(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 268 387**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **03743923 .9**
(86) Fecha de presentación : **13.03.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1506407**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

(54) Título: **Procedimiento de detección y de cuantificación de células tumorales circulantes, procedentes de cánceres sólidos.**

(30) Prioridad: **13.03.2002 FR 02 03136**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

(73) Titular/es: **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69282 Marcy-L'Etoile, FR
Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier,
Laboratoire de Virologie de l'Hopital Lapeyronie

(72) Inventor/es: **Vendrell, Jean-Pierre;**
Panabieres, Catherine;
Choquet-Kastylevsky, Geneviève y
Jolivet, Michel

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección y de cuantificación de células tumorales circulantes, procedentes de cánceres sólidos.

La presente invención, se refiere al sector del diagnóstico biológico, en cancerología. De una forma más particular, la presente invención, tiene por objeto un procedimiento para la detección y/o cuantificación de células tumorales circulantes, capaces de secretar *in vitro*, uno o varios marcadores tumorales, así como a la utilización de este procedimiento, en el diagnóstico precoz y el pronóstico de la patología, en la selección de tratamientos terapéuticos y la evaluación de su eficacia, así como en el diagnóstico de las recaídas, en el ámbito de los cánceres sólidos.

El diagnóstico actual de los cánceres, consiste en un diagnóstico clínico, tal como la palpación mamaria, en el caso del cáncer de mama, y/o en un examen paraclínico, tal como la mamografía, la exploración mediante "scanner", efectuándose, la confirmación, mediante un análisis histológico, tal como la biopsia o la intervención quirúrgica.

El diagnóstico clínico o paraclínico precoz del cáncer, es difícil, especialmente, debido al hecho de la falta de accesibilidad de las zonas cancerosas. Como consecuencia de ello, numerosos tumores, no se ponen en evidencia, de una forma general, más que de una forma tardía.

Se encuentra el mismo problema, cuando las zonas son anatómicamente accesibles. Así, por ejemplo, en el caso del cáncer de mama, cuando un tumor se detecta, durante el transcurso de una mamografía, éste tiene a menudo una evolución infraclínica de 8 años, como media.

En el momento actual, no existen procedimientos, o sólo existen pocos, de diagnóstico biológico, que permitan, ellos solos, el diagnóstico del cáncer.

Los procedimientos de diagnóstico biológico actualmente desarrollados, permiten seguir la evolución de un cáncer ya diagnosticado o de diagnosticar precozmente una recidiva, por ejemplo, mediante dosificación de ciertos marcadores tumorales. Así, de este modo, se dosifican marcadores séricos u orinarios, mediante técnicas bien conocidas por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica.

Como contrapartida, la detección de las células tumorales circundantes, se encuentra poco explorada, y no existe un test de ensayo de rutina.

La posibilidad de detectar células tumorales circulantes, ha sido ya estudiada, principalmente, mediante dos procedimientos de diagnóstico, los cuales son la citometría de flujo y la reacción del polimerización en cadena (PCR), acoplada a la retrotranscriptasa-PCR (RT-PCR)(Racila E., Euhus D., Weiss A., Rao C., McConnell J., Terstappen L., Uhr J. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood, -Detección y caracterización de células de carcinomas en la sangre-. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4589-4594 (1998), Ghossein R., Bhattacharya S., Rosai J. Molecular detection of micrometastase and circulatig tumor cells in solid tumors, -Detección molecular de micrometástasis y células tumorales circulantes en tumores sólidos-. Clin. Cancer 5, 1950-1960 (1999) y Moss, T. J., 1991, N. Engl. J. Med. 324, 219-226). Estos dos procedimientos, han permitido detectar, en los pacientes afectados de cáncer de mama y de próstata, células circulantes tumorales, en las células de la sangre o de la médula ósea.

No obstante, estos dos procedimientos, presentan algunos inconvenientes. De una forma particular, ninguno de estos procedimientos, permite cuantificar las células raras circulantes, procedentes de un tumor sólido. Además, es posible obtener falsos positivos, con la PCR, de tal forma que, a esta técnica, le falta sensibilidad y especificidad. Como consecuencia de ello, se tiene necesidad, habitualmente, de tejido tumoral, para confirmar la presencia de células tumorales.

Racila E. *et al*. 1998 (véase anteriormente, más arriba), han descrito un procedimiento de detección y de caracterización de células de cánceres de mama y de próstata, en la sangre, el cual combina un enriquecimiento inmunomagnético de células epiteliales, con un análisis en citometría en flujo y, a continuación, en caso de respuesta positiva, un análisis inmonocitoquímico. El análisis inmunocitoquímico, se base en la detección colorimétrica de una enzima acoplada a un marcador tumoral (anticuerpos anticitolceratina 5, 6, 8 y 18). Este test de ensayo, necesita un anticuerpo primario específico de marcador de cáncer, una inmunoglobulina secundaria de conejo, una inmunoglobulina de ratón anti-fosfatasa alcalina, la fosfatasa alcalina y el substrato correspondiente.

El procedimiento anterior, de arriba, presenta los inconvenientes siguientes:

- éste necesita un equipo específico, costoso, especialmente, para el análisis en citometría en flujo,
- son necesarios dos análisis, es decir, un análisis en citometría en flujo, seguido de un análisis inmunocitoquímico, y
- a éste, le falta sensibilidad.

Además, ninguno de los procedimientos precedentes, arriba mencionados, permiten asegurar la viabilidad de la células circulantes, y su potencial de supervivencia.

Córdoba F., *et al*. (2000, British Journal of Haemalology, 108, 549-558), han descrito un procedimiento de detección de células mielomatosas, de pacientes afectados de un mieloma múltiple, utilizando la propiedad conocida de las células, de secretar la inmunoglobulina. Las células mielomatosas, proceden de linfocitos B, normalmente presentes en la sangre, y normalmente, secretores de inmunoglobulinas.

Zhou Zegi *et al*. han descrito, en la patente estadounidense US 6 107 049, un kn de diagnóstico, que comprende una superficie de cultivo, previamente revestida por uno o por varios compañeros de enlace, de marcadores tumorales específicos del cáncer prostático.

Estos marcadores, anticuerpos Anti-PSA, permiten una lectura del antígeno (CPSA) específica de la próstata, y una alta sensibilidad de este test de ensayo de diagnóstico, el cual permite la limitación de recursos y de biopsias.

El solicitante, ha encontrado, ahora, de una forma sorprendente, el hecho de que, las células tumorales circulantes procedentes de cánceres sólidos, son capaces de liberar o de secretar ciertos marcadores tumorales, y que es posible el detectar dicha secreción.

El solicitante, ha puesto a punto, también, un nuevo procedimiento de detección y/o cuantificación de células tumorales circulantes, procedentes de cánceres sólidos, que utiliza esta característica particular de liberación o de secreción de marcadores tumorales, y que palia los inconvenientes anteriormente mencionados, arriba, es decir, que es fácil de aplicar en este sentido, que no comporta más que una sola etapa de análisis y que no necesita de material específico. Además, este procedimiento, permite detectar células circulantes raras, debido a su sensibilidad muy elevada, y permite igualmente el asegurarse de la viabilidad de las citadas células tumorales. Éste es por lo tanto muy útil, tanto en el diagnóstico, como en la exploración de la enfermedad residual y como en la evaluación del potencial de supervivencia, es decir, de la agresividad, de las células circulantes.

Así, de esta forma, la presente invención, tiene por objeto un procedimiento de detección y/o cuantificación de células tumorales circulantes de una muestra biológica, las cuales son capaces de liberar o secretar, *in vitro*, uno varios marcadores tumorales, que comprende las etapas consistentes en:

(i) depositar una cantidad conocida de las citadas células, en el fondo de una superficie de cultivo, sobre la cual se fija por lo menos un compañero de enlace, específico, o no, del citado o de los citados marcador(es) tumoral(es),

(ii) cultivar las citadas células, en condiciones tales que éstas liberen o secreten los citados marcadores tumorales que son inmunocapturados en el fondo de la superficie de cultivo,

(iii) eliminar las células, mediante lavado,

(iv) añadir por lo menos un conjugado marcado específico de los citados marcadores tumorales y

(v) visualizar el marcaje de esta forma obtenido.

El procedimiento de la invención, permite por lo tanto de enumerar las células neoplásicas no hematopoyéticas circulantes, procedentes de muestras biológicas de pacientes afectados de un cáncer sólido.

Los cánceres sólidos, son bien conocidos por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica. A título de ejemplo, se pueden citar los cánceres de mama, de próstata, de tiroides, de hígado, de testículos, de ovarios, del sistema digestivo, del pulmón, etc.

Las muestras biológicas susceptibles de contener células tumorales circulantes, comprenden todo fluido biológico tal como la sangre, la médula ósea, los derrames, la leche, el líquido cefalo-raquídeo y las orinas.

Según una forma de realización preferida, las muestras biológicas, se encuentran constituidas por la sangre, o la médula ósea.

Los marcadores tumorales, son marcadores específicos de cánceres sólidos, los cuales son capaces de ser liberados o secretados por parte de las células tumorales, *in vivo* o *in vitro*, bajo ciertas condiciones de cultivo.

Por marcador tumoral liberado de una célula tumoral, se entiende un marcador membranario, el cual se ha segmentado, y por marcador secretado por una célula tumoral, se entiende tanto un marcador secretado directamente por la citada célula, como un marcador que ha sementado en el citoplasma, y, a continuación, se ha excretado por la citada célula tumoral.

A título de marcador, se pueden citar diferentes antígenos (proteicos o no proteicos).

Según una forma de realización preferida, los citados marcadores tumorales son, bien ya sea antígenos membranarios capaces de ser liberados por segmentación, al fondo de la superficie de cultivo, o bien ya sea antígenos intracelulares que son secretados por las citadas células, al fondo de la superficie de cultivo.

A título de ejemplo de antígeno membranario, se puede citar la proteína Muc-1, que es una proteína de superficie de las células del cáncer de mama, y que se segmenta en forma de proteína CA 15-3 (hidrato de carbono 15-3).

A título de ejemplo de antígeno secretado, se puede citar el PSA, el cual se produce por las células del cáncer de próstata, la proteína catepsina-D (Cath-D) que una espartil-proteasa del lisosoma, expresada en todos los tejidos, pero que es superexpresada por las células cancerosas en el ámbito del cáncer de mama, la tiroglobulina (TG) producida por las células cancerosas en el ámbito del cáncer de tiroides, la proteína CA 125 producida por las células cancerosas en el ámbito del cáncer de ovario, las proteínas ACE y CA 19-9 producidas por las células cancerosas en el ámbito del cáncer colorrectal, y la alfa-foetoproteína (AFP), producida por las células hepáticas en el ámbito de los hepatocarcinomas.

Según una forma de realización preferida de la invención, las células tumorales, son capaces de liberar, como marcador tumoral, la proteína CA 15-3, y el cáncer buscado, es el cáncer de mama.

Según otra forma de realización preferida de la invención, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, la proteína TG, y el cáncer buscado, es el cáncer de tiroides.

Según otra forma de realización preferida de la invención, las células tumorales, son capaces de re-secretar, como marcador tumoral, la proteína CA 125, y el cáncer buscado, es el cáncer de ovario.

Según otra forma de realización preferida de la invención, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, las proteínas ACE y CA 19-9, y el cáncer buscado, es el cáncer colorrectal.

Según otra forma de realización preferida de la invención, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, la alfa-foetoproteína, y el cáncer buscado, es el cáncer primario de hígado.

Según otra forma de realización preferida de la invención, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, el PSA, y el cáncer buscado, es el cáncer de próstata.

Los compañeros de enlace específicos de los marcadores tumorales, se encuentran constituidos por todo compañero susceptible de enlazarse con los marcadores tumorales. A título de ejemplo, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos y las proteínas.

Los anticuerpos compañeros de enlace son, bien ya sea anticuerpos policlonales, o bien ya anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales, pueden obtenerse por inmunización de un animal con por lo menos un antígeno tumoral de interés, seguido de la recuperación de los anticuerpos obtenidos en forma purificada, mediante extracción del suero del citado animal, y separación de los citados anticuerpos de los otros constituyentes del suero, especialmente, por cromatografía de afinidad sobre una columna, sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, especialmente, un antígeno tumoral de interés.

Los anticuerpos monoclonales, pueden obtenerse mediante la técnica de los hibridomas, cuyo principio general, se recuerda a continuación.

En primer lugar, se procede a inmunizar un animal, generalmente, un ratón, (o células en cultivo, en el ámbito de la inmunización *in vitro*), con un antígeno tumoral de interés, cuyos linfocitos B, son entonces capaces de producir anticuerpos contra el citado antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos, se fusionan, a continuación, con células mielomatosas "inmortales" (murinas, en el ejemplo), para dar lugar a hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células de esta forma obtenidas, se efectúa, entonces, una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y de multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma, es multiplica en forma de un clon, conduciendo, cada uno de ellos, a la producción de un anticuerpo monoclonal, cuyas propiedades de reconocimiento, con respecto al antígeno tumoral de interés, podrán someterse a test de ensayo, por ejemplo en ELISA, mediante inmunotransferencia en una o en dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biocaptador. Los anticuerpos monoclonales de esta forma seleccionados, se purifican, a continuación, especialmente, mediante la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente, más arriba.

Ejemplos de fracciones de anticuerpos compañeros de enlace de los morcadores tumorales, comprenden los anticuerpos anti-CA 15-5, anti-PSA, anti-alfa-foeto-proteína, anti-tiroglobulina, anti-CA 19-9 y anti-CA 125.

En el caso del cáncer de mama, en donde, las células son capaces de liberar la proteína CA 15-3, se podrán utilizar, como compañeros de enlace, anticuerpos anti-CA 15-3.

En el caso del cáncer de próstata, en donde, las células son capaces de secretar el PSA, se podrán utilizar, como compañeros de enlace, anticuerpos anti-PSA.

En el caso del cáncer de tiroides, en donde, las células son capaces de secretar la TG, se podrán utilizar, como compañeros de enlace, anticuerpos anti-TG.

En el caso del cáncer de ovario, en donde, las células son capaces de secretar CA 125, se podrán utilizar, como compañeros de enlace, anticuerpos anti-CA 125.

En el caso del cáncer de colorrectal, en donde, las células son capaces de secretar el CA 19-9 ó el ACE, se podrán utilizar, como compañeros de enlace, anticuerpos anti-CA 19-9 y anti-ACE.

En el caso del hepatocarcinoma, en donde, las células son capaces de secretar la alfa-foetoproteína, se podrán utilizar, como compañeros de enlace, anticuerpos anti-FPA.

La superficie de cultivo, puede contener varios compañeros de enlace. De una forma preferente, la superficie de cultivo, contiene hasta cuatro compañeros de enlace diferentes.

Según una forma de realización preferida, la superficie de cultivo, contiene dos tipos de anticuerpos diferentes, dirigidos contra antígenos específicos del cáncer de mama, de una forma preferente, los anticuerpos anti-CA 15-3 y anti-Cath-D.

La superficie de cultivo, es tal que, ésta, permite el cultivo de células tumorales. A título de ejemplo, se pueden citar los microhoyos, las microplacas, las superficies plásticas y las membranas.

Los microhoyos o la microplaca, pueden estar constituidas, en sí mismas, de plástico, de tal forma que, los compañeros de enlace, se fijen directamente a los microhoyos o la microplaca. Estos pueden igualmente contener una membrana clásicamente conocida por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, la cual es susceptible de poder fijar los compañeros de enlace. A título de ejemplo, se pueden citar las membranas en nitrocelulosa y en Immobilon-P (Millipore Corporation).

La muestra biológica de los pacientes de interés, se deposita directamente en el fondo de la superficie de cultivo, o bien, las células no hematopoyéticas, se enriquecen, antes de la deposición sobre el citado fondo.

En el caso de las extracciones sanguíneas, las células, se enriquecen, por ejemplo, gracias a una técnica de separación celular sobre Ficoll, asociada a un depleción de las células sanguíneas utilizando anticuerpos anti-CD45, acoplados a bolitas magnéticas (Dynal Biotech ASA, Noruega). En estas condiciones, pueden enumerarse algunas células circulantes tumorales, por milímetro de sangre total.

Cualquier otro procedimiento que sea conocido por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, es apropiado, para los fines de la invención.

La enumeración o recuento de células depositadas sobre la membrana de los microhoyos, se efectúa por hemacitometría (célula de Thomas, Kovas slide).

Las condiciones de cultivo que permiten la liberación o la secreción de los marcadores tumorales, son condiciones clásicas, tales como las correspondientes a 37°C, bajo atmósfera húmeda, a un 5% de CO_2.

La eliminación de las células, después de la inmunocaptura de los marcadores tumorales mediante los compañeros de enlace, fijados sobre el fondo de la superficie de cultivo, se efectúa mediante lavados, consistentes en utilizar tampones de lavado clásicos, tales como el tampón PBS (Phosfate Buffered Saline -suero salino tamponado con fosfato-), con albúmina bovina (1%), o sin ella.

Los conjugados, utilizados después de la eliminación de las células, son conjugados que con clásicamente conocidos por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica.

A título de ejemplo de conjugado, se pueden citar los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales. De una forma preferente, los anticuerpos conjugados, tienen una especificidad epitópica, diferente de los anticuerpos fijados sobre el fondo de la superficie de cultivo.

Por marcaje de los conjugados, se entiende la fijación de un marcador capaz de generar directamente o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos marcadores, consiste en:

- las enzimas que producen una señal detectable por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa del rábano silvestre, la fosfatasa alcalina, la α-galactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- los cromóforos, como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,
- las moléculas radioactivas, como la ^{32}P, la ^{35}S ó la ^{125}I, y
- las moléculas fluorescentes, tales como la alexa o las ficocianinas.

Pueden también utilizarse sistemas indirectos como, por ejemplo, ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/antiligando, son bien conocidas por la persona experta en el arte especializado de la técnica, lo

cual es el caso, por ejemplo, de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, haptano/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario de polinucleótido. En este caso, es el ligando el que porta el agente de enlace. El anti-ligando, puede detectarse directamente mediante los marcadores descritos en el párrafo precedente, o puede él mismo ser detectable por un ligando/anti-ligando.

Estos sistemas de detección indirectos, pueden conducir, en ciertas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal, es bien conocida por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, y se podrá hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR 98/10 084, ó WO-A-95/08 000 del solicitante, o al artículo de J. Histochem. Cytochem. 45: 481-491, 1997.

Según el tipo de marcaje del conjugado utilizado, la persona experta en el arte especializado de la técnica, añadirá reactivos pertenecientes a la visualización del marcaje.

Así, por ejemplo, en el caso de las enzimas, es necesario el proceder a añadir un substrato cromógeno, tal como el NBT-BCPI, para la fosfatasa alcalina, o el AEC, para la peroxidasa. La adición del substrato cromógeno, deja entonces aparecer, en el lugar en donde se encuentra una célula diana, un precipitado coloreado o inmuno-spot (azul con el NBT-BCIP, y rojo con el AEC), huella proteica veraz, dejada por la célula.

El conjunto de los inmuno-spots presentes en el fondo de la superficie de cultivo, puede visualizarse y enumerarse (contarse), con la lupa binocular, o mejor, con la ayuda del equipo KS ELISPOT (Sociedad Carl Zeiss Vision GmbH), equipado con un microscopio de altas prestaciones y con una cámara numérica (digital), acoplados a un sistema informático.

Para el marcaje en fluorescencia, el conjunto de inmuno-spots, se visualiza, y se enumera (se contabiliza) con el equipo KS ELISPOT, adaptado al estudio de la fluorescencia.

Los criterios retenidos para el análisis de estos "spots" (puntos), incluyen el diámetro, el color, la forma, la saturación, el contraste y el gradiente de difusión. En efecto, la densidad y la granulosidad de los spots, decrece desde el centro hacia la periferia, según un gradiente de difusión muy característico de un sistema proteico.

En el caso, en donde se encuentran presentes más de dos compañeros de enlace, en la superficie de cultivo, la revelación del acoplamiento entre compañero de enlace - marcador tumoral, se efectúa, de una forma preferente, con anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos.

Así, de este modo, según una forma de realización preferido de la presente invención, las etapas (iv) a (v) de la invención, se reemplazan por las etapas siguientes:

(iv') adición de los anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos,

(v') visualización de la fluorescencia, cuando hay acoplamiento entre compañero de enlace y el marcador tumoral.

La enumeración de las células tumorales, mediante el procedimiento de la invención, permite medir su capacidad de migración, en los cánceres sólidos. El pronóstico, el seguimiento de la eficacia de los tratamientos terapéuticos administrados, la cuantificación de la enfermedad residual y los diagnósticos de las recaídas infraclínicas y biológicas, en los cánceres sólidos, se convierten por lo tanto en posibles, gracias al procedimiento de la invención, debido a su muy grande sensibilidad y especificidad.

Además, los tumores, pueden liberar células tumorales circulantes, desde el inicio de su formación, de forma que, el procedimiento de la invención, permite un diagnóstico precoz del cáncer.

Correspondiente en consecuencia, otro objeto de la invención, consiste en la utilización del procedimiento de la invención, en el diagnóstico precoz y el pronóstico de la patología, en la elección de la evaluación de la eficacia de los tratamientos terapéuticos y en el diagnóstico de las recaídas, en el ámbito de los cánceres sólidos.

Según una forma preferida de presentación, el procedimiento de la invención, se utiliza en el diagnóstico del cáncer de mama, de la próstata, de las tiroides, del ovario, del colon, del recto y del hígado.

Además, el procedimiento de la invención, acopla un procedimiento de detección específica, con un procedimiento de cultivo, y permite, por lo tanto, el asegurar un carácter viable y funcional de las células tumorales detectadas, siendo esta propiedad importante, en el ámbito del pronóstico.

Otro objeto de la invención, consiste, por lo tanto, en la utilización de un procedimiento de la invención, para evaluar el potencial de supervivencia de las células tumorales circulantes, procedentes de pacientes afectados de cánceres sólidos.

En efecto, un resultado positivo del procedimiento, de la invención, evidencia un potencial de vida de este tipo.

El procedimiento de la invención, puede aplicarse gracias a un equipo transportable, a modo de "kit" de diagnóstico, que comprende una superficie de cultivo previamente revestida de uno o de varios compañeros de enlace de los marcadores tumorales específicos del cáncer, del cual se quiere efectuar la investigación, el conjugado o los conjugados correspondientes, previamente marcados. El equipo transportable a modo de kit, puede igualmente contener soluciones para el lavado drástico de las células, después de la inmunocaptura.

En el bien entendido, el procedimiento de la invención, puede también utilizarse como enumerador de toda célula tumoral circundante, capaz de liberar o secretar por lo menos un marcador identificado como marcador tumoral, para el cual existe un compañero de enlace.

Así, por ejemplo, el procedimiento de la invención, permite enumerar:

- células tiroideas tumorales, productoras de tiroglobulina (TG) o de calcitonina (CT),
- células hepáticas tumorales, productoras de alfa-foetoproteínas (AFP),
- células testiculares, productoras de AFP o de la hormona crónica ganodotropina (beta-HCS),
- células mamarias tumorales, productoras de CA 15-3, de catepsina D, de PS2, de Her2/neu, de mamaglobina B,
- células ovarias tumorales, productoras de CA-125,
- células prostáticas tumorales, productoras de PSA,
- células tumorales del sistema digestivo (colon, recto, estómago y páncreas), productoras de CA 19-9, CA-125, de CA 19-9 y de ACE, y
- células tumorales del melanoma, productoras de la proteína S 100.

La presente invención, se comprenderá mejor, con la ayuda de los ejemplos que se facilitan a continuación, proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo, así como con la ayuda de las figuras 1 a 3 anexadas, en las cuales:

- la figura 1 (1A a 1F), muestra los inmuno-spots obtenidos según el procedimiento de la invención, a partir de células tumorales MDC-7,

- la figura 2, muestra los inmuno-spots obtenidos según el procedimiento de la invención, a partir de células CD45(-) de sujetos testigo y de sujetos afectados de cáncer de mama metastásico,

- la figura 3, muestra los inmuno-spots obtenidos según el procedimiento de la invención, en un sujeto, entre aquéllos afectados de cáncer de mama metastásico.

Ejemplo 1

Enumeración de las células tumorales procedentes de las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 (cáncer de mama)

Se procedió a utilizar la línea MCF-7, debido al hecho de que, ésta, secreta niveles elevados de las proteínas Cath-D y MUC1, así como la línea MDA-MB-231, debido al hecho de que, ésta, no expresa más que la proteína Cath-D.

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231, se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, biochrom KG, Berlín, Alemania), complementado con un 1% de glutamax (Lifes technologies, Paisley, Escocia), un 10% de suero bovino fetal (Life Technologies), 500 Ul/ml de penicilina y 500 μg/ml de estreptomicina (Life Technologies) en un incubador humidificado, que contenía un porcentaje del 5% de CO_2, a una temperatura de 37°C.

Se utilizaron placas de microtitulación (microti-trimetría) de 96 hoyos (Nunc, Roskilde, Dinamarca), que utilizaban una membrana de immobilon-P, como fase sólida (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), las cuales se revistieron de anticuerpos monoclonales anticatepsina D D7E3 (Garcia, M., Capony, F. Derocq, D. Simon, D., Pau, B., & Rochefort, H. Characterization of monoclonal antibodies to the strogen-regulated Mr 52.000 glycoprotein and their use in MCF7 cells, -Caracterización de anticuerpos monoclonales, a la glicoproteína Mr 52.000 regulada con estrógeno, y su uso en células MCF7-. Cancer Research 45, 709-716 (1985), y anticuerpos monoclonales anti-CA 15-3 (Dacocytomitation, Francia), y se dejaron toda la noche a una temperatura de +4°C. Los anticuerpos no enlazados a la membrana, se eliminaron procediendo a lavar tres veces, con PBS. Los sitios no ligados, se bloquearon, a continuación, con suero de albúmina bovina 5% (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia), durante un tiempo de una hora, a la temperatura ambiente.

En caso necesario, las líneas celulares, se trataron con 50 μg/ml de cicloheximida, sobre un dispositivo que permitía, a la vez, la inclinación y la rotación, a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de una hora, antes de efectuar las dosificaciones.

Las células viables procedentes de líneas celulares, se contaron en un hematocitómetro, después de la coloración por exclusión, al colorante azul tripan y, a continuación, se diluyeron en serie, en los hoyos en doble, en un medio de crecimiento, a diferentes concentraciones. Se procedió, a continuación, a incubar las placas, a una temperatura de 37°C, en CO_2, a un 5%, durante un transcurso de tiempo de 24 horas.

Después del lavado con PBS, se procedió a añadir, bien ya fuere anticuerpos monoclonales anti-Cath-DM1G8 (García, M., Capony, F., Derocq. D., Simon, D., Pau B., & Rochefort, véase anteriormente, arriba), conjugados con la peroxidasa del rábano salvaje, o bien ya fuere anticuerpos monoclonales anti-CAT 15-3 DF3 (Dakocytomation) conjugados con la fosfatasa alcalina (procedimiento de un color), o bien ya fuere una mezcla de éstos (procedimiento de dos colores), y las placas, se incuban a la temperatura ambiente.

Se procedió a añadir, en cada hoyo, el substrato cromático apropiado, es decir, el juego, a modo de "kit" de coloración, AEC, (Sigma-Aldrich), para la peroxidasa del rábano salvaje y la sal de X-fosfato/5-bromo-4-dicloro-3-indonil-fosfato toluidina y cloruro de 4-Nitro azul tetrazolium (BCIP/INTB, Sigma). Se pudieron obtener precipitados insolubles de color rojo (peroxidasa/presencia de Cath-D), o azul (fosfatasa alcalina/presencia de CA 15-3), en 5-10 minutos.

Se procedió, a continuación, a lavar las placas con agua destilada, para parar la reacción.

Los inmuno-spots, se completaron utilizando el equipo KS ELISPOT. Los hoyos sin células o sin revestimiento de anticuerpos específicos, se incluyeron en calidad de testigo.

La figura 1, muestra los resultados obtenidos. Tal y como se muestra en la figura 1 A-B (1 A para Cath-D; 1 B para CA 15-3), en donde se utilizó el procedimiento de un color, permitiendo observar, la utilización de una combinación de anticuerpos monoclonales anti-Cath-D y el antígeno CA 15-3, aproximadamente un 15% de las células MCF-7 que secretan las proteínas Cath-D y/o CA15-3, después de 24 horas de cultivo *en vitro*. La adición de cicloheximida, durante el cultivo, disminuye, a la vez, el tamaño y el número de spots obtenidos, lo cual confirma una síntesis proteica de novo (figura 1 C-D, para Cath-D-CA 15-3, respectivamente).

Se tomará debida nota, en cuanto al hecho de que, las células de la línea MDA-MB-231, no mostraron spots, más que con los anticuerpos anti-Cath-D (datos no representados).

Finalmente, la técnica de dos colores (figura 1 E-F), permiten observar el hecho de que, con las líneas celulares MCF-7, aproximadamente un porcentaje del 17% de los spots, no son más que spots "Cath-D" (precipitado de color rojo), un porcentaje del 82%, no son más que spots "CA 15-3 (MUC-1)" (precipitado de color azul) y un porcentaje del 1%, son spots dobles "Cath-D" y "CA 15-3 (MUC-1)"

Ejemplo 2

Sensibilidad de detección del procedimiento de la invención

Con objeto de determinar el nivel de detección mínima del procedimiento de la invención, se utilizaron diluciones en serie de las células de la línea celular MCF-7, de 100 000, 10 000, 1000, 100, 10 a 1 células por hoyo, y se procedió la secreción de Cath-D, mediante el procedimiento de la invención, según el modo operativo descrito en el ejemplo 1, y mediante la técnica ELISA (CisBioInternational, Saclay, France), en el sobrenadante de cultivo correspondiente.

Los resultados, se indican el la tabla 1 que se facilita a continuación:

TABLA 1

Comparación de la sensibilidad del procedimiento y de ELISA

Células MCF-7 (células / por hoyo)	Cath-D Procedimiento de la invención (células / por hoyo)	Cath-D ELISA (pmol/ml de sobrenadante)
100.000	-20.000	27
10.000	2.350	0,2
1.000	246	0
100	222	0
10	2	0
1	0,25*	0
* Media de 4 hoyos		

Tal y como muestra la tabla anterior, con una dilución de 100.000 a 10.000 células por hoyo, los spots, eran tan numerosos que éstos no se podían contar, mientras que, la detección de Cath-D, era posible, con la técnica ELISA. Con una dilución de 1000 células por hoyo, se contaron aproximadamente 250 spots, correspondientes a células que secretaban Cath-D (25%), con el procedimiento de la invención, mientras que, con la técnica ELISA, no se detectó ninguna secreción de Cath-D. Se observaron resultados idénticos, con diluciones superiores.

Es conveniente el tomar debida nota en cuanto al hecho de que, incluso con una sola célula por hoyo, se detectó un spot, con el procedimiento de la invención, y que se obtuvieron resultados similares, con la proteína MUC1.

Estos datos, muestran, por lo tanto, el hecho de que, el procedimiento de la invención, tiene una sensibilidad 10.000 veces superior a la de la técnica ELISA, aplicada a la detección de marcador tumoral, en el sobrenadante de la célula.

Ejemplo 3

Detección de células circulantes

Se procedió a aislar células epiteliales circulantes, y células mononucleadas periféricas, mediante centrifugación, por gradiente de densidad Ficott-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia), de 8-10 ml de muestras sanguíneas procedentes de 16 pacientes que presentaban un cáncer de mama metastásico, tratados en el Centre de Reserche et de Lutte contre le Cancer, Val de Aurelle, Montpellier, France.

Se procedió a someter a test de ensayo, la eficacia del aislamiento de las células epiteliales, de la forma siguiente: se procedió a diluir, en la sangre de sujetos normales, células de la línea celular MCF-7 y, a diferentes concentraciones (1000, 100 y 10 células por ml de sangre). Se procedió, a continuación, a tratar estas cantidades alícuotas de sangre, por gradiente de Ficoll-Hypaque, y se eliminaron las células de origen hematológico, mediante tri-magnético, procediendo a utilizar bolitas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD45. Se procedió a investigar las proteínas CA 15-3, en las células restantes, con el procedimiento de la invención. La eficacia de la enumeración, mediante el procedimiento de la invención, fue de un 67%, lo cual evidencia el hecho de que, el procedimiento de la presente invención, permite la recuperación de células circulantes raras de origen tumoral.

Se procedió a enriquecer las células no hematopoyéticas, por depleción de todas las células sanguíneas CD-45(+), de línea hematopoyética, procedente de las células mononucleadas periféricas, utilizando anticuerpos anti-CDS45, con una marcaje magnético, y un procedimiento de separación magnética, según las recomendaciones de Dynal Biotech ASA.

Se aplicó el procedimiento de la invención, sobre las células de esta forma enriquecidas, de pacientes afectados de cáncer de mama metastásico, y pacientes testigos, según la forma operativa descrita en el ejemplo 1.

Los resultados obtenidos, se proporcionan el la tabla 2 que se facilita a continuación:

TABLA 2

Recuento de spots Cath-D y/o MUC1, procedente de las células CD45(-)

			spots / 10 ml de sangre		
Grupos	sujetos	células CD45(-) (x10^6)/10 ml de sangre	Cath-D	MUC-1*	Cath-D+MLTC-1
ST	1	5	0	ND	ND
	2	1,3	0	ND	ND
	3	0,01	ND	0	ND
	4	0,01	ND	0	ND
	5	0,01	ND	0	ND
	6	0,01	ND	0	ND
	7	0,01	ND	0	ND
	8	0,01	ND	0	ND
	9	5,4	0	0	0
	10	0,2	0	0	0
	11	0,7	0	0	0
CSM	12	0,9	2	5	0
	13	1,2	7	15	0
	14	5	255	345	0
	15	2	12	250	0
	16	0,7	4	38	0
	17	1,4	68	96	0
	18	1	35	18	0
	19	1,8	0	204	0
	20	3,9	217	48	0
	21	0,9	16	39	0
	22	1,1	18	107	20
	23	0,8	9	1700	10
	24	0,6	20	25	0
	25	1,1	182	13	0

TABLA 2 (continuación)

			spots / 10 ml de sangre		
Grupos	sujetos	células CD45(-) (x10^6)/10 ml de sangre	Cath-D	MUC-1*	Cath-D+MLTC-1
	26	1,2	6	19	0
	27	2,3	2	48	0

ST: sujetos testigos, CSM: cáncer de mama metastásico

*sólo se contaron los spots > 1200 μ^2,

Tal y como se ha indicado en tabla anterior, de arriba, cuando se procedió a someter a tests de ensayo a los sujetos testigos, no se detectó ninguna expresión de la proteína Caht-D, para 5/5 de los sujetos controlados sometidos a tests de ensayo.

Cuando se observaron los spots CA 15-3 (MUC-1) en 9 pacientes del mismo grupo, se notaron numerosos spots, cuyo tamaño, era inferior a 1 000 μm^2, para numerosos pacientes (véase la figura 2, parte superior). Si se trataba de spots CA 15-3 (MUC) en los pacientes afectados de cáncer, se detectaban dos poblaciones de spots, pequeños spots cuyo tamaño era inferior a 1 000 μm^2 y spots más grandes, de un tamaño comprendido entre 1 200 μm^2 y más de 7 000μm^2 (figura 2, parte inferior), lo cual sugiere el hecho de que una sola crítica de 1 000 μm^2, podría ser útil para definir una expresión anormal de MUC1, vía CA 15-3 (figura 2, parte inferior).

Para los 6 pacientes afectados de un cáncer avanzado, una mayoría de células, no expresaron más que un solo antígeno tumoral, de 0,2 a 25,5 células por ml de sangre, para la proteína Cath-D y de 0,5 a 170 células de sangre, para la proteína CA 15-3, mientras que, sólo 2 pacientes, entre estos 16, expresaron las dos proteínas (figura 3).

Para un paciente explorado en el momento del primer diagnóstico (es decir, en tratamiento), de un tumor (tamaño > 2 cm), y con un ganglio centinela invadido, se enumeraron 5,1 spots/ml de sangre, antes de la intervención quirúrgica, y de 0 spots/ml, cuatro días después.

Ejemplo 4

Enumeración de las células tumorales procedentes de las líneas celulares tumorales LNCAP y MCF-7 (cáncer de próstata)

Se utilizó la línea LNCAP, puesto que, ésta secreta unos niveles elevados de proteína PSA, así como la línea MCF-7, puesto que, ésta, no expresa la proteína PSA.

La línea celular LNCAP, se mantuvo en el medio RPMI (Eurobio, Les Ullis, Francia), complementado QSP 400 ml con 5 ml de glutamina (2 mM), 50 ml de suero bovino fetal (10%), 100 Ul/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina 2,5 ml de glucosa 100 4,5 ml) y 5 ml de piruvato de sodio 100 mM (1 mM).

La línea celular MC-F, tal y como se describe en el ejemplo1, se utilizó como testigo.

Las placas de microtitulación de 96 hoyos (Munc, Roskilde, Dinamarca), las cuales utilizaban una membrana de Inmobilon-P como fase sólida (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) se revistieron de anticuerpos monoclonales anti-PSA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), y se dejaron, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de +4°C. Los anticuerpos no enlazados a la membrana, se pudieron eliminar, procediendo a lavar, tres veces, con PBS. Los sitios no enlazados, se bloquearon, a continuación, con sueroalbúmina bovina al 5% (Sigma-Aldrich, St. Quentin, Fallavier, Francia), durante una hora, a la temperatura ambiente.

En caso necesario, las líneas celulares, se trataron con 50 μg/ml de cicloheximida, sobre un dispositivo que permitía, a la vez, la inclinación y la rotación, a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de una hora, antes de efectuar las dosificaciones.

Las células viables procedentes de las líneas celulares, se contaron, en un hematocitómetro, después de la coloración por exclusión al colorante azul tripan y, a continuación, se diluyeron en serie, en los hoyos en doble, en un medio de crecimiento adecuado, a diferentes concentraciones. Las placas, se incubaron, a continuación, a una temperatura de 37°C, en CO_2, a un 5%, durante un transcurso de tiempo de 24 horas.

Después del lavado con PBS, se procedió a añadir anticuerpos monoclonales anti-PSA (bio-Mérieux), conjugaos con la fosfatasa alcalina (procedimiento de un color), y las placas, se incubaron a la temperatura ambiente.

Se procedió a añadir, al interior de cada hoyo, el substrato cromático apropiado, con la mezcla de sal de X-fosfato / 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato toluidina y cloruro de 4-Nitro azul tetrazolium (BCIP/NTB, Sigma). Se obtuvieron precipitados insolubles de color azul, en un tiempo de 5 a 10 minutos.

Se procedió, a continuación, a lavar las placas, con agua destilada, para parar la reacción.

Los inmuno-spots, se contaron utilizando un equipo KS ELISPOT. Los hoyos sin células o sin revestimiento de anticuerpos específicos, se incluyeron, en calidad de testigo.

Deberá tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, la eficacia del aislamiento de las células epiteliales, se sometió a test de ensayo, tal y como se indica en el ejemplo 3, la cual fue de un 70%.

Ejemplo 5

Detección de células circulantes secretantes de PSA

Se procedió a aislar las células epiteliales circulantes y las células mononucleadas periféricas, por centrifugación, mediante gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia), de 8-10 ml de muestras sanguíneas procedentes de 10 pacientes que presentaban un cáncer de próstata metastásico, tratados en la clínica "Beau Soleil", en la CHU de Montepellier, Francia.

Se procedió a enriquecer las células no hematopoyéticas, mediante depleción de todas las células sanguíneas CD45(+) de línea hematopoyética procedente de las células mononucleadas periféricas y utilizando anticuerpos anti-CD45, con un marcaje magnético y un procedimiento de separación magnética, según las recomendaciones de Dynal Biotech ASA.

Se procedió a aplicar el procedimiento de la invención, sobre las células de esta forma enriquecidas, de pacientes afectados del cáncer de próstata, metastásico, y de pacientes testigos, según el modo operativo descrito en el ejemplo 1.

Cuando se procedió a someter a test de ensayo a los sujetos testigos, no se detectó ninguna expresión de la proteína PSA, para 6/6 de los sujetos sometidos a test de ensayo. Por el contrario, para 10 pacientes que tenían metástasis óseas, se demostraron células circulantes secretantes de PSA.

Ejemplo 6

Enumeración de las células tumorales procedentes de las líneas celulares tumorales ML-1 (cáncer de tiroides)

Se utilizó la línea ML-1, puesto que, ésta, secreta unos niveles elevados de la proteína TG.

La línea celular ML-1, fue suministrada, de forma gratuita, por el equipo alemán de D. Grimm (Schonberger J., Bauer J., Spruss T., Weber G., Chahoud I., Billes C, Grimm D. Establishment and characterization of de follicular thyroid carcinma cell line ML-1, and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1, -Establecimiento y caracterización del la línea celular ML-1, del carcinoma tiroideo folicular, y caracterización de la línea celular del carcinoma tiroideo folicular-. J. Mol Med 2000: 78(2):102-10).

Ésta se mantuvo en un medio DMEM (4,5 g/l de glucosa), complementado con un 20% de suero bovino fetal, glutamina (2 mM, y piruvato de sodio (1 mM).

Las placas de microtitulación de 96 hoyos (Munc, Roskilde, Dinamarca), las cuales utilizaban una membrana de Inmobilon-P como fase sólida (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) se revistieron de anticuerpos monoclonales anti-PSA (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), y se dejaron, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de +4°C. Los anticuerpos no enlazados a la membrana, se pudieron eliminar, procediendo a lavar, tres veces, con PBS. Los sitios no enlazados, se bloquearon, a continuación, con sueroalbúmina bovina al 5% (Sigma-Aldrich, St. Quentin, Fallavier, Francia), durante una hora, a la temperatura ambiente.

Las células ML-1, se contaron, en un hematocitómetro, después de la coloración por exclusión al colorante azul tripan y, a continuación, se diluyeron en serie, en los hoyos en doble, en un medio de crecimiento adecuado, a diferentes concentraciones. Las placas, se incubaron, a continuación, a una temperatura de 37°C, en CO_2, a un 5%, durante un transcurso de tiempo de 24 horas.

Después del lavado con PBS, se procedió a añadir anticuerpos monoclonales anti-TG (BioRad, Marnes la Coquette, Francia), conjugados con la fosfatasa alcalina (procedimiento de un color), y las placas, se incubaron a la temperatura ambiente.

Se procedió a añadir, al interior de cada hoyo, el substrato cromático apropiado (mezcla de sal de X-fosfato/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato toluidina y de cloruro de 4-Nitro azul tetrazolium (BCIP/NTB, Sigma). Se obtuvieron precipitados insolubles de color azul, en un tiempo de 5 a 10 minutos.

Se procedió, a continuación, a lavar las placas, con agua destilada, para parar la reacción.

Los inmuno-spots, se contaron utilizando un equipo KS ELISPOT. Los hoyos sin células o sin revestimiento de anticuerpos específicos, se incluyeron, en calidad de testigo.

Deberá tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, la eficacia del aislamiento de las células epiteliales, se sometió a test de ensayo, tal y como se indica en el ejemplo 3, la cual fue de un 70%.

Ejemplo 7

Detección de células circulantes secretantes de TG

Se procedió a aislar las células epiteliales circulantes y las células mononucleadas periféricas, por centrifugación, mediante gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia), de 8-10 ml de muestras sanguíneas procedentes de 15 pacientes que presentaban un cáncer de tiroides metastásico, tratados en el hospital de Lapeyronie, en la CHU de Montepellier, Francia.

Se procedió a enriquecer las células no hematopoyéticas, mediante depleción de todas las células sanguíneas CD45(+) de línea hematopoyética procedente de las células mononucleadas periféricas y utilizando anticuerpos anti-CD45, con un marcaje magnético y un procedimiento de separación magnética, según las recomendaciones de Dynal Biotech ASA.

Se procedió a aplicar el procedimiento de la invención, sobre las células de esta forma enriquecidas, de pacientes afectados del cáncer de tiroides, metastásico, y de pacientes testigos, según el modo operativo descrito en el ejemplo 1.

Se incluyeron, en nuestro estudio, únicamente pacientes que tenían tasas séricas de TG positivo. Se exploraron 15 pacientes, a distancia del tratamiento del tumor primario. Para 5/6 pacientes en evolución metastásica, procedimos a enumerar células circulantes secretantes de TG; para 3 pacientes, este número de células, había aumentado, después de la estimulación *in vivo*, mediante tirógeno. Para dos pacientes, se enumeraron spots, sin complicaciones clínicas y con tasas normales de TG.

Ejemplo 8

Enumeración de células tumorales procedentes de las líneas celulares tumorales BG-1 y SKOV3 (cáncer de ovario)

Se utilizó la línea BG-1, puesto que, ésta, secreta unos niveles elevados de la proteína CA 125, así como la línea SKOV3, puesto que, ésta, no expresa la proteína CA 125.

La línea celular BG-1, se mantuvo en medio McCoy' 5a, que contenía glutamina (1,5 mM) y suero bovino fetal (10%).

La línea celular SKOV3, se utilizó como testigo. Ésta se mantuvo en un medio idéntico al citado para la línea BG-1.

Las placas de microtitulación de 96 hoyos (Munc, Roskilde, Dinamarca), las cuales utilizaban una membrana de Inmobilon-P como fase sólida (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) se revistieron de anticuerpos monoclonales anti-CA 125 (Dakatomation), y se dejaron, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de +4°C. Los anticuerpos no enlazados a la membrana, se eliminaron, procediendo a lavar, tres veces, con PBS. Los sitios no enlazados, se bloquearon, a continuación, con sueroalbúmina bovina al 5% (Sigma-Aldrich, St. Quentin, Fallavier, Francia), durante una hora, a la temperatura ambiente.

Las células BG-1, se contaron, en un hematocitómetro, después de la coloración por exclusión al colorante azul tripan y, a continuación, se diluyeron en serie, en los hoyos en doble, en un medio de crecimiento adecuado, a diferentes concentraciones. Las placas, se incubaron, a continuación, a una temperatura de 37°C, en CO_2, a un 5%, durante un transcurso de tiempo de 24 horas.

Después del lavado con PBS, se procedió a añadir anticuerpos monoclonales anti-CA 125 (Dakacitomation), conjugados con la fosfatasa alcalina (procedimiento de un color), y las placas, se incubaron a la temperatura ambiente.

Se procedió a añadir, al interior de cada hoyo, el substrato cromático apropiado (mezcla de sal de X-fosfato/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato toluidina y de cloruro de 4-Nitro azul tetrazolium (BCIP/NTB, Sigma). Se obtuvieron precipitados insolubles de color azul, en un tiempo de 5 a 10 minutos.

Se procedió, a continuación, a lavar las placas, con agua destilada, para parar la reacción.

Los inmuno-spots, se contaron utilizando un equipo KS ELISPOT. Los hoyos sin células o sin revestimiento de anticuerpos específicos, se incluyeron, en calidad de testigo.

Deberá tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, la eficacia del aislamiento de las células epiteliales, se sometió a test de ensayo, tal y como se indica en el ejemplo 3, la cual fue de un 70%.

Ejemplo 9

Enumeración de las células tumorales procedentes de las líneas celulares tumorales Caco2 y HT-29 (cáncer colorrectal)

Se utilizaron las líneas Caco2 y HT-29, puesto que, éstas, secreta unos niveles elevados de la proteína CA 19-9 y ACE.

Las dos líneas celulares, se sometieron a test de ensayo, para los dos marcadores celulares.

La línea celular Caco2, se mantuvo en un medio MEM, con sales de Earles y aminoácidos no esenciales, adicionado con suero bovino fetal (20%), glutainina (2 mM), piruvato de sodio (1 mM) y bicarbonato sódico (1,5 g/l).

La línea celular HT-29, se mantuvo en medio McCoy's 5a, que contenía glutamina (1,5 mM) y suero bovino fetal (10%).

Las placas de microtitulación de 96 hoyos (Munc, Roskilde, Dinamarca), las cuales utilizaban una membrana de Inmobilon-P como fase sólida (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) se revistieron de anticuerpos monoclonales anti-CA-19-9 (Dalcocytomation) ó anti-ACE (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France), y se dejaron, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de +4°C. Los anticuerpos no enlazados a la membrana, se eliminaron, procediendo a lavar, tres veces, con PBS. Los sitios no ligados, se bloquearon, a continuación, con sueroalbúmina bovina al 5% (Sigma-Aldrich, St. Quentin, Fallavier, Francia), durante una hora, a la temperatura ambiente.

Las células Caco-2 y HT-29, se contaron, en un hematocitómetro, después de la coloración por exclusión al colorante azul tripan y, a continuación, se diluyeron en serie, en los hoyos en doble, en un medio de crecimiento adecuado, a diferentes concentraciones. Las placas, se incubaron, a continuación, a una temperatura de 37°C, en CO_2, a un 5%, durante un transcurso de tiempo de 24 horas.

Después del lavado con PBS, se procedió a añadir anticuerpos monoclonales anti-CA 19-9, conjugados con la fosfatasa alcalina o anti-ACE, conjugados con la peroxidasa (bioMérieux, Marcy, l'Etoile, Francia)(procedimiento de un color), y las placas, se incubaron a la temperatura ambiente.

Se procedió a añadir, al interior de cada hoyo, el substrato cromático apropiado (mezcla de sal de X-fosfato/5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato toluidina y de cloruro de 4-Nitro azul tetrazolium (BCIP/NTB, Sigma). Se obtuvieron precipitados insolubles de color azul, en un tiempo de 5 a 10 minutos. Se procedió, a continuación, a añadir a cada hoyo, el substrato cromático apropiado para la peroxidasa, es decir, el juego, a modo de kit de coloración (Sigma-Aldrich). Se obtuvieron precipitados insolubles, de color rojo en 10 minutos.

Se procedió, a continuación, a lavar las placas, con agua destilada, para parar la reacción.

Los inmuno-spots, se contaron utilizando un equipo KS ELISPOT. Los hoyos sin células o sin revestimiento de anticuerpos específicos, se incluyeron, en calidad de testigo.

Deberá tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, la eficacia del aislamiento de las células epiteliales, se sometió a test de ensayo, tal y como se indica en el ejemplo 3, la cual fue de un 70%.

Ejemplo 10

Enumeración de las células tumorales procedentes de las líneas celulares tumorales hepáticas (cáncer primario de hígado)

Se utilizó la línea hepática, puesto que, ésta, secreta unos niveles elevados de la alfaproteína.

La línea celular, se mantuvo en un medio, y se mantuvo en medio RPMI, que contenía glutamina (1,5 mM) y suero bovino fetal (20%).

Las placas de microtitulación de 96 hoyos (Munc, Roskilde, Dinamarca), las cuales utilizaban una membrana de Inmobilon-P como fase sólida (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) se revistieron de anticuerpos monoclonales anti-CA-125 (Dakocytomation), y se dejaron, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de +4°C. Los anticuerpos no enlazados a la membrana, se eliminaron, procediendo a lavar, tres veces, con PBS. Los sitios no ligados, se bloquearon, a continuación, con sueroalbúmina bovina al 5% (Sigma-Aldrich, St. Quentin, Fallavier, Francia), durante una hora, a la temperatura ambiente.

Las células, se contaron en un hematocitómetro, después de la coloración por exclusión al colorante azul tripan y, a continuación, se diluyeron en serie, en los hoyos en doble, en un medio de crecimiento adecuado, a diferentes concentraciones. Las placas, se incubaron, a continuación, a una temperatura de 37°C, en CO_2, a un 5%, durante un transcurso de tiempo de 24 horas.

Después del lavado con PBS, se procedió a añadir anticuerpos monoclonales anti-AFP (BioMérieux, Marcy, l'Etoile, Francia), conjugados con la fosfatasa alcalina (procedimiento de un color), y las placas, se incubaron a la temperatura ambiente.

Se procedió a añadir, al interior de cada hoyo, el substrato cromático apropiado para la preoxidas, a saber, el juego a modo de kit de coloración AEC (Sigma-Aldrich). Se obtuvieron precipitados insolubles de color rojo, en un tiempo de 10 minutos.

Se procedió, a continuación, a lavar las placas, con agua destilada, para parar la reacción.

Los inmuno-spots, se contaron utilizando un equipo KS ELISPOT. Los hoyos sin células o sin revestimiento de anticuerpos específicos, se incluyeron, en calidad de testigo.

Deberá tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, la eficacia del aislamiento de las células epiteliales, se sometió a test de ensayo, tal y como se indica en el ejemplo 3, la cual fue de un 70%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección y/o cuantificación de células tumorales neoplásicas, no hematopoyéticas, circulantes, de una muestra biológica, de un paciente afectado de cáncer sólido, las cuales son capaces de liberar o secretar, *in vitro*, uno varios marcadores tumorales, que comprende las etapas consistentes en:

(i) depositar la citada muestra, en donde se han enumerado las células, en el fondo de una superficie de cultivo, sobre la cual se fija por lo menos un compañero de enlace, específico, o no, del citado o de los citados marcador(es) tumoral(es),

(ii) cultivar las citadas células, en condiciones tales que, las citadas células tumorales neoplásicas, no hemotopoyéticas, liberen o secreten los citados marcadores tumorales que son inmunocapturados en el fondo de la superficie de cultivo,

(iii) eliminar las células, mediante lavado,

(iv) añadir por lo menos un conjugado marcado específico de los citados marcadores tumorales y

(v) visualizar el marcaje de esta forma obtenido.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que, las muestras biológicas, están constituidas por la sangre o la médula ósea.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** por el hecho de que, los citados marcadores tumorales, son, o bien ya sea antígenos membranarios capaces de ser liberados por segmentación, en el fondo de superficie de cultivo, o bien ya sea antígenos intracelulares que se secretan por las citadas células, en el fondo de la superficie de cultivo.

4. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, como mucho dos cuatro compañeros de enlace diferentes, de una forma preferente, como mucho dos compañeros, se fijan sobre el fondo de la superficie de cultivo.

5. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, el antígeno proteico, PSA, y el compañero de enlace, es un anticuerpo anti-PSA.

6. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, las células tumorales, son capaces de liberar, como marcador tumoral, el antígeno proteico, CA 15-3, y el compañero de enlace, es un anticuerpo anti-CA 15-3.

7. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, el antígeno proteico TG, y el compañero de enlace, es un anticuerpo anti-TG.

8. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, el antígeno proteico CA 125, y el compañero de enlace, es un anticuerpo anti-CA 125.

9. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, los antígenos proteicos ACE y/ó CA 19-9, y los compañeros de enlace, son los anticuerpos anti-ACE y anti-CA 19-9.

10. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, las células tumorales, son capaces de secretar, como marcador tumoral, el antígeno proteico alfa foetoproteina, y el compañero de enlace, es un anticuerpo anti-AFP.

11. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que, los compañeros de enlace, son en número de dos, y son, de una forma preferente, anticuerpos anti-CA 15-3 y anti-Cath-D.

12. Procedimiento, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por el hecho de que, las etapas (iv) a (v), se reemplazan por las etapas siguientes:

(iv') adición de los anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos,

(v') visualizacion de la fluorescencia, cuando hay acoplamiento entre compañero de enlace y marcador tumoral.

13. Utilización *in vivo* del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el diagnóstico precoz y el pronóstico de la patología, en la elección de la evaluación de la eficacia de los tratamientos terapéuticos y en el diagnóstico de recaídas, en el ámbito de los cánceres sólidos.

14. Utilización, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que, el cáncer, es el cáncer de mama.

15. Utilización, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que, el cáncer, es el cáncer de próstata.

16. Utilización, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que, el cáncer, es el cáncer de tiroides.

17. Utilización, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que, el cáncer, es el cáncer de ovario.

18. Utilización, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que, el cáncer, es el cáncer colorrectal.

19. Utilización, según la reivindicación 13, **caracterizada** por el hecho de que, el cáncer, es el cáncer de hígado.

20. Utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para evaluar el potencial de supervivencia de las células tumorales circulantes, procedentes de pacientes afectados de cánceres sólidos.

21. Utilización de un equipo, a modo de "kit" de diagnóstico, que comprende una superficie de cultivo previamente revestida de uno o de varios compañeros de enlace de los marcadores tumorales específicos del cáncer sólido, del cual se quiere efectuar la investigación, el conjugado o los conjugados correspondientes, previamente marcados, para detectar y/o cuantificar las células tumorales neoplásicas no hematopoyéticas circulantes de una muestra biológica de un paciente afectado del citado cáncer sólido.

FIGURA 1A

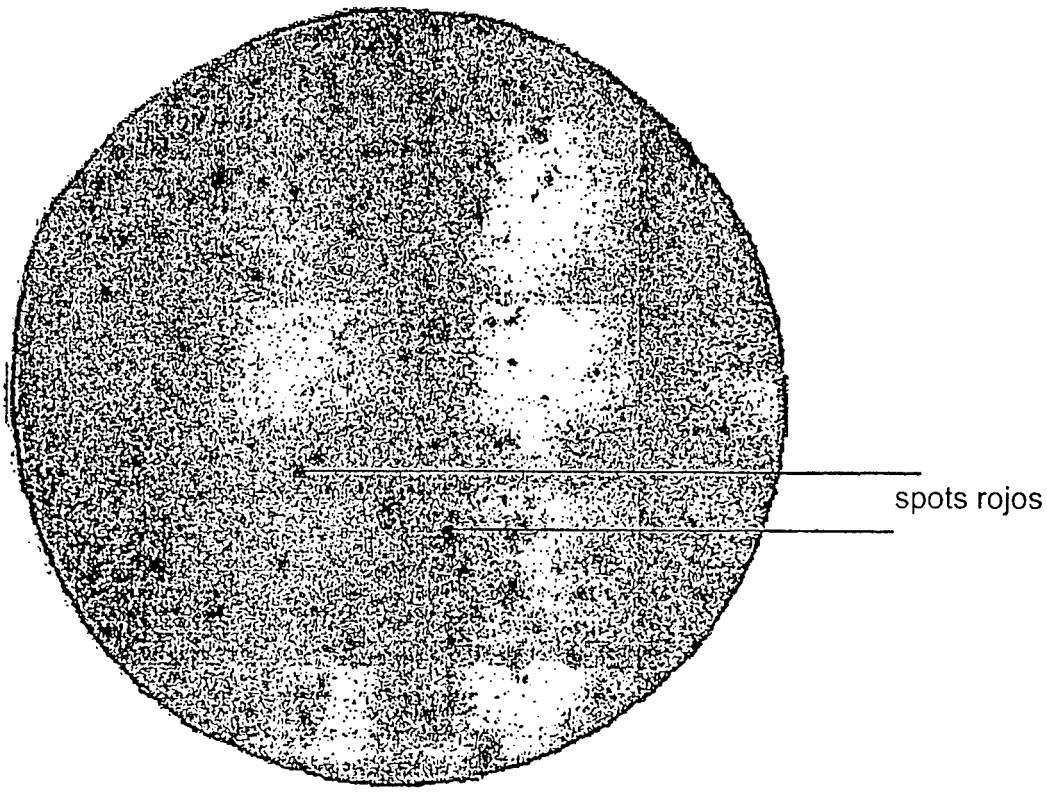


FIGURA 1B

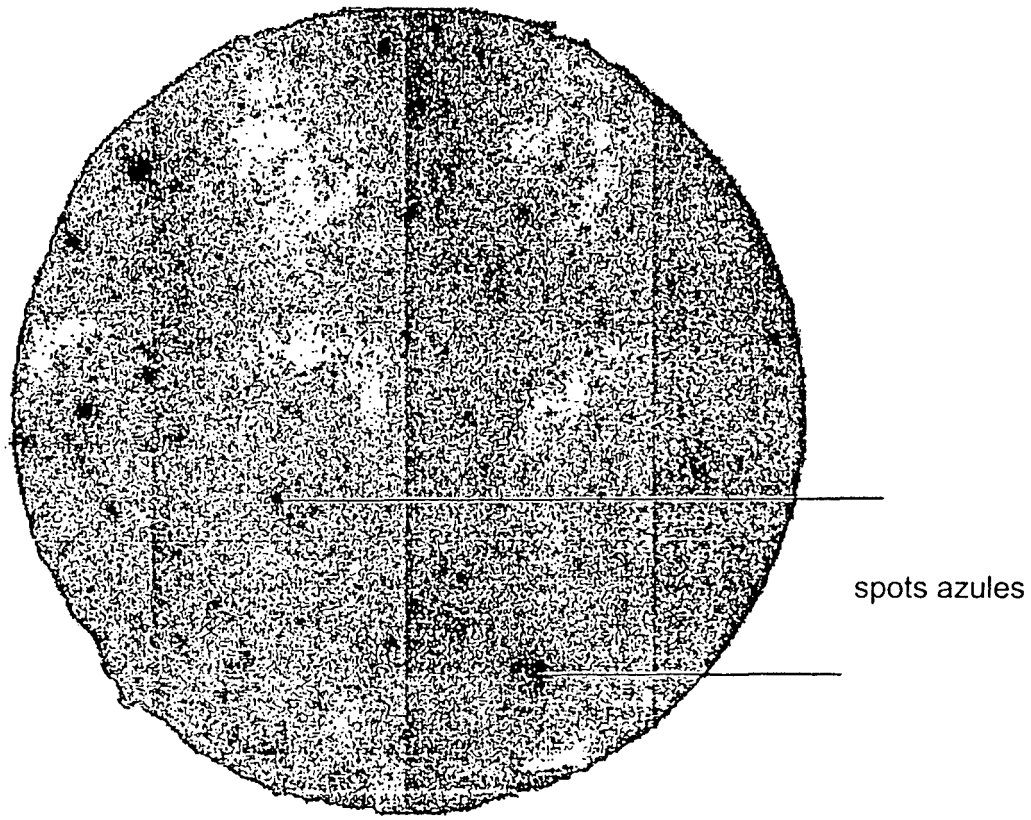


FIGURA 1C

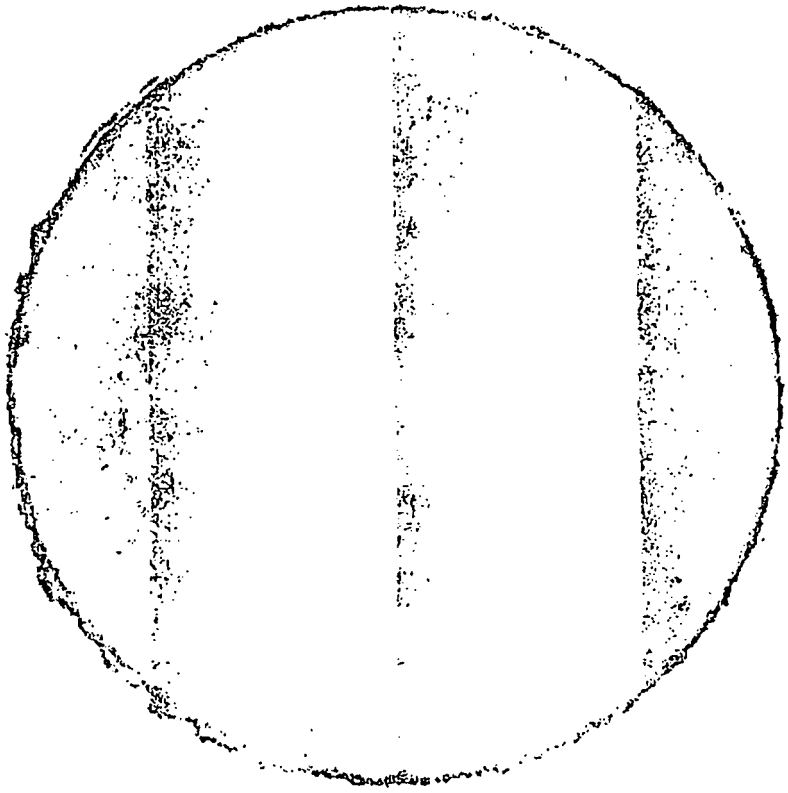


FIGURA 1D

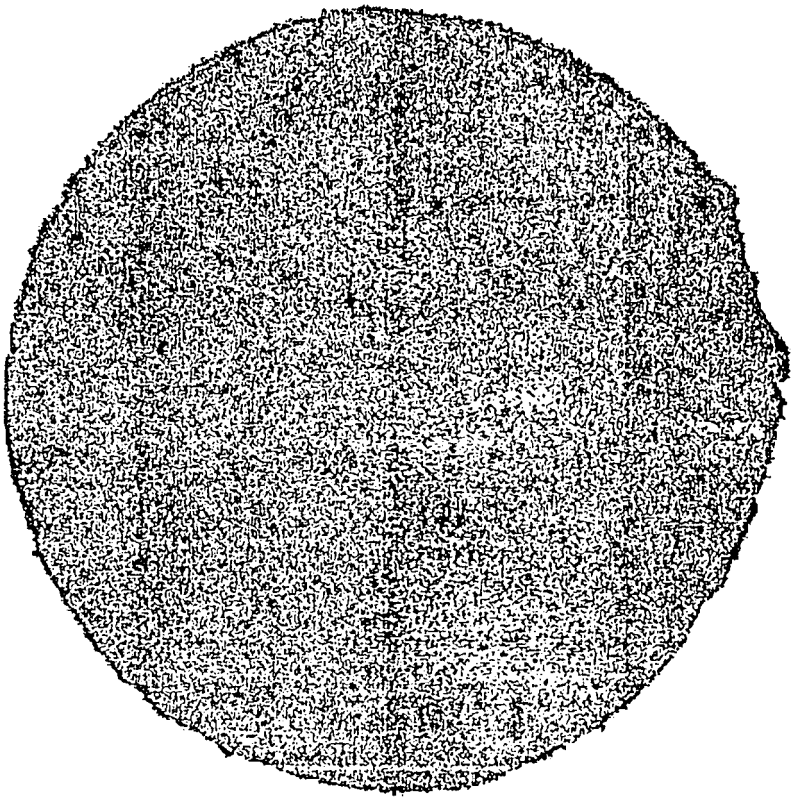


FIGURA 1E

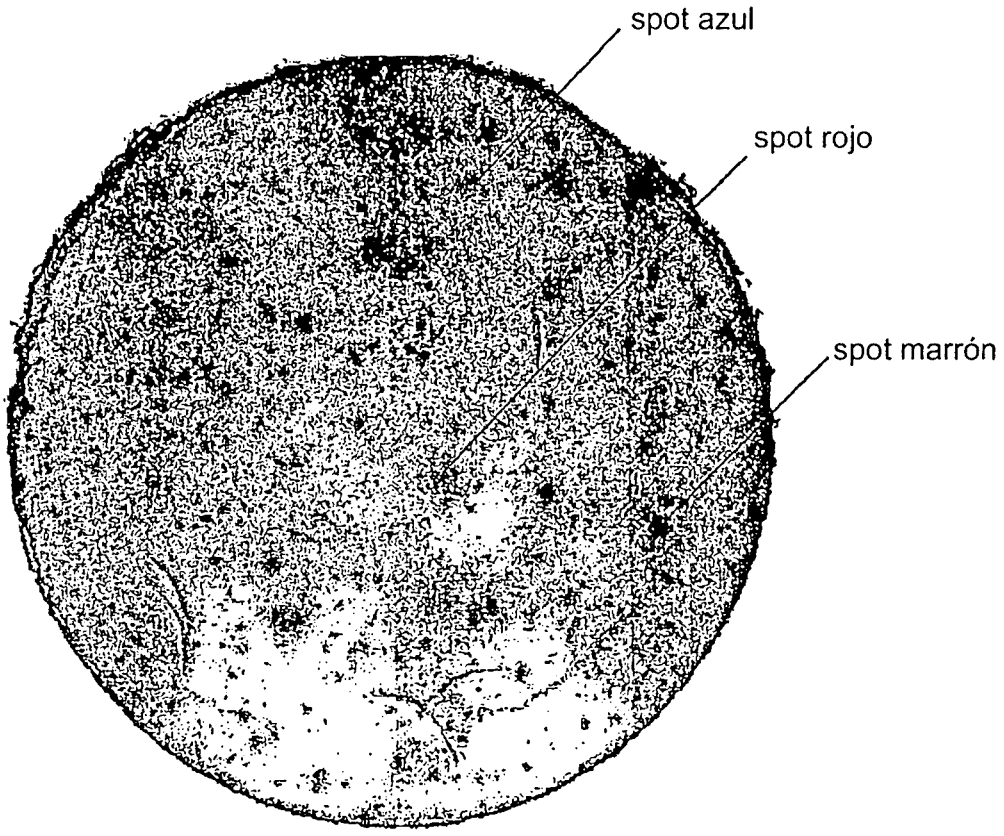


FIGURA 1F

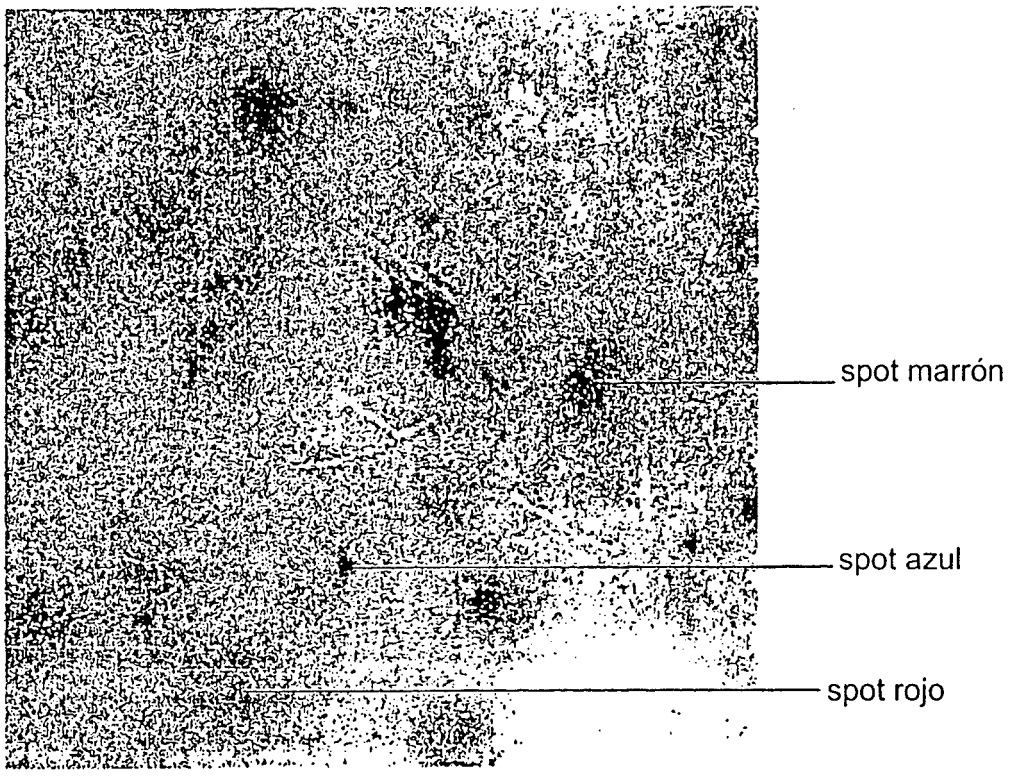
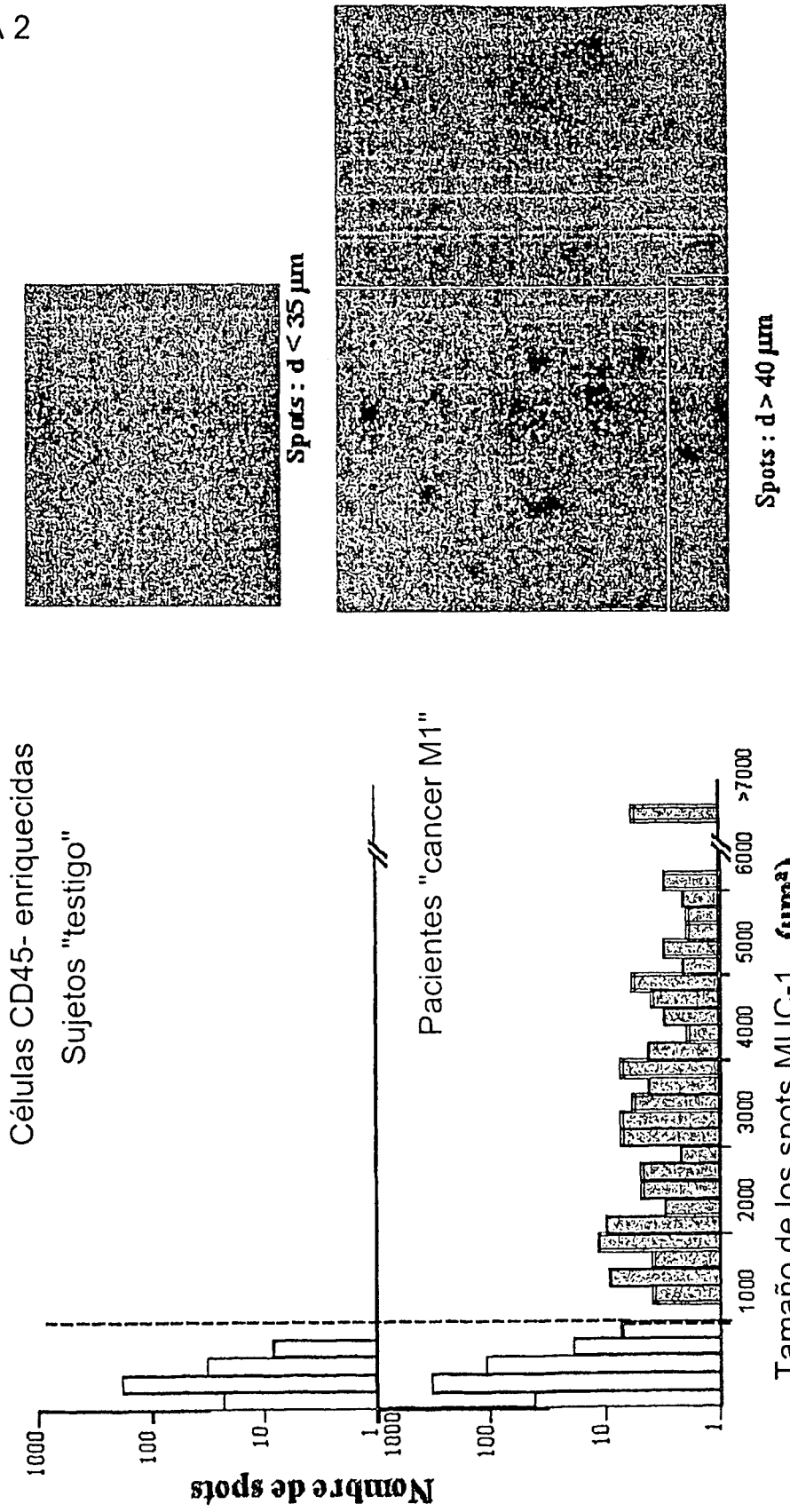


FIGURA 2


Spots : d < 35 µm
Spots : d > 40 µm
Células CD45- enriquecidas
Sujetos "testigo"
Pacientes "cancer M1"
Nombre de spots
1000
100
10
1
1000
100
10
1
1000
2000
3000
4000
5000
6000
>7000
Tamaño de los spots MUC-1 (µm²)

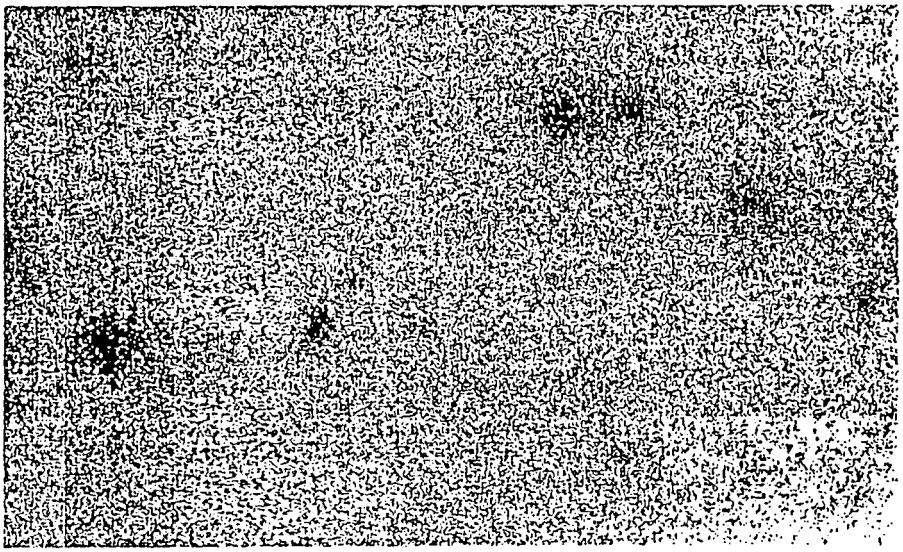



FIGURA 3