardware del REIS y el software de escaneo patentado se han descrito en detalle en otra parte (Krivacic et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 10501-10504, 2004).

Mediciones. Los objetos fluorescentes detectados se analizan con operaciones de filtro de software para diferenciar las células raras de los falsos positivos. Debido a que las celdas son generalmente más pequeñas que la resolución del punto láser (20 µm), el primer filtro pasa todos los objetos cuyo tamaño está por debajo de un umbral de tamaño (20 µm). Un segundo filtro analiza la relación entre las intensidades de la fluorescencia desde diferentes canales para eliminar los agregados de tintes homogéneos, un artefacto común de la tinción por inmunofluorescencia.

Una muestra puede prepararse como una monocapa biológica extrayendo una muestra de un fluido biológico que incluye, pero que no se limita a, sangre o partes de sangre de un sujeto. En un aspecto, la muestra es una monocapa de células. La muestra de fluido se trata con un material fluorescente, tal como, pero que no se limita a, un colorante marcador, que se une selectivamente a diferentes tipos de moléculas biológicas, que pueden estar en la superficie o en el interior de la célula, tales como proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas. En la técnica se conocen marcadores adecuados para marcar un número de diferentes tipos de células de interés clínico, incluyendo tipos de células cancerosas seleccionadas, células fetales u otras células apropiadas que deben considerarse. Pueden desarrollarse marcadores para muchas otras células, tales como las células cerebrales, las células hepáticas, así como células bacterianas, entre otras. El material emite una salida característica, tal como fluorescencia o fosforescencia, sensible a una irradiación de excitación

seleccionada, tal como la irradiación de una longitud de onda o espectro de luz seleccionados, irradiación de rayos X, irradiación de electrones, etc. La luminiscencia característica tiene típicamente una longitud de onda característica o un rango espectral de longitudes de onda. Aunque los tintes son el procedimiento de marcado predominante, existen otras técnicas que incluyen el uso de marcadores conocidos como puntos cuánticos y sondas de nano-partículas de ADN.

- 5 En la presente memoria, se divulga y se proporciona un procedimiento de obtención de una posición de una célula rara, por ejemplo, una célula tumoral circulante (CTC) positiva para 5T4 dentro de una monocapa biológica. véase, por ejemplo, la solicitud US N° 2004/0131241. Un portaobjetos que transporta al menos una célula rara y tiene marcas de retícula dispuestas en posiciones que forman un ángulo sustancialmente recto, es posicionado en un soporte de portaobjetos de un primer sistema de obtención de imágenes. Se define un primer espacio de coordenadas del sistema de obtención de imágenes y se designan las coordenadas de las marcas de retícula en el primer espacio de coordenadas. Se define un segundo espacio de coordenadas de un segundo sistema de obtención de imágenes, y se designan las coordenadas de las marcas de retícula en el segundo espacio de coordenadas. Usando las coordenadas designadas de las marcas de retícula del primer espacio de coordenadas, se calculan los parámetros de conversión de coordenadas. Posteriormente, se designan las coordenadas de al menos un objeto en el primer espacio de coordenadas, y las coordenadas del primer espacio de coordenadas del objeto se convierten a coordenadas únicas en un segundo espacio de coordenadas, usando los parámetros de conversión de coordenadas.

- Una vez localizada la célula rara o la CTC, puede retirarse el cubreobjetos de la monocapa biológica o los medios de montaje solubles en agua pueden solubilizarse en cada portaobjetos teñido con fluorescencia. Las mismas células pueden volverse a teñir usando un segundo marcador de células, por ejemplo, la tinción de Wright-Giemsa estándar para proporcionar información sobre la morfología, el tamaño y la heterogeneidad de la CTC. Las células raras individuales (CK⁺) positivas para citoqueratina conocidas y los grupos de células raras pueden situarse y evaluarse morfológicamente. Aunque las imágenes fluorescentes de las CTCs han ayudado a su identificación verificada, la tinción de Wright-Giemsa ha proporcionado información adicional acerca de las CTCs.

- Tal como se divulga, este procedimiento puede usarse para evaluar diferentes marcadores celulares que son específicos para una enfermedad, un estado de enfermedad, un tipo de célula o un estado celular. Los procedimientos de la presente invención ayudarán a la caracterización de las CTC. Permite una verificación de alta calidad de las CTCs a partir de sangre obtenida de pacientes con cáncer positivo para 5T4 sin enriquecimiento, y proporciona información acerca de la morfología y las características de las CTCs.

- La búsqueda de CTCs metastásicas raras sugiere que muchas CTCs son apoptóticas e incapaces de formar metástasis y estima que solo 1 célula cancerosa diseminada en 10.000 puede incluso establecer una metástasis. De esta manera, la detección, la clasificación morfológica y la caracterización molecular de estas células raras podrían ser el objetivo de terapias novedosas y dirigidas, demostrando la importancia clínica de las CTCs.

Tratamiento del cáncer

- Un procedimiento de tratamiento del cáncer es la inmunoterapia, en la que un anticuerpo específico para el antígeno 5T4 puede conjugarse con un fármaco adecuado, como un agente citotóxico o citostático, un agente inmunosupresor, un radioisótopo, una toxina, etc. El conjugado anticuerpo fármaco (ADC) puede usarse para administrar un medicamento a una célula tumoral positiva para 5T4 o a una célula cancerosa en un paciente. Los ADCs para el tratamiento de los cánceres positivo para 5T4s se han divulgado en la patente US N° 8.309.094. Los ejemplos de ADCs son 5T4-A1-mcMMAF, 5T4-A1-vcMMAE y 5T4-vc-MMAD, en el que 5T4-A1 es un anticuerpo humanizado que se une específicamente al antígeno 5T4 y MMAE, MMAE y MMAD son derivados de la auristatina. Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad anticancerígena.

Ensayo de diagnóstico

- Una realización de la presente invención se ilustra en la Figura 1a donde la cuantificación del antígeno 5T4 en las CTCs se usa para generar una 'Puntuación H' sumando los porcentajes de CTCs dentro de cada categoría multiplicados por sus valores de categoría respectivos, generando una puntuación entre 0 y 300. Tal como se muestra en la Figura 1b, el sistema de puntuación utiliza la expresión 5T4 determinada por el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado descrito en el Ejemplo 1 usando el panel de líneas celulares NSCLC seleccionadas en base a los niveles de expresión de 5T4. Estos niveles se confirmaron mediante experimentos de tinción inmunocitológica estándar (ICC). Estas líneas celulares representan niveles de expresión de 5T4 altos (líneas celulares MDA-MB-435 y NCI-H226), medios (líneas celulares NCI-H1975 y MDA-MB-361) y bajos (líneas celulares NCI-H522 y NCI-H2122). El nivel medio de expresión de 5T4 en cada una de estas líneas se usó para establecer los umbrales para la expresión alta, media y baja de 5T4 en este ensayo.

En otra realización de la presente invención, los pacientes con cáncer son cribados para la presencia de CTCs que expresan el antígeno 5T4 utilizando el ensayo de diagnóstico de 4 colores de 5T4 optimizado descrito en el Ejemplo 1. Este ensayo ayudará a determinar el nivel de expresión del antígeno 5T4 en las CTCs mediante la enumeración y la

caracterización de las CTCs, así como la determinación de una correlación entre la expresión de las CTCs de 5T4 diana y la expresión de 5T4 en el tumor primario. El gráfico de dispersión de la expresión de 5T4 mostrado en la Figura 2a corresponde tanto a CTCs individuales como a clústeres de CTCs calibrados por las líneas celulares de control. Ta como se muestra en la Figura 2b, 17 muestras de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se procesaron con el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado. De esta manera, el ensayo de 4 colores de 5T4 de la presente invención se usa para determinar una categoría de puntuación H que, a continuación, se usa en el cálculo de la puntuación H. Finalmente, el ensayo de diagnóstico que identifica las CTCs objetivo que expresan 5T4 se usará para identificar una población de pacientes con cáncer tratable y como un medio de monitorización de las CTCs en los pacientes con cáncer durante el tratamiento con un ADC, tal como 5T4-A1-mcMMAF.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de la Puntuación H como un sistema de puntuación preliminar para caracterizar 5T4 en las CTCs. Tal como se ha indicado anteriormente, la puntuación H es una puntuación ponderada que suma los porcentajes de CTCs dentro de cada categoría multiplicados por sus respectivos valores de categoría, generando una puntuación entre 0 y 300. Las CTCs se dividen en 4 categorías (0-3) en base a la expresión de 5T4 individual tal como se muestra en la Fig. 1a. Debe haber presentes un mínimo de 10 CTCs para poder calcular una puntuación H razonablemente útil.

Para los pacientes, las puntuaciones H se calcularán de dos maneras: (1) Puntuación H tradicional (THS): la intensidad promedio de 5T4 de cada evento (CTC individual o agrupación de CTCs) se cuenta como un único punto de datos; (2) Puntuación H ponderada por agrupación (CWHs): cada intensidad de 5T4 promedio de las CTCs (individual o dentro de una agrupación) se cuenta como un único punto de datos.

Un ejemplo de un cálculo de puntuación H que utiliza los valores para la categoría de puntuación H y el % de CTCs por categoría es el siguiente: Puntuación H Categoría 0 (1,5% de CTCs); Puntuación H Categoría 1 (15,0% de CTCs); Puntuación H Categoría 2 (68% de CTCs); Puntuación H Categoría 3 (15,5% de CTCs). $\text{Puntuación H} = (1,5 \times 0) + (15,0 \times 2) + (68,0 \times 2) + (15,5 \times 3) = 198$

A continuación, la puntuación H puede utilizarse para seleccionar la población de pacientes que tendría la mayor probabilidad de éxito para el tratamiento con un ADC, como 5T4-A1-mcMMAF u otros ADC específicos de 5T4. La Figura 2b proporciona el cálculo de la puntuación H para 14 de 17 pacientes con NSCLC que utilizan el ensayo de 4 colores de 5T4 de la presente invención.

En otras divulgaciones, se proporcionan procedimientos de tratamiento del cáncer, incluyendo la identificación de un paciente que tiene cáncer positivo para 5T4 mediante la identificación de CTCs positivas para 5T4 con el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado, la clasificación de dicho paciente mediante la determinación de una puntuación H y la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad efectiva de un ADC que se une específicamente a un cáncer positivo para 5T4. Además, el paciente es monitoreado a intervalos durante la terapia para detectar la presencia de CTCs positivas para 5T4 utilizando el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado. La detección de un número reducido de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en la muestra de sangre después del tratamiento con un ADC en comparación con el número de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en una muestra de sangre antes del tratamiento con el ADC puede indicar la efectividad del compuesto de conjugado anticuerpo fármaco en el tratamiento del cáncer positivo para 5T4 en el sujeto mamífero.

En otra realización, un análisis de la población de células utilizando el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes en las muestras de ensayo antes del tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con después del tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco, en el que un cambio en la relación de las células tumorales circulantes positivas para 5T4 a negativas para 5T4 en la muestra de sangre después del tratamiento en comparación con la relación de células tumorales circulantes positivas para 5T4 a negativas para 5T4 en una muestra de sangre antes del tratamiento puede indicar la eficacia del conjugado anticuerpo-fármaco en la reducción de las células tumorales circulantes positivas para 5T4.

En algunas divulgaciones, el procedimiento de tratamiento del cáncer incluye identificar a un paciente que tiene cáncer positivo para 5T4 identificando las CTCs positivas para 5T4 con el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado y administrar a dicho paciente una cantidad efectiva de un ADC que se une específicamente a un cáncer positivo para 5T4 en combinación con un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico es aquel con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea refractario. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es aquel con el que se ha encontrado que el tratamiento del cáncer es refractario. El ADC puede administrarse a un paciente que ha sido sometido también a un tratamiento, como una cirugía para el tratamiento del cáncer. En otra realización, el procedimiento adicional de tratamiento es la radioterapia. Además, el paciente es monitoreado a intervalos durante la terapia para detectar la presencia de CTCs positivas para 5T4 utilizando el ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado.

Etiqueta detectable

El marcador o grupo detectable particular usado en el ensayo puede ser detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. El tipo particular de marcador no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica de un anticuerpo al marcador celular en la célula o la célula tumoral circulante usada en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Dichos marcadores detectables han sido bien desarrollados en el campo de los ensayos o inmunoensayos y, en general, la mayoría de los marcadores útiles en dichos procedimientos pueden aplicarse a la presente invención. De esta manera, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen los tintes fluorescentes AlexaFluor® (Invitrogen), las perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabead.TM.), los tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, etc.), marcadores radioactivos, otros agentes de obtención de imágenes tales como microburbujas (para imágenes de ultrasonido), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores calorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador puede acoplarse directa o indirectamente al componente deseado del ensayo según procedimientos bien conocidos en la técnica. Tal como se ha indicado anteriormente, puede usarse una amplia variedad de marcadores, en el que la elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con el compuesto, de los requisitos de estabilidad, de la instrumentación disponible y de las disposiciones de eliminación.

Frecuentemente, los marcadores no radiactivos se unen mediante medios indirectos. Generalmente, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. A continuación, el ligando se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que es intrínsecamente detectable o que está unida covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Pueden usarse una serie de ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, puede usarse junto con los anti-ligandos naturales, marcados. De manera alternativa, cualquier compuesto hapténico o antigénico puede usarse en combinación con un anticuerpo.

Las moléculas pueden conjugarse también directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidoreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen los tintes fluorescentes AlexaFluor® (Invitrogen), fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazinedionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas de marcado o de producción de señales que pueden usarse, véase la patente US N° 4.391.904.

Los medios para detectar marcadores son bien conocidos por las personas expertas en la técnica. De esta manera, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica, como en la autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, puede detectarse excitando el fluorocromo con la luz de la longitud de onda adecuada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, por medio de una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos, tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores, etc. De manera similar, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores calorimétricos simples pueden detectarse simplemente observando el color asociado con el marcador.

Ejemplo 1**Ensayo de diagnóstico de 4 colores de 5T4 optimizado**

Se desarrolló un ensayo de 4 canales optimizado para la identificación de CTCs positivas para 5T4. Las CTCs se tiñeron con cuatro tinciones diferentes y se midieron en cuatro canales separados. Por ejemplo, las CTCs pueden tintarse con anti-CK-AlexaFluor®555 (rojo); anti-CD45-AlexaFluor 488® (verde); anti-5T4-AlexaFluor 660® (púrpura); y, los núcleos celulares se tincen de azul con DAPI. Debido a que los tintes fluorescentes AlexaFluor® (Invitrogen) están disponibles en muchos colores, hay disponibles combinaciones de tinción alternativas.

Pacientes y recogida de muestras de sangre.

Se recogieron muestras de pacientes con cáncer metastásico en tubos de sangre anticoagulados y se procesaron en 24 horas. Se extrajeron también muestras de sangre de los controles normales.

Procesamiento de las muestras de sangre para la detección de CTCs

Las muestras de sangre se sacudieron durante 5 minutos antes de realizar el recuento de glóbulos blancos (WBC) usando

el sistema Hemocue WBC (HemoCue, Suecia). En base al recuento de WBC, un volumen de sangre se sometió a lisis de eritrocitos (solución de cloruro de amonio). Después de la centrifugación, las células nucleadas se volvieron a suspender en PBS y se unieron como una monocapa en portaobjetos de vidrio realizados a medida. Los portaobjetos de vidrio tienen el mismo tamaño que los portaobjetos de microscopía estándar, pero tienen un revestimiento patentado que permite una retención máxima de células vivas. Cada portaobjetos contiene aproximadamente tres millones de células nucleadas; de esta manera, la cantidad de células colocadas en placas por portaobjetos dependía del recuento de glóbulos blancos de los pacientes.

Para la detección de CTCs en pacientes con cáncer para este estudio, se usaron cuatro portaobjetos como ensayo. Los portaobjetos restantes creados para cada paciente se almacenaron a -80°C para futuros experimentos. Se descongelaron cuatro portaobjetos de cada paciente, a continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con metanol frío y los sitios de unión no específicos se bloquearon con suero de cabra. Los portaobjetos se incubaron posteriormente con anticuerpo monoclonal anti-pan citoqueratina (Sigma) y tinte fluorescente CD45-Alexa (Serotec) durante 40 minutos a 37°C . Después de lavados con PBS, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón-tinte Fluorescente Alexa (Invitrogen) durante 20 minutos a 37°C . Después de los lavados con PBS, los portaobjetos se incubaron a continuación con un anticuerpo anti-5T4-tinte fluorescente Alexa durante 20 minutos a 37°C . Las células se contrastaron con DAPI durante 10 minutos y se montaron con un medio de montaje acuoso.

Obtención de imágenes y análisis técnico

Los cuatro portaobjetos de cada paciente se escanearon usando un microscopio de escaneo fluorescente realizado a medida que se desarrolló y optimizó para un escaneo rápido y fiable. Cada portaobjetos se escaneó completamente con un aumento de 10x en cuatro colores y produjo más de 6.900 imágenes. Las imágenes resultantes se pasaron a un algoritmo de análisis que identifica posibles CTCs candidatas en base a numerosas medidas, incluyendo la intensidad de citoqueratina, la intensidad de CD45, la intensidad de 5T4, así como la forma y el tamaño nuclear y citoplásmico. A continuación, un analista técnico revisó los posibles candidatos generados por el algoritmo y eliminó los candidatos que obviamente no son células, tales como los agregados de tintes.

Análisis e interpretación profesional.

Todas las posibles CTCs candidatas se presentaron a un hematopatólogo para su análisis e interpretación a través de un informe basado en la Web donde el hematopatólogo incluye o excluye cada célula candidata como CTC. Las células se clasificaron como CTCs si eran positivas para citoqueratina, positivas para 5T4, negativas para CD45, contenían un núcleo DAPI intacto sin cambios apoptóticos identificables (ampollas, aspecto degenerado) o una apariencia alterada, y eran morfológicamente diferentes de los glóbulos blancos circundantes. Las células deben tener un citoplasma que sea claramente circunferencial y en cuyo interior esté contenido todo el núcleo. El citoplasma puede mostrar cambios apoptóticos tales como ampollas y densidades irregulares o alteraciones leves en el límite citoplásmico periférico, pero no debe estar tan alterado que se cuestione su asociación con el núcleo. Las imágenes se presentaron como imágenes digitales, con capacidad de visualización de canales fluorescentes individuales, así como una imagen compuesta. Cada imagen de célula se anotó con datos estadísticos auxiliares con respecto al tamaño nuclear relativo, a las intensidades de fluorescencia y a las intensidades de fluorescencia comparativa. Cada candidato a CTC se presentó en un campo de visión con suficientes glóbulos blancos circundantes para permitir una comparación contextual entre las características citomorfológicas de la célula en cuestión frente a los glóbulos blancos de fondo.

Tinción de Wright-Giemsa. Los cubreobjetos se retiraron de los portaobjetos teñidos con fluorescencia y se enjuagaron en PBS. A continuación, el portaobjetos se inundó con tinción de Wright-Giemsa (Fisher Scientific, Kalamazoo, Michigan) durante 3 minutos. Se añadieron 1,5 ml de tampón fosfato pH 6,8 (Fisher Scientific, Kalamazoo, Michigan) al portaobjetos revestido de tinción y la tinción y el tampón se mezclaron juntos sacudiéndolos suavemente durante 1 minuto. A continuación, la mezcla se dejó reposar en el portaobjetos durante 2 minutos más antes de enjuagar con agua desionizada y permitir que se seque al aire.

Las etapas utilizadas en el procedimiento de identificación y de caracterización de CTCs del ensayo de 4 colores de 5T4 optimizado son: (1) preparar los portaobjetos; (2) almacenar los portaobjetos; (3) descongelar y teñir los portaobjetos; (4) escanear los portaobjetos; (5) ejecutar algoritmos; y, (6) análisis e informes técnicos.

El ensayo CTC se desarrolló específicamente teniendo en cuenta el entorno clínico, así como la necesidad de innovación tecnológica temprana y la automatización futura. Todos los procedimientos de laboratorio siguen estrictos procedimientos operativos estándar que se han optimizado, probado y validado. La recogida de datos y la identificación de candidatos se han automatizado mediante interfaces específicas que permiten la toma de decisiones por parte del patólogo y el seguimiento subsiguiente de estas decisiones.

Este sistema promete permitir una nueva investigación en la clasificación morfológica y la caracterización molecular de las CTCs, así como aplicaciones para el cribado en el punto de atención, la monitorización y la gestión de pacientes con cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer positivo para 5T4, que comprende:

- 5 analizar una muestra de sangre del sujeto mamífero, en el que la muestra de sangre comprende una población de células;
 - montar la muestra de sangre sobre un sustrato;
 - detectar la presencia o la ausencia de células nucleadas utilizando un primer marcador en la muestra de sangre; en el que el primer marcador es DAPI;
 - 10 detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un segundo marcador en una célula en la muestra de sangre, en el que el segundo marcador es citoqueratina;
 - detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un tercer marcador en la muestra de sangre, en el que el tercer marcador es CD45;
 - detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un cuarto marcador en la muestra de sangre, en el que el cuarto marcador es antígeno 5T4 humano; y,
 - 15 analizar los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto en la población de células para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de la presencia de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en la muestra de sangre indica la presencia de cáncer positivo para 5T4 en etapa temprana en el sujeto mamífero.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de la ausencia de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en la muestra de sangre indica un estado libre de enfermedad o un estado de enfermedad no medible en el sujeto mamífero, en el que la enfermedad es cáncer positivo para 5T4.
 - 25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de la presencia o la ausencia de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en la muestra de sangre indica la gestión de la terapia durante la terapia contra el cáncer positivo para 5T4 o la recuperación del cáncer.
 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el sustrato
 - (a) es un sustrato plano,
 - (b) es un dispositivo microfluídico,
 - (c) es un cartucho que contiene una población de células enriquecida, o
 - 30 (d) comprende la muestra como una monocapa biológica.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer marcador, el segundo marcador, el tercer marcador o el cuarto marcador se detectan usando fluorescencia.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer marcador se usa para analizar la población de células mediante detalle nucleare, contorno nuclear, presencia o ausencia de nucleolos, calidad del citoplasma o cantidad de citoplasma.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende además analizar la población de células mediante la medición de células intactas con una alta relación nuclear a citoplásmica, células intactas con una baja relación nuclear a citoplásmica, células apoptóticas tempranas o células apoptóticas tardías, e identificar las células tumorales circulantes y los grupos de células tumorales circulantes.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además una tinción citológica para identificar la célula tumoral circulante por mediante la morfología, el tamaño o la relación nuclear a citoplásmica, en el que la tinción citológica es la tinción de Wright-Giemsa.
- 45 10. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además analizar la población de células mediante la unión de las células al sustrato, escanear la población de células en el sustrato y obtener imágenes de las células mediante microscopía digital usando reubicación.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la detección de la presencia de células tumorales circulantes positivas para 5T4 en la muestra de sangre indica la presencia de cáncer 54 positivo en el sujeto mamífero, opcionalmente, en el que el cáncer positivo para 5T4 se selecciona de entre el grupo que consiste en carcinomas de vejiga, mama, cérvix, colon, endometrio, riñón, pulmón, esófago, ovario, próstata, páncreas, piel, estómago y testículos.

5 12. Procedimiento de diagnóstico de cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer positivo para 5T4, que comprende:

analizar una muestra de sangre del sujeto mamífero, en el que la muestra de sangre comprende una población de células;

montar la muestra de sangre sobre un sustrato;

10 detectar la presencia o la ausencia de células nucleadas usando un primer marcador en la muestra de sangre; en el que el primer marcador es DAPI;

detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un segundo marcador en una célula en la muestra de sangre; en el que el segundo marcador es citoqueratina; detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un tercer marcador en una célula en la muestra de sangre; en el que el tercer marcador es CD45; detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un cuarto marcador en una célula en la muestra de sangre, en el que el cuarto marcador es el antígeno 5T4 humano, y

15 analizar y cuantificar los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto en la población de células para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes, opcionalmente, en el que la cuantificación del antígeno 5T4 humano en las células tumorales circulantes se usa para generar una puntuación H, en el que la puntuación H se usa para seleccionar una población de pacientes con cáncer positivo para 5T4.

13. Procedimiento de cribado de la actividad o la eficacia de un conjugado de anticuerpo-fármaco para el tratamiento del cáncer positivo para 5T4 en un sujeto mamífero sospechoso de tener cáncer, que comprende:

analizar una muestra de sangre del sujeto mamífero al que se ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado anticuerpo-fármaco, en el que la muestra de sangre comprende una población de células;

25 montar la muestra de sangre sobre un sustrato;

detectar la presencia o la ausencia de células nucleadas usando un primer marcador en la muestra de sangre; en el que el primer marcador es DAPI;

detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un segundo marcador en una célula en la muestra de sangre; en el que el segundo marcador es citoqueratina;

30 detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un tercer marcador en una célula en la muestra de sangre; en el que el tercer marcador es CD45;

detectar la presencia o la ausencia de la expresión de un cuarto marcador en una célula en la muestra de sangre; en el que el cuarto marcador es el antígeno 5T4 humano; y,

35 analizar los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto en la población de células para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes en la muestra de sangre antes del tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco en comparación con después del tratamiento con el conjugado anticuerpo-fármaco,

en el que un cambio en la relación de las células tumorales circulantes positivas para 5T4 a las células tumorales circulantes negativas para 5T4 en la muestra de sangre después del tratamiento en comparación con la relación de las células tumorales circulantes positivas para 5T4 a las células tumorales circulantes negativas para 5T4 en la muestra de sangre antes del tratamiento puede indicar la eficacia del conjugado anticuerpo-fármaco en la reducción de células tumorales circulantes positivas para 5T4, opcionalmente en el que el conjugado anticuerpo-fármaco es anti-5T4-A1-mcMMAF.

40 14. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además cuantificar los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto en la población de células para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes.

45 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el análisis y la cuantificación de los marcadores primero, segundo, tercero y cuarto en la población de células se utilizan para determinar la inclusión o la exclusión de sujetos mamíferos para el tratamiento de cáncer positivo para 5T4.

16. Procedimiento según la reivindicación 12, que comprende además la cuantificación del antígeno 5T4 humano en las

células tumorales circulantes para generar una puntuación H, en el que la puntuación H se usa para seleccionar una población de pacientes con cáncer positivo para 5T4.

- 5 17. Procedimiento según la reivindicación 1, 12, 13, 14 o 15, en el que la detección de la presencia del primer marcador, la presencia del segundo marcador, la ausencia del tercer marcador y la presencia del cuarto marcador indica la presencia de células tumorales circulantes positivas para 5T4.

FIG. 1A

Expresión 5T4	Nula	Baja	Media	Alta
Categoría Puntuación H	0	1	2	3
Intervalo de expresión de 5T4 Epic	<3	3-8	8-20	>20

FIG. 1B

Línea celular	Puntuación-H
MDA-MB-435	290
NCI-H226	246
NCI-H1975	197
MDA-MB-361	137
NCI-H522	103
NCI-H2122	83

FIG. 2A

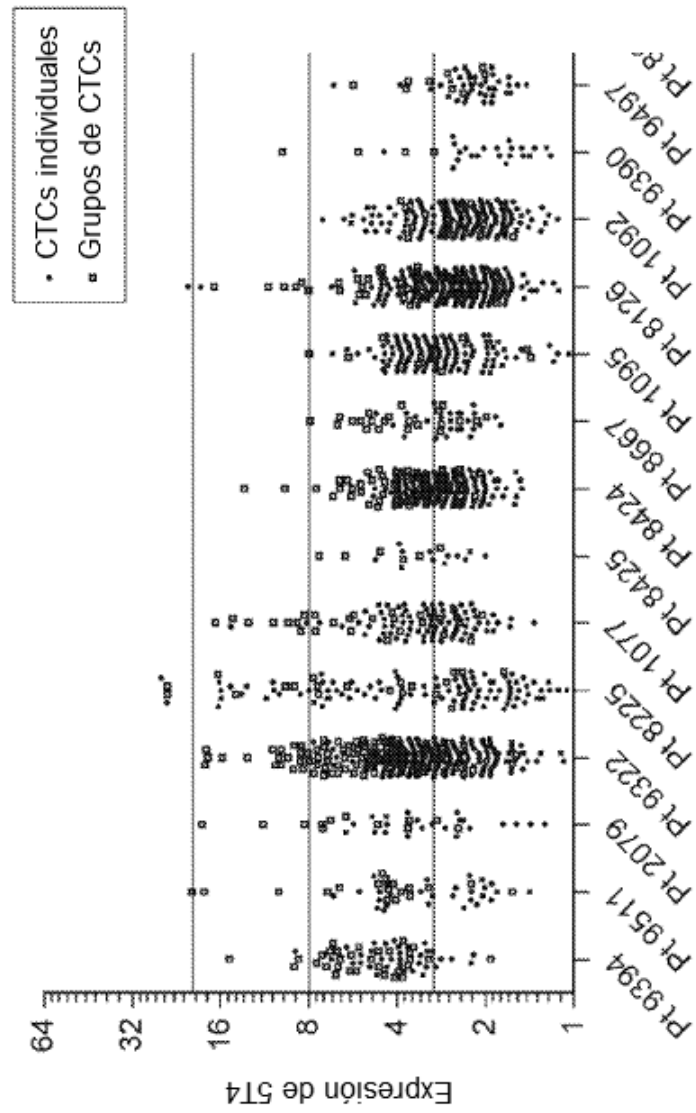


FIG. 2B

Nº de paciente	Puntuación H
9322	69
1077	67
8225	68
8126	35
9394	97
9511	74
8424	47
1095	47
2079	74
8776	n/a
9497	15
1092	27
9390	19
9689	n/a
8667	47
8661	n/a
8425	61