

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 485**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/US2012/031338**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135560**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12716825 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2694971**

54 Título: **Ensayos de receptores esteroideos para la detección de células tumorales**

30 Prioridad:

01.04.2011 US 201161470618 P
28.03.2012 US 201213432248

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2020

73 Titular/es:

MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via G. di Vittorio, 21 B/3
40013 Castel Maggiore (BO), IT

72 Inventor/es:

CHIANESE, DAVID, A.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 793 485 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

Ensayos de receptores esteroideos para la detección de células tumorales

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a los campos de la oncología y pruebas de diagnóstico, y más particularmente a métodos para el cribado del cáncer y para la predicción y el seguimiento de la respuesta al tratamiento de quimioterapia, recurrencia de cáncer o similares.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se estima que hay al menos varios cientos de miles de casos nuevos de cáncer de mama cada año. Estos casos se confirman actualmente por medios quirúrgicos, como la extracción del tumor o el tejido de mastectomía que secciona dicho tejido en bloques de parafina y utiliza métodos inmunohistoquímicos para evaluar la presencia de proteínas receptoras de esteroideos en dicho tejido. Debido al procedimiento quirúrgico, dichos métodos no se utilizan para controlar la progresión del estado de la enfermedad durante el curso del tratamiento. A lo largo de los años, estos métodos se han mejorado para que se puedan evaluar las diferentes características del tejido, como el receptor de progesterona y el estado de HER/2-neu, así como para confirmar la presencia de epítomos del receptor de estrógenos. Pero en todos los casos esta evaluación requiere un procedimiento quirúrgico. Además, en los casos de pacientes cuyo tejido mamario se extrajo temprano en su tratamiento, estos métodos simplemente no están disponibles.

[0003] Las células tumorales circulantes ("CTC") están presentes en la sangre de pacientes con cáncer de mama metastásico y se pueden recolectar durante el tratamiento de un paciente.

25

[0004] Estas células pueden analizarse para determinar su estado HER/2-neu. Hayes y col. describe un método para analizar las células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de mama avanzado mediante la cuantificación de la expresión de HER-2 en CTC (Monitorización de la expresión de HER-2 en células epiteliales circulantes en pacientes con cáncer de mama avanzado, International Journal of ONCO, (2002) 21:1111-1117). Alternativamente, como se describe en el documento WO 2007/121459, se usa un inmunoensayo para detectar la expresión de un receptor de esteroideos a partir de extractos de células de carcinoma aisladas. Sin embargo, hasta la fecha, no existen métodos para determinar la presencia de epítomos de las regiones terminales N y C del receptor de estrógenos de tales CTC. Estos métodos se encuentran en la siguiente invención.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0005] Figura 1 Imágenes de muestras de pacientes que muestran CTC positivo para receptor de estrógeno α

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0006] La invención incluye un método para la caracterización de células tumorales circulantes en una muestra biológica de un paciente con cáncer de mama metastásico, que comprende los pasos de:

- 45 a) poner en contacto la muestra biológica con una proteína que se une a los marcadores de la superficie celular de las células tumorales circulantes y reacciona específicamente con las células tumorales circulantes, hasta la exclusión sustancial de otros componentes de la muestra, y permite la separación de dicho tumor circulante unido células de otros componentes de la muestra biológica;
- 50 b) poner en contacto la muestra del paso (a) con al menos un reactivo que se une específicamente a la muestra del paso (a), en donde el reactivo es una sustancia que distingue entre diferentes tipos de células;
- c) poner en contacto la muestra de la etapa (b) con un agente que tiene afinidad de unión por receptores de esteroideos en las células; y
- d) analizar la muestra para determinar la presencia de células tumorales que expresan los receptores de esteroideos circulantes;

55 en donde dicho método comprende además el paso de determinar el número de células tumorales circulantes que expresan los receptores de esteroideos.

[0007] Como se usa en el presente documento, el término muestras biológicas incluye pero no se limita a la sangre completa, orina, suero, plasma, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, fluidos de lavado y la médula ósea. Las muestras biológicas preferidas son sangre completa, orina, plasma, esputo y médula ósea, más preferiblemente, sangre completa, orina, plasma, esputo, más preferiblemente sangre completa.

[0008] El término "ligando" se refiere a proteínas que se unen marcadores de superficie celular de CTC, que incluyen pero no se limitan a moléculas de adhesión tales como E cadherina, N cadherina, así como anticuerpos monoclonales para EpCAM, y similares. Los ligandos preferidos incluyen anticuerpos EpCAM. Además, el ligando puede comprender "partículas magnéticamente sensibles". Las partículas magnéticamente sensibles son sustancias que facilitan la

65

separación magnética. Típicamente, tales partículas son composiciones metálicas u organometálicas. Pueden estar opcionalmente recubiertas con un polímero, preferiblemente un polímero de origen biológico tal como BSA. Los complejos del ligando y las partículas que responden magnéticamente pueden unirse a marcadores detectables que incluyen, entre otros, marcadores fluorescentes. Una descripción más detallada de partículas magnéticamente sensibles se encuentra en la Patente de EE.UU. N° 5.985.153, titulada "aparato de separación magnética y métodos que emplean un gradiente de captura magnético interno y una fuerza de transporte externa".

[0009] El término "otros componentes de muestra" se refiere a componentes de las muestras biológicas distintas de las células tumorales circulantes. Tales componentes incluyen pero no se limitan a las células blancas de la sangre, los glóbulos rojos normales, leucocitos, células endoteliales, las células no nucleadas y similares.

[0010] El término "reactivo" se refiere a una sustancia que distingue entre los distintos tipos de células. Los ejemplos de reactivos incluyen, entre otros, colorantes como DAPI, bromuro de etidio y naranja de acridina y sondas como CD 45, CD41, PAC-1, CD4, CD8 CD56, CD146, CD34, CD38, citoqueratina y similares.

[0011] El término "agente" se refiere a anticuerpos contra regiones particulares del receptor de esteroides. Si se analizan muestras biológicas para CTC de una paciente con cáncer de mama con estrógenos positivos, anticuerpos contra el N-terminal y se utilizan regiones C-terminales del receptor de estrógenos. Los anticuerpos para la región N-terminal incluyen, pero sin limitación, ID5, CF11, E115 (rb mono), SP-1 (rb mono), ER119.3 y similares. Los anticuerpos preferidos de la región N-terminal son ID5 y E115 (rb mono). Los anticuerpos para la región C-terminal incluyen, pero no se limitan a H222, F10, TE111.5D11. Los anticuerpos preferidos para la región C-terminal H222. Ver M. Pavao et al. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in the detection, localization, and analyses of estrogen receptor α and β ; Steroids 66 (2001) 1-16 para otros anticuerpos monoclonales que son útiles en esta invención.

[0012] El término "receptores de esteroides" tiene su significado habitual. Los receptores de esteroides preferidos son los receptores de progesterona, testosterona y estrógenos. Los receptores de esteroides particularmente preferidos son todos los subtipos del receptor de estrógeno, particularmente el receptor de estrógeno α .

[0013] A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos normales en la técnica.

[0014] El aislamiento de las células tumorales circulantes de la sangre periférica por captura inmunomagnética con partículas magnéticas es un proceso de múltiples etapas que comienza con la estabilización y la anticoagulación de la muestra de sangre. A continuación, se realiza la captura magnética inmune y el aislamiento de las células diana con una partícula ferromagnética conjugada con un anticuerpo monoclonal epitelial específico. El marcado fluorescente de las células diana y/u otros marcadores de caracterización con tintes y anticuerpos conjugados con tintes fluorescentes específicos para la célula de evento raro diana y los antígenos importantes para la biología de las células se utilizan para identificar y caracterizar las poblaciones celulares. Finalmente, las células se visualizan por localización magnética en un cartucho con una ventana adecuada para la identificación y análisis de eventos raros por microscopía fluorescente, con un software que mide las señales fluorescentes generadas por el análisis microscópico de las células diana de eventos raros.

[0015] Además, la invención incluye el uso de una prueba de kit para el cribado de una muestra del paciente para la presencia de células tumorales que expresan un receptor de esteroides mediante la circulación de la realización del procedimiento de la invención, que comprende el kit de la prueba:

- a) un ligando que reacciona específicamente con células tumorales circulantes, con exclusión sustancial de otros componentes de la muestra, y permite la separación de tales células tumorales circulantes unidas de otros componentes de la muestra del paciente;
- b) al menos un reactivo que se une específicamente a una o ambas células tumorales circulantes y otros componentes de muestra de la muestra del paciente, en donde el reactivo es una sustancia que diferencia entre diferentes tipos de células; y
- c) un agente que tiene afinidad de unión por los receptores de esteroides en las células tumorales circulantes de la muestra del paciente.

Para que esta invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLO

[0016] La anticoagulación y conservación de muestras de sangre: el tubo CellSave® disponible comercialmente se utilizó para las muestras de sangre de cobro revertido para esta determinación. Este tubo contiene EDTA de sodio, un anticoagulante y agentes conservantes de la sangre que estabilizan las células diana en la muestra mejorando la capacidad del ensayo para detectar células tumorales circulantes intactas. Este tubo de recolección facilita el envío de muestras a laboratorios distantes para su análisis al estabilizar las células a temperatura ambiente durante períodos

de hasta 96 horas. Los informes publicados detallan la importancia del uso de un conservante para prevenir la fragmentación de las células tumorales circulantes observadas en la sangre periférica de pacientes con cánceres de tejido sólido como el adenocarcinoma de mama. Estos métodos de preservación también son compatibles con la detección de la proteína receptora de estrógenos en estas células de eventos raros.

[0017] Captura ferromagnética de células diana: Ferrofluido unido con un clon VU-1D9 de anticuerpo anti-EpCAM fue utilizado como parte del kit disponible en el mercado de la célula epitelial CellSearch® para localizar células tumorales circulantes de sangre periférica. Este kit enriquece las células de eventos raros de tan solo cinco células en una muestra de sangre de 7,5 mililitros que contiene aproximadamente 30.000.000 a 50.000.000 de células sanguíneas nucleadas a un volumen de trabajo de menos de 0,5 mililitros con aproximadamente 2.000 a 3.000 leucocitos, y un enriquecimiento de células diana resultante de más de 15.000 veces. Este volumen reducido permite la tinción con reactivos fluorescentes para identificar y caracterizar las células de eventos raros capturados.

[0018] La tinción de células capturadas: La configuración de kit CellSearch® estándar contiene un reactivo basado en saponina para permeabilizar las células y las membranas nucleares de células intactas, permitiendo que el etiquetado de proteínas intra-celulares y nucleares. El colorante 4'6'diamidinofenilindol se usa como un par de bases AT, colorante específico de ADN que fluoresce en el rango UV cuando se une a los núcleos celulares. El sistema lo utiliza para identificar las células nucleadas presentes en la muestra aislada. Los anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina conjugados con colorantes fluorescentes como la ficoeritrina o fluoresceína se usan como marcadores específicos epiteliales para identificar las células tumorales de eventos raros en una población de elementos sanguíneos. Se usó un conjugado fluorescente específico para CD45, un antígeno común leucocitario, para excluir del análisis los glóbulos blancos contaminantes.

[0019] Reactivos específicos de receptor de estrógeno: anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles de las regiones tanto N-terminal como C-terminal del receptor de estrógenos alfa fueron obtenidos y conjugados con ficoeritrina y se titularon contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 cultivada en condiciones de cultivo agotadas en estrógenos. Se demostró que los clones de anticuerpos H222, SP-1, 1D5 y E115 funcionan tanto en el sistema modelo de células MCF-7 enriquecidas en muestras de sangre de donantes normales. También se demostró que estos clones eran positivos en muestras de pacientes con cánceres de mama avanzados, según se determina en el sistema CellSearch®.

[0020] Análisis: Todas las muestras de donantes y pacientes se analizaron en el CellTracks® Analyzer II, un sistema de imagen automatizado que escanea las células localizadas en una cámara de análisis como se describe en la Pat. de EE.UU. 7.011.794, que se incorpora por referencia en su totalidad. Las imágenes se procesaron y las imágenes de células tumorales circulantes candidatas se presentaron para la evaluación del operador. Se determinó que todas las células eran positivas para DAPI y citoqueratina, así como negativas para CD45. Las células identificadas como células tumorales circulantes se puntuaron como positivas o negativas para el receptor de estrógenos u otro receptor de esteroides, dependiendo de los reactivos utilizados. La localización nuclear de la señal fluorescente se utilizó como criterio morfológico, coincidiendo con el análisis utilizado en inmunohistoquímica en secciones de parafina. Todos los anticuerpos comerciales específicos para el receptor de estrógeno alfa evaluados en el sistema modelo mostraron ser reactivos en muestras de pacientes. Se evaluó una serie de pacientes con cáncer de mama con el monoclonal de conejo E115 (Epitomics Inc.) conjugado con ficoeritrina, así como un marcador tumoral monoclonal conjugado con fluoresceína a HER/2-neu, según lo definido por el anticuerpo monoclonal Her-81 de la Universidad de Texas. Se realizaron diez muestras con sangre de donante enriquecida con células MCF-7 como control de ensayo. Las muestras de control fueron todas positivas para CTC, con un promedio de 78% +/- 16% de las células enriquecidas positivas para el receptor de estrógenos. Los datos de pacientes con cáncer de mama se resumen en la tabla 1. La Figura 1 es una galería de imágenes CTC típicas del CellTracks Analyzer II® obtenidas de muestras de pacientes.

Tabla 1. Resumen de una serie piloto de pacientes con cáncer de mama

Serie de Cáncer de Mama n=28	
9 pacientes positivos para CTC	32%
6 de 9 muestras ER pos	67%
3 de 9 HER2 pos	33%
3 de 9 ER / HER2 Positivas duales	33%

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para caracterizar las células tumorales circulantes en una muestra biológica obtenida de una paciente con cáncer de mama metastásico, que comprende los pasos de:
- 10 a) poner en contacto la muestra biológica con una proteína que une los marcadores de la superficie celular de las células tumorales circulantes y reacciona específicamente con células tumorales circulantes, con exclusión sustancial de otros componentes de la muestra, y permite la separación de tales células tumorales circulantes unidas de otros componentes de la muestra biológica;
- 15 b) poner en contacto la muestra del paso (a) con al menos un reactivo que se une específicamente a la muestra del paso (a), en donde el reactivo es una sustancia que diferencia entre diferentes tipos de células;
- c) poner en contacto la muestra del paso (b) con un agente que tiene afinidad de unión por receptores de esteroides en las células; y
- d) analizar la muestra para determinar la presencia de células tumorales que expresan los receptores de esteroides circulantes; en donde dicho método comprende además el paso de determinar el número de células tumorales circulantes que expresan los receptores de esteroides.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es sangre o médula ósea.
- 20 **3.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente que reacciona específicamente con las células tumorales circulantes se une a una o ambas regiones N-terminal y C-terminal de dichos receptores de esteroides en dichas células tumorales circulantes.
- 25 **4.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho reactivo es DAPI o el reactivo se une a la citoqueratina o CD45.
- 5.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína se une específicamente a un epítipo de adhesión de células epiteliales en la célula tumoral.
- 30 **6.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la proteína además comprende partículas magnéticamente sensibles.
- 35 **7.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la muestra en el paso (d) se analiza mediante al menos un proceso seleccionado del grupo que consiste en citometría de flujo multiparamétrica, microscopía inmunofluorescente, citometría de escaneo láser, análisis de imagen de base de campo brillante, análisis espectral de imágenes, análisis celular manual, análisis automatizado del sistema de imágenes y análisis celular automatizado.
- 8.** El método de la reivindicación 6 que comprende además someter el producto del paso (a) a un campo magnético.
- 40 **9.** El método de la reivindicación 6, en donde las partículas magnéticamente sensibles son coloidales.
- 10.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente es un anticuerpo anti-receptor de estrógenos contra la región N-terminal del receptor de estrógenos y el anticuerpo anti-receptor de estrógenos se selecciona del grupo que consiste en ID5, E115 (rb mono), ER119.3 y SP-1 (rb mono).
- 45 **11.** El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el agente es un anticuerpo anti-receptor de estrógenos contra la región C-terminal del receptor de estrógenos y el anticuerpo anti-receptor de estrógenos se selecciona del grupo que consiste en H222, F10 y TE111.5D11.
- 50 **12.** Uso de un kit de prueba para examinar una muestra de paciente para detectar la presencia de células tumorales circulantes que expresan un receptor de esteroides mediante la realización del método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, comprendiendo el kit de prueba:
- 55 a) una proteína que une los marcadores de la superficie celular de las células tumorales circulantes y reacciona específicamente con las células tumorales circulantes, con exclusión sustancial de otros componentes de la muestra, y permite la separación de dichas células tumorales circulantes unidas de otros componentes de la muestra del paciente;
- 60 b) al menos un reactivo que se une específicamente a una o ambas células tumorales circulantes y otros componentes de muestra de la muestra del paciente, en donde el reactivo es una sustancia que diferencia entre diferentes tipos de células; y
- c) un agente que tiene afinidad de unión por los receptores de esteroides en las células tumorales circulantes de la muestra del paciente.
- 65

FIG. 1

