

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 553**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2018** **PCT/US2018/000082**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018** **WO18151865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2018** **E 18713032 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023** **EP 3583426**

54 Título: **Métodos para predecir la supervivencia global y sin progresión en sujetos que tienen cáncer usando células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer (CAML)**

30 Prioridad:

16.02.2017 US 201762459961 P
31.03.2017 US 201762479664 P
08.05.2017 US 201762503041 P
18.01.2018 US 201862618728 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2023

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ADAMS, DANIEL y
TANG, CHA-MEI

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 953 553 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

Métodos para predecir la supervivencia global y sin progresión en sujetos que tienen cáncer usando células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer (CAML)

5

Antecedentes

Campo de la invención

10 La presente invención generalmente se refiere al uso de biomarcadores en la sangre y otros fluidos corporales para hacer predicciones con respecto a la supervivencia global y la supervivencia sin progresión en sujetos que tienen cáncer, tal como tumores sólidos.

Técnica relacionada

15

Cuando las células tumorales se desprenden de los tumores sólidos primarios, penetran en la circulación sanguínea o linfática y, en última instancia, abandonan el torrente sanguíneo y entran en órganos o tejidos para formar metástasis. El 90 % de las muertes relacionadas con el cáncer son provocadas por el proceso metastásico. Los sitios metastásicos más comunes son el pulmón, el hígado, los huesos y el cerebro. Las células tumorales que se encuentran en la
20 circulación se denominan células tumorales circulantes (CTC). Muchas publicaciones de investigación y ensayos clínicos muestran que las CTC tienen utilidad clínica para (i) proporcionar información sobre el pronóstico de supervivencia y la reaparición del cáncer a través de la enumeración de las CTC en el torrente sanguíneo y (ii) proporcionar información sobre el tratamiento mediante el examen de los niveles de expresión de proteínas y la aparición de mutaciones y translocaciones génicas en las CTC. Sin embargo, las CTC no se asocian consistentemente
25 al desarrollo y/o la presencia de cáncer en un sujeto, incluso en pacientes con cáncer en estadio IV. Aunque las CTC se encuentran con mayor frecuencia en el estadio IV de los cánceres de mama, próstata y colorrectal, son raros en los primeros estadios del mismo cáncer. Las CTC también son raras en otros tipos de cáncer.

30 Las células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer (CAML, por sus siglas en inglés) son otro tipo de células relacionadas con el cáncer que se encuentran en la sangre de sujetos que tienen cáncer. Las CAML se asocian a todos los tumores sólidos sometidos a ensayo y a todos los estadios del cáncer. Las CAML son poliploides y de tamaño muy grande, con un tamaño de ~25 µm a ~300 µm. Estas células poliploides pueden ser CD45(-) o CD45(+) y expresan CD11c, CD14 y CD31, lo que confirma su origen como un linaje mielóide. Con frecuencia, se encuentran en el proceso de engullir CTC y residuos celulares [1,7].

35

Pueden usarse ensayos asociados a la identificación y caracterización de biomarcadores, tales como CAML, en la sangre y otros fluidos corporales para proporcionar información de pronóstico. La presente invención se refiere a proporcionar dichas herramientas a los médicos y otros objetivos importantes.

40 El documento US 2016/178630 A1 se refiere a una metodología para categorizar las células tumorales circulantes (CTC) en subpoblaciones morfológicamente distintas y para usar una de las subpoblaciones en métodos para predecir la supervivencia global de un paciente con cáncer. El documento WO 2016/033103 A1 es una solicitud anterior del presente solicitante y se refiere al descubrimiento de "Células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer" (CAML) que se describen en detalle. Por otro lado, el documento WO 2016/033103 A1 describe una asociación de la
45 presencia de CAML con tumores sólidos. El documento US 2014/315295 se refiere a microfiltros que tienen una superficie hidrófila que puede usarse para recoger componentes seleccionados tales como células de un fluido en fluidos corporales particulares como sangre entera, orina o médula ósea. El documento US 2014/315295 describe además dispositivos que comprenden dichos microfiltros, así como métodos de uso de los microfiltros en la retirada o recogida de células del fluido. Son células de ejemplo recogidas con los microfiltros CTC y CAML. El documento WO
50 2013/181532 A1 es una solicitud adicional relacionada con el uso de la presencia de CAML como biomarcador de tumores sólidos en biofluidos. En particular, la presencia de CAML puede usarse para determinar la presencia de carcinomas, la determinación rápida de la respuesta al tratamiento o la detección precoz del cáncer. El documento WO 2010/005991 A2 se refiere a un método de detección de células tumorales circulares (CTC) y métodos de detección, evaluación o estadificación del cáncer en el paciente. El método de detección comprende poner en contacto
55 una muestra de un paciente con sondas de ácido nucleico marcadas con un agente de unión a CD45.

Sumario

60 La presente invención se refiere a métodos de uso de un tipo de célula con características únicas que se encuentra en la sangre de sujetos que tienen tumores sólidos, incluyendo carcinoma, sarcoma, neuroblastoma y melanoma. Se ha demostrado que estas células circulantes, denominadas "células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer" (CAML), se asocian a la presencia de tumores sólidos en un sujeto que tiene cáncer. Se han caracterizado y descrito cinco morfologías asociadas a las CAML [1,2]. Se han encontrado CAML consistentemente en la sangre periférica de sujetos que tienen tumores sólidos en estadio I a estadio IV mediante microfiltración usando microfiltros
65 de precisión.

Las aplicaciones médicas asociadas a CAML incluyen, pero sin limitación, el uso de las células como biomarcador para proporcionar una detección precoz del cáncer y un diagnóstico del cáncer, en particular, en la detección precoz y el diagnóstico de la recaída o reaparición del cáncer, y en la determinación de la mutación del cáncer. A través de los datos presentados en el presente documento, también se demuestra que las CAML tienen utilidad clínica como biomarcador para hacer predicciones sobre la progresión de la enfermedad y la supervivencia del paciente.

Pueden usarse CAML de forma independiente como marcador de cáncer, o en combinación con células tumorales circulantes (CTC), células de transición mesenquimáticas epiteliales (EMT, por sus siglas en inglés), células endoteliales vasculares circulantes asociadas al cáncer (CAVE, por sus siglas en inglés), ADN sin células (ADNsc), ADN tumoral circulante (ADNtc), ADN metilado, biomarcadores proteómicos, metabolómicos, lipidómicos y otros para proporcionar una comprensión más completa de la enfermedad de un paciente.

Más específicamente, y en una primera realización, la presente invención se refiere a un método para predecir la supervivencia global (SG) y la supervivencia sin progresión (SSP) de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar el tamaño de las células circulantes en una muestra biológica de un primer sujeto que tiene cáncer, y comparar los resultados con un segundo sujeto que tiene cáncer, en donde se predice que la SG y la SSP del sujeto con células de mayor tamaño serán menores que la SG y la SSP del sujeto que tiene células de menor tamaño, en donde las células circulantes tienen las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.

En un aspecto, el método para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar el tamaño de las células circulantes en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene un tamaño de aproximadamente 50 μm o más, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células tiene un tamaño superior a aproximadamente 50 μm , en donde las células circulantes tienen las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.

En una segunda realización, la presente invención se refiere a un método para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar una relación de células circulantes en un volumen seleccionado de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando dicha relación es equivalente a aproximadamente 6 o más células por 7,5 ml de la muestra biológica, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer con una relación equivalente a menos de 6 células por 7,5 ml de la muestra biológica en donde las células circulantes tienen las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.

En una tercera realización, la presente invención se refiere a un método para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar el número de puntos de CEP17 en células circulantes en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene aproximadamente diez o más puntos de CEP17, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células de una muestra biológica del sujeto tiene aproximadamente diez o más puntos de CEP17, en donde las células circulantes tienen las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, la SG o la SSP, o ambas, son durante un período de al menos 12 meses. En otros aspectos de las realizaciones de la invención, la SG o la SSP, o ambas, son durante un período de al menos 24 meses.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, el tamaño de la muestra biológica es de entre 5 y 15 ml.

En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, las células circulantes se definen como que tienen cada una de las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, las células circulantes pueden definirse además como que tienen una o más de las siguientes características adicionales:

- (d) fenotipo positivo para CD14;
- (e) expresión de CD45;
- (f) expresión de EpCAM;
- (g) expresión de vimentina;
- (h) expresión de PD-L1;
- (i) expresión del marcador CD11C monocítico;
- (j) expresión del marcador CD146 endotelial;
- (k) expresión del marcador CD202b endotelial; y
- (l) expresión del marcador CD31 endotelial.

En cada uno de los aspectos y realizaciones de la invención, las células circulantes pueden denominarse "Células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer" o CAML.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, la fuente de la muestra biológica puede ser, pero sin limitación, uno o más de sangre periférica, sangre, ganglio linfático, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina. Cuando la muestra biológica es sangre, la sangre puede ser sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior, sangre de la vena femoral, sangre de la vena porta o sangre de la vena yugular, por ejemplo. La muestra puede ser una muestra fresca o una muestra crioconservada adecuadamente preparada que se descongela.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, el cáncer es un tumor sólido, cáncer en Estadio I, cáncer en Estadio II, cáncer en Estadio III, cáncer en Estadio IV, carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de esófago u otro cáncer de tumor sólido.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas para las etapas de determinación usando uno o más medios seleccionados de metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de eritrocitos, agotamiento de leucocitos, gradiente de densidad de FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo, levitación magnética y diversos chips microfluídicos, o una combinación de los mismos.

En un aspecto de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando una metodología de exclusión por tamaño que comprende el uso de un microfiltro. El microfiltro puede tener un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros. Los poros del microfiltro pueden tener una forma de poro redonda, de pista de carreras, ovalada, cuadrada y/o rectangular. El microfiltro puede tener una geometría de poros de precisión y/o una distribución de poros uniforme.

En otro aspecto de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando un chip microfluídico a través de clasificación física basada en el tamaño, clasificación hidrodinámica basada en el tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentrando células grandes o eliminando células pequeñas basándose en el tamaño.

En un aspecto adicional de la invención, las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando un ensayo de microfiltración de baja presión CellSieve™.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la intensidad de los marcadores de diferenciación celular utilizados para identificar y subtipificar las CAML.

La **Figura 2** compara la presencia de CTC frente a CAML en diferentes estadios del cáncer.

Las **Figuras 3A-3B** muestran el número promedio de CAML por tamaño en diferentes estadios del cáncer.

La **Figura 4** muestra la relación entre el tamaño de CAML y el número de puntos de CEP17 por célula.

La **Figura 5** muestra gráficos de probabilidad de supervivencia global (SG) durante 24 meses para un conjunto de descubrimiento de $n = 157$ pacientes y un conjunto de validación de $n = 158$ pacientes. Los datos se analizan para determinar el tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$. Conjunto de descubrimiento ($n = 157$); Relación de riesgos instantáneos: 3,4 (IC del 95 % = 2,1-5,6, $p < 0,001$). Conjunto de validación ($n = 158$); Relación de riesgos instantáneos: 4,2 (IC del 95 % = 2,3-7,7, $p < 0,001$).

La **Figura 6** muestra gráficos de probabilidad de supervivencia sin progresión (SSP) durante 24 meses para un conjunto de descubrimiento de $n = 157$ pacientes y un conjunto de validación de $n = 158$ pacientes. Los datos se analizan para determinar el tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$. Conjunto de descubrimiento ($n = 157$); Relación de riesgos instantáneos: 3,2 (IC del 95 % = 2,1-5,0, $p < 0,001$). Conjunto de validación ($n = 158$); Relación de riesgos instantáneos: 3,8 (IC del 95 % = 2,7-6,8, $p < 0,001$).

La **Figura 7** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) durante 24 meses analizadas para $n = 293$ muestras de pacientes para un número de CAML ≥ 6 y < 6 .

La **Figura 8** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) durante 24 meses analizadas para $n = 293$ muestras de pacientes para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 9** muestra la SSP durante 24 meses analizada para $n = 293$ muestras de pacientes separadas en Estadios I y II (panel izquierdo) y para Estadios III y IV (panel derecho) para un tamaño de CAML $< 50 \mu\text{m}$, $50\text{-}110 \mu\text{m}$ y $> 110 \mu\text{m}$.

La **Figura 10A** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes en Estadio I ($n = 62$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 10B** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes en Estadio II ($n = 72$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 10C** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes en Estadio III ($n = 69$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 10D** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes en Estadio IV ($n = 106$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 11A** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes con cáncer de mama ($n = 59$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 11B** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes con cáncer de esófago ($n = 27$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 11C** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes con cáncer pulmón no microcítico (CPNM) ($n = 59$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 11D** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes con cáncer de páncreas ($n = 59$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 11E** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes con cáncer de próstata ($n = 74$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

La **Figura 11F** muestra la SG (panel izquierdo) y la SSP (panel derecho) para pacientes con carcinoma de células renales (CCR) ($n = 37$) durante 24 meses analizados para un tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$.

Descripción detallada

El cáncer es una de las enfermedades más temidas en el mundo, que afecta a todas las poblaciones y etnias en todos los países. Aproximadamente el 40 % de los hombres y las mujeres desarrollarán cáncer en su vida. Solamente en los Estados Unidos, en un momento dado hay más de 12 millones de pacientes con cáncer, con 1,7 millones de nuevos casos de cáncer y más de 0,6 millones de muertes estimadas para 2018. Se estima que la muerte por cáncer en todo el mundo es de aproximadamente 8 millones al año, de los cuales 3 millones se producen en países desarrollados donde los pacientes tienen acceso a tratamiento.

De forma ideal, habrá diagnósticos que puedan determinar rápidamente si una terapia seleccionada está funcionando

y proporcionar un pronóstico de supervivencia.

En la presente divulgación, se presenta un tipo de célula que se encuentra de manera más consistente en la sangre de pacientes con tumores sólidos de los Estadios I-IV que cualquier otra célula relacionada con el cáncer. Estas células

Junto con las células tumorales circulantes (CTC), las CAML presentes en muestras biológicas de pacientes con cáncer pueden aislarse y caracterizarse, por ejemplo, a través del uso de métodos de exclusión por tamaño, incluyendo métodos de microfiltración. Se pueden formar microfiltros con poros lo suficientemente grandes como para permitir el paso de los eritrocitos y la mayoría de los leucocitos, reteniendo al mismo tiempo células más grandes tales como CTC y CAML. Después, las células recogidas pueden caracterizarse, ya sea directamente en los filtros o por otros medios.

Las CAML tienen muchas utilidades clínicas cuando se usan solas. Además, la caracterización de CAML en una muestra biológica puede combinarse con el ensayo de otros marcadores tales como CTC, ADN sin células y proteínas libres en sangre para mejorar adicionalmente la sensibilidad y especificidad de una técnica de diagnóstico. Esto es especialmente cierto para CAML y CTC porque pueden aislarse e identificarse al mismo tiempo usando los mismos medios.

Células tumorales circulantes

Como se define en el presente documento, las CTC asociadas a carcinomas expresan varias citoqueratinas (CK, por sus siglas en inglés). CK 8, 18, y 19 son las citoqueratinas más habitualmente expresadas y utilizadas en diagnóstico, pero el estudio no tiene por qué limitarse únicamente a estos marcadores. La superficie de las CTC de tumores sólidos por lo general expresa una molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM, por sus siglas en inglés). Sin embargo, esta expresión no es uniforme ni consistente. Las CTC no expresan ningún CD45 porque es un marcador de leucocitos. En ensayos para identificar células asociadas a tumores, tales como CTC y CAML, es suficiente usar anticuerpos contra marcadores asociados al tumor sólido tales como CK 8, 18, y 19, o anticuerpos contra CD45 o DAPI. Combinando técnicas de tinción con morfología, pueden identificarse CTC patológicamente definibles (PDCTC, por sus siglas en inglés), CTC apoptóticas y CAML [3],

las PDCTC asociadas a tumores sólidos expresan CK 8, 18, y 19, y pueden identificarse y definirse por las siguientes características:

- Núcleos "similares al cáncer" teñidos por DAPI. Los núcleos por lo general son grandes con patrones de puntos. La excepción es cuando la célula está en división. El núcleo también puede estar condensado.
- Expresión de uno o más de CK 8, 18 y 19; las CTC de cánceres epiteliales por lo general expresan al menos CK 8, 18 y 19. Las citoqueratinas tienen un patrón filamentososo.
- Falta de expresión de CD45.

Una CTC apoptótica asociada al cáncer expresa CK 8, 18, y 19 y puede identificarse y definirse por las siguientes características:

- Núcleos en degradación.
- Expresión de uno o más de CK 8, 18 y 19; no todas las citoqueratinas tienen un patrón filamentososo, pero las partes o el todo aparecen fragmentados en forma de puntos.
- Falta de expresión de CD45.

Células circulantes similares a macrófagos asociadas al cáncer (CAML)

Como se define en el presente documento, las células circulantes utilizadas en los métodos de la invención pueden denominarse "CAML". Cada referencia a "células circulantes" es sinónimo de CAML y cada referencia a "CAML" es sinónimo de células circulantes. Ya sea que se denominen CAML o "células circulantes", estas células se caracterizan por tener una o más de las siguientes características:

- Las CAML tienen un núcleo grande, poliploide y atípico o múltiples núcleos individuales, con frecuencia dispersos en la célula, aunque los nucléolos fusionados agrandados son comunes. Los núcleos de CAML generalmente varían en tamaño de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 70 µm de diámetro, más habitualmente de aproximadamente 14 µm a aproximadamente 64 µm de diámetro.
- Para muchos tipos de cáncer, las CAML expresan el marcador de cáncer de la enfermedad. Por ejemplo, las CAML asociadas a cánceres epiteliales pueden expresar CK 8, 18 o 19, vimentina, etc. Los marcadores normalmente difunden o se asocian a vacuolas y/o material ingerido. El patrón de tinción de cualquier marcador difunde casi uniformemente por toda la célula. Para los sarcomas, neuroblastomas y melanomas, pueden usarse otros marcadores asociados a los cánceres en lugar de CK 8, 18, 19.
- Las CAML pueden ser positivas para CD45 o negativas para CD45, y la presente invención abarca el uso de ambos

tipos de CAML.

- Las CAML son grandes, aproximadamente con un tamaño de 20 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros por la dimensión más larga.
- Las CAML se encuentran en muchas formas morfológicas distintas, incluyendo la forma husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, piernas delgadas o amorfa.
- Las CAML de carcinomas normalmente tienen citoqueratinas difusas.
- Si las CAML expresan EpCAM, EpCAM generalmente difunde por toda la célula o se asocia a vacuolas y/o material ingerido, y es casi uniforme en toda la célula, pero no todos las CAML expresan EpCAM, porque algunos tumores expresan muy poca o nula EpCAM.
- Si las CAML expresan un marcador, el marcador generalmente difunde por toda la célula o se asocia a vacuolas y/o material ingerido, y es casi uniforme en toda la célula, pero no todos las CAML expresan los mismos marcadores con la misma intensidad.
- Las CAML con frecuencia expresan marcadores asociados a los marcadores del origen del tumor; por ejemplo, si el tumor es de origen de cáncer de próstata y expresa PSMA, entonces las CAML de dicho paciente también expresan PSMA. Como otro ejemplo, si el tumor primario es de origen pancreático y expresa PDX-1, entonces las CAML de dicho paciente también expresan PDX-1. Como ejemplo adicional, si el tumor primario o CTC del origen del cáncer expresan CXCR-4, entonces las CAML de dicho paciente también expresan CXCR-4.
- Si el tumor primario o CTC que se origina a partir del cáncer expresa un biomarcador de una diana farmacológica, las CAML de un paciente de este tipo también expresan el biomarcador del fármaco diana. Un ejemplo de un biomarcador de este tipo de inmunoterapia es PD-L1.
- Las CAML expresan marcadores monocíticos (por ejemplo, CD11c, CD14) y marcadores endoteliales (por ejemplo, CD146, CD202b, CD31).
- Las CAML tienen la capacidad de unirse a fragmentos de Fc.

Se evaluó un amplio conjunto de marcadores en cuanto a su expresión en CAML, y los resultados se muestran en la **FIG. 1**. En un aspecto de la invención, las CAML de la presente invención expresan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o los 21 marcadores que se muestran en la Figura 1. Los marcadores se cribaron frente a 1118 CAML de 93 pacientes diferentes con diferentes tipos de cáncer. Las CAML se aislaron e identificaron inicialmente con DAPI, citoqueratina y CD45; después se volvieron a teñir secuencialmente con un total de 27 marcadores, incluyendo marcadores de mieloides/macrófagos, de leucocitos, de megacariocitos, epiteliales, endoteliales, progenitores/madre y de motilidad. Como puede observarse a partir de la Fig. 1, la expresión del marcador varía del 0 % al 96 %. Se encontró que casi todos las CAML expresan niveles de CD31 y habitualmente coexpresan citoqueratina, CD14, CXCR4, vimentina y otros marcadores. Sin embargo, aunque las CAML contenían un marcador de linaje mieloides claro (CD14), el marcador CD31 se expresó con mayor frecuencia en un 96 %.

Las CAML también se presentan con numerosos fenotipos que no parecen coincidir con la comprensión de la diferenciación celular clásica (es decir, coexpresión de CD45 [leucocito] y citoqueratina [epitelial], CD11c [macrófago] y CD41 [megacariocito], CD146 [endotelial] y CD41/CD61 [megacariocito], CD41/CD61 [megacariocito] y CD68/CD163 [macrófago eliminador]). Muchos de los marcadores aparecen en múltiples tipos celulares. Combinados, estos datos demuestran que las CAML son células derivadas de mieloides en fases precoces de su proceso de diferenciación que poseen muchos atributos fenotípicos asociados a las capacidades proangiogénicas y de células madre.

Las CAML pueden visualizarse mediante tinciones colorimétricas, tales como HyE, o tinción fluorescente de marcadores específicos como se muestra en la **FIG. 1**. Para el citoplasma, CD31 es el fenotipo más positivo. Se recomienda CD31 solo o en combinación con otros marcadores positivos en la FIG. 1, o marcadores de cáncer asociados al tumor.

En las diversas realizaciones y aspectos de la invención, las células circulantes y las CAML pueden definirse como células que tienen las siguientes características: (a) un núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula; (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 micrómetros de tamaño; y (c) una forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas. En realizaciones adicionales, las CAML pueden definirse como que también tienen una o más de las siguientes características adicionales: (d) fenotipo positivo para CD14; (e) expresión de CD45; (f) expresión de EpCAM; (g) expresión de vimentina; (h) expresión de PD-L1; (i) expresión del marcador CD11C monocítico; (j) expresión del marcador CD146 endotelial; (k) expresión del marcador CD202b endotelial; y (l) expresión del marcador CD31 endotelial.

Como se ha sugerido anteriormente, las características únicas de las CAML y CTC descritas en el presente documento las hacen muy adecuadas para su uso en metodología clínica, incluyendo métodos de detección y diagnóstico de enfermedades tales como el cáncer, de control del tratamiento, de control de la progresión y reaparición de la enfermedad.

Predecir la SG y la SSP usando el tamaño de las células

Como se sugiere en el Sumario anterior, la presente invención se refiere a métodos para predecir la supervivencia

global (SG) y la supervivencia sin progresión (SSP) de un sujeto que tiene cáncer basándose en el tamaño de las células circulantes. Estos métodos comprenden determinar el tamaño de las células circulantes en una muestra biológica de un primer sujeto que tiene cáncer, y comparar los resultados con un segundo sujeto que tiene cáncer. Se predice que la SG y la SSP del sujeto con células de mayor tamaño serán menores que la SG y la SSP del sujeto que tiene células de menor tamaño.

En aspectos preferidos de la invención, los métodos comprenden determinar el tamaño de las células circulantes en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene un tamaño de aproximadamente 50 μm o más, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células tiene un tamaño superior a aproximadamente 50 μm .

El valor de 50 μm puede considerarse un valor de corte para este método. En aspectos relacionados de este método, el valor de corte puede ser uno cualquiera de 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o 60 μm o más.

En un aspecto de la invención, los métodos de la invención comprenden determinar el tamaño de las células circulantes en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene un tamaño de aproximadamente 50 μm o más, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células tiene un tamaño superior a aproximadamente 50 μm .

Con respecto a este método, es importante reconocer que el tamaño de una célula circulante particular puede variar dependiendo del estado y de la morfología de la célula, las circunstancias en las que se determina el tamaño y la manera en la que se determina el tamaño. Debido a que los tipos de morfologías adoptadas por las células circulantes incluyen husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, etc. (como se define adicionalmente en el presente documento), el tamaño también puede variar dependiendo de los dos puntos en una célula seleccionada para la medición. Sin embargo, el tamaño de la célula se medirá generalmente entre los dos puntos más distantes del cuerpo de la célula. Por lo tanto, si la forma es redonda, se mide el diámetro de la célula. Si la forma es husiforme, puede medirse la distancia entre los dos extremos a lo largo de la longitud axial de la célula.

En cada aspecto de esta realización, las células circulantes también pueden denominarse CAML.

Predecir la SG y la SSP usando el número de células

La presente invención también se refiere a métodos para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer basándose en el número de células circulantes. Estos métodos comprenden determinar una relación de células circulantes en un volumen seleccionado de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando dicha relación es equivalente a aproximadamente 4 o más células por 7,5 ml de la muestra biológica, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer con una relación equivalente a menos de 4 células por 7,5 ml de la muestra biológica.

El valor de 4 células circulantes puede considerarse un valor de corte para este método. En aspectos relacionados de este método, el valor de corte puede ser uno cualquiera de 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 células o más por 7,5 ml de muestra biológica.

Como ejemplo adicional, los métodos de la invención comprenden determinar una relación de células circulantes en un volumen seleccionado de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando dicha relación es equivalente a aproximadamente 6 o más células por 7,5 ml de la muestra biológica, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer con una relación equivalente a menos de 6 células por 7,5 ml de la muestra biológica.

En cada aspecto de esta realización, las células circulantes también pueden denominarse CAML.

Predicción de la SG y la SSP usando el número de puntos de CEP17

La presente invención se refiere además a métodos para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer basándose en el número de puntos de CEP17 detectados en las células circulantes. Estos métodos comprenden determinar el número de puntos de CEP17 en células circulantes en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene aproximadamente 8 o más puntos de CEP17, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células de una muestra biológica del sujeto tiene aproximadamente 8 o más puntos de CEP17.

Para evitar cualquier confusión, la expresión "ninguna de las células en una muestra biológica del sujeto tiene aproximadamente 8 o más puntos de CEP17" debe entenderse que significa que cada una de las células en la muestra biológica tiene 7 o menos puntos de CEP17.

El valor de "8 o más" puntos de CEP17 puede considerarse un valor de corte para este método. En aspectos

relacionados de este método, el valor de corte puede ser uno cualquiera de 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, 12 o más, 13 o más, 14 o más, o 15 o más puntos de CEP17 o más.

En un aspecto de la invención, los métodos de la invención comprenden determinar el número de puntos de CEP17 en células circulantes en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene aproximadamente 10 o más puntos de CEP17, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células de una muestra biológica del sujeto tiene aproximadamente 10 o más puntos de CEP17. Para evitar cualquier confusión, la expresión "ninguna de las células en una muestra biológica del sujeto tiene aproximadamente 10 o más puntos de CEP17" debe entenderse que significa que cada una de las células en la muestra biológica tiene 9 o menos puntos de CEP17.

En cada aspecto de esta realización, las células circulantes también pueden denominarse CAML.

En cualquiera de los métodos de la invención, la supervivencia global (SG) o la supervivencia sin progresión (SSP), o ambas, son durante un período de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 meses, o más. En un aspecto de la invención, la SG o la SSP, o ambas, son durante un período de al menos aproximadamente 24 meses.

Como se usa en el presente documento, la supervivencia global (SG) significa el período de tiempo sobrevivido por un sujeto que tiene cáncer desde una fecha seleccionada, tal como la fecha del diagnóstico, la fecha en que comenzó el tratamiento y la fecha en que se extrae sangre para evaluar la progresión del cáncer.

Como se usa en el presente documento, la supervivencia sin progresión (SSP) significa el período de tiempo sobrevivido por un sujeto que tiene cáncer desde una fecha seleccionada, tal como la fecha en que comenzó el tratamiento o la fecha en que se extrae sangre para evaluar la progresión del cáncer, y en el que el cáncer no ha empeorado ni progresado.

En cualquiera de los métodos de la invención, será evidente que la cantidad de la muestra biológica en la que se analizan las células circulantes (CAML) puede variar. Sin embargo, para obtener un número pertinente de células cuando los métodos se basan en la determinación del tamaño de las células, la muestra biológica debe ser de al menos aproximadamente 2,5 ml. La cantidad de muestra biológica también puede ser de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 12,5, 13, 14, 15, 16, 17, 17,5, 18, 19, 20, 21, 22, 22,5, 23, 24, 25, 26, 27, 27,5, 28, 29 o 30 ml, o más. La cantidad de muestra biológica también puede ser de entre 2,5 y 20 ml, entre 5 y 15 ml, o entre 5 y 10 ml. En un aspecto de la invención, la muestra biológica es de aproximadamente 7,5 ml.

Con respecto a los métodos para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer basándose en el número de células circulantes (CAML) en una muestra biológica, se determina una relación de células circulantes (CAML) en un volumen seleccionado de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer. Se entenderá que se pueden usarse diversas cantidades de la muestra biológica, pero que se determina una relación entre el número de células en la muestra y el tamaño de la muestra y se compara entre sujetos. Por ejemplo, una relación de 8 células en 15 ml de una muestra equivale a 4 células en 7,5 ml de una muestra y a 2 células en 3,75 ml de una muestra.

En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, las células circulantes (CAML) pueden definirse como que tienen cada una de las siguientes características:

- (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en la misma célula;
- (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
- (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.

En determinados aspectos de las realizaciones de la invención, las células circulantes (CAML) pueden definirse además como que tienen una o más de las siguientes características adicionales:

- (d) fenotipo positivo para CD14;
- (e) expresión de CD45;
- (f) expresión de EpCAM;
- (g) expresión de vimentina;
- (h) expresión de PD-L1;
- (i) expresión del marcador CD11C monocítico;
- (j) expresión del marcador CD146 endotelial;
- (k) expresión del marcador CD202b endotelial; y
- (l) expresión del marcador CD31 endotelial.

En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, la fuente de la muestra biológica puede ser, pero sin limitación, uno o más de sangre periférica, sangre, ganglio linfático, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y

orina. Cuando la muestra biológica es sangre, la sangre puede ser sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior, sangre de la vena femoral, sangre de la vena porta o sangre de la vena yugular, por ejemplo. La muestra puede ser una muestra fresca o una muestra crioconservada que se descongela [8].

- 5 Cuando se comparan los tamaños de las células circulantes (CAML) entre dos sujetos que tienen cáncer, los sujetos tienen el mismo tipo de cáncer. Sin embargo, puede ser difícil hacer coincidir totalmente a dos sujetos en términos del estadio del cáncer, la tasa de progresión del cáncer, los antecedentes de tratamiento y los antecedentes de remisión y/o reaparición del cáncer, entre otros factores. Por lo tanto, debe entenderse que puede haber algunas variaciones en las características de los cánceres de dos sujetos que se comparan en este método.

- 10 En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, el cáncer es un tumor sólido, cáncer en Estadio I, cáncer en Estadio II, cáncer en Estadio III, cáncer en Estadio IV, carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de esófago u otro cáncer de tumor sólido. El experto en la materia apreciará que los métodos de la invención no se limitan a formas o tipos particulares de cáncer y que pueden ponerse en práctica en asociación con una amplia diversidad de cánceres.

- 15 En cada una de las realizaciones y aspectos de la invención, las células circulantes (CAML) se aíslan de las muestras biológicas para las etapas de determinación usando uno o más medios seleccionados de metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de eritrocitos, agotamiento de leucocitos, gradiente de densidad de FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo, levitación magnética y diversos chips microfluídicos, o una combinación de los mismos. En un aspecto particular, la metodología de exclusión por tamaño comprende el uso de un microfiltro.

- 20 En un aspecto de la invención, las células circulantes (CAML) se aíslan de las muestras biológicas usando una metodología de exclusión por tamaño que comprende el uso de un microfiltro. Los microfiltros adecuados pueden tener una diversidad de formas y tamaños de poros. El microfiltro puede tener un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros. En determinados aspectos de la invención, el tamaño de poro es de entre aproximadamente 5 y 10 micrómetros; en otros aspectos, el tamaño de poro es de entre aproximadamente 7 y 8 micrómetros. Los tamaños de poro más grandes eliminarán la mayor parte de la contaminación por leucocitos en el filtro. Los poros del microfiltro pueden tener una forma de poro redonda, de pista de carreras, ovalada, cuadrada y/o rectangular. El microfiltro puede tener una geometría de poros de precisión y/o una distribución de poros uniforme.

- 25 En otro aspecto de la invención, las células circulantes (CAML) se aíslan de las muestras biológicas usando un chip microfluídico a través de clasificación física basada en el tamaño, clasificación hidrodinámica basada en el tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentrando células grandes o eliminando células pequeñas basándose en el tamaño. La eficiencia de captura de la célula circulante (CAML) puede variar dependiendo del método de recogida. El tamaño de la célula circulante (CAML) que puede capturarse en diferentes plataformas también puede variar. El principio de usar el tamaño de las células circulantes para determinar el pronóstico y la supervivencia es el mismo, pero las estadísticas variarán. La recogida de células circulantes con microfiltros CellSieve™ proporciona una eficiencia de captura del 100 % y células de alta calidad.

- 30 En otro aspecto de la invención está el tubo de extracción de sangre. Los tubos de extracción de sangre CellSave (Menarini Silicon Biosystems Inc., San Diego, CA) proporcionan una morfología y un tamaño celular estables. Otros tubos de extracción de sangre disponibles no proporcionan estabilidad celular. Las células pueden agrandarse e incluso reventar en la mayoría de los otros tubos de extracción de sangre.

- 35 Otro aspecto de la invención es identificar células grandes en la muestra sin identificar específicamente las células como células CAML en sí, en su lugar, simplemente identificar las células basándose en el tamaño del citoplasma y el núcleo. Son ejemplos las técnicas que usan tinciones métricas de color, tales como las tinciones HyE, o simplemente observar las células CK (+).

- 40 En un aspecto adicional de la invención, las células circulantes (CAML) se aíslan de las muestras biológicas usando un ensayo de microfiltración de baja presión CellSieve™.

Ejemplos

Recogida y procesamiento de muestras

- 45 En cada uno de los Ejemplos proporcionados en el presente documento y que se esbozan a continuación, la sangre periférica se recogió en tubos CellSave (Menarini Silicon Biosystems Inc., San Diego, CA) y se procesó en 96 horas. Se usó la técnica de microfiltración CellSieve™ para recoger todas las células asociadas al cáncer (CTC, EMT, CEC y CAML) en la muestra de sangre. Los microfiltros CellSieve™ tienen más de 160.000 poros en una matriz uniforme con un diámetro de poro de 7 µm dentro de un área de 9 mm. Los reactivos incluyen tampón de prefijación, tampón de posfijación, tampón de permeabilización y un cóctel de anticuerpos. La técnica para realizar la filtración utilizó una

bomba de jeringa ajustada a 5 ml/min [6] o una bomba de vacío [4], El proceso de filtración comenzó prefijando 7,5 ml de sangre en 7,5 ml de tampón de prefijación antes de pasar por el filtro. Después, el filtro y las células capturadas se sometieron a lavado, posfijación, lavado, permeabilización y lavado. Después, las células capturadas en el filtro se tiñeron con un cóctel de anticuerpos que consistía en FITC-anti-Citoqueratina 8, 18, 19; EpCAM conjugada con ficoeritrina (PE); y Cy5-anti-CD45(5), seguido de lavado. Los filtros se colocaron en un portaobjetos de microscopio y se cubrieron con Fluoromount-G/DAPI (Southern Biotech). Se usó un microscopio fluorescente Olympus BX54WI con Carl Zeiss AxioCam para obtener imágenes de células usando cubos fluorescentes específicos y una cámara monocromática. Las exposiciones se preestablecieron como 3 segundos (Cy5), 2 segundos (PE), 100-750 ms (FITC) y 10-50 ms (DAPI) para comparaciones de señales iguales entre células. Se usó un Zen2011 Blue (Carl Zeiss) para procesar las imágenes.

Debido a que algunos cánceres no siempre presentan expresiones altas de CK y EpCAM, las células del filtro se volvieron a teñir con CD31 y/o CD14 para mejorar los recuentos de CAML. La técnica de retención fue la publicada [5], Después, se volvieron a formar imágenes de las células. CD31 aumentó el recuento de CAML para el cáncer de pulmón.

Frecuencia de CTC y CAML en sangre de pacientes con cáncer

Las PDCTC rara vez se encuentran en los primeros estadios del cáncer. Aunque las PDCTC se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con cáncer de mama y de próstata en estadio III y IV, se observan con frecuencias bajas en la mayoría de los demás tumores sólidos. Las CAML se encuentran más habitualmente.

A modo de ejemplo, se obtuvieron 7,5 ml de sangre entera periférica de 293 pacientes con cáncer (mama (n = 59), próstata (n = 52), páncreas (n = 59), pulmón (n = 59), esófago (n = 27) y carcinoma de células renales (n = 37)) y 30 controles sanos. Las muestras se analizaron usando el ensayo de microfiltración CellSieve™.

Como puede observarse a partir de la **FIG. 2**, se encontró que las CAML eran más comunes que las PDCTC. Se encontraron CAML en el 93 % de las muestras de pacientes, incluyendo pacientes pre-metastásicos en Estadio I (n = 60) (84 %), Estadio II (n = 62) (94 %), Estadio III (n = 65) (95 %) y pacientes en Estadio IV metastásico (n = 97) (97 %) y 9 sin estadificar (indeterminado), pero estaban ausentes en todos los controles sanos. Por lo tanto, las CAML se encuentran en altos porcentajes en estadios precoces de tumores sólidos, mientras que las CTC, no.

Número de CAML y variación de tamaño en función del estadio

Las **FIG. 3A** y **3B** analizaron el número y el tamaño de CAML basándose en el estadio para las muestras de **FIG. 2**. El número promedio de CAML aumenta a medida que aumenta el estadio. El número promedio de CAML con el tamaño, de extremo a extremo, de entre 25-50 µm, es aproximadamente el mismo para todos los estadios. Sin embargo, el número promedio de tamaños de CAML de 50-100 µm y el tamaño >100 µm aumenta con el estadio como se muestra en la **FIG. 3B**.

Correlación del tamaño de CAML con el número de puntos de CEP17 en el Área Nuclear

Se postuló que el aumento del tamaño de CAML era el resultado de que CAML engullen células tumorales y material tumoral. De hecho, un experimento demostró que el número de puntos de la sonda 17 de enumeración cromosómica (CEP17), un indicador del número de núcleos envueltos, se correlaciona bien con el tamaño de las células. La Fig. 4 muestra que las CAML de tamaño >50 µm tienen más puntos de CEP17 que las CAML de entre 25 y 50 µm de tamaño. Los datos también sugieren que un tamaño de CAML de 50 µm es una línea divisoria consistente con los resultados sobre la progresión de la enfermedad presentados en la Fig. 3B.

Desarrollo de criterios de tamaño para determinar la agresividad de la enfermedad

Las **FIG. 3** y **4** sugieren que pueden usarse 50 µm para separar enfermedades agresivas. Se analizaron 7,5 ml de sangre completa periférica usando el ensayo de microfiltración CellSieve™. Un conjunto de descubrimiento de 157 pacientes seguidos durante 24 meses de una diversidad de cánceres y estadios se analizó para determinar la SG, curvas discontinuas en la **FIG. 5**, y la supervivencia sin progresión, curvas discontinuas en la **FIG. 6**. La relación de riesgos instantáneos para la SG es de 3,4 y un IC del 95 % = 2,1-5,6 con p < 0,001. La relación de riesgos instantáneos para la SSP es de 3,2 y un IC del 95 % = 2,1-5,0 con p < 0,001. Esto indica que los pacientes con tamaños de CAML ≥50 µm tienen una SSP y una SG más cortas.

Se analizó un conjunto de validación de 158 pacientes de una diversidad similar de cánceres y estadios para la SG, curvas continuas en la **FIG. 5**, y la SSP, curvas sólidas en la **FIG. 6**. La relación de riesgos instantáneos para la SG es de 4,2 y un IC del 95 % = 2,3-7,7 con p < 0,001. La relación de riesgos instantáneos para la SSP es de 3,8 y un IC del 95 % = 2,7-6,8 con p < 0,001. Los resultados de la validación concuerdan bien con los resultados del descubrimiento.

Análisis multivariable e información pronóstica del tamaño de CAML

Basándose en los datos que se muestran en las FIG. 5 y 6, se realizó un análisis multivariante para la SG y la SSP en $n = 293$ muestras de pacientes descritas anteriormente. Se realizó un seguimiento de los pacientes durante 24 meses. Se realizó un análisis multivariable que se muestra en la tabla a continuación. Muestra que el tamaño de CAML de 50 μm es el parámetro más importante para determinar la SG y la SSP. Cuanto menor sea el valor de p , mayor será la probabilidad de que las estadísticas sean precisas.

Tabla 1

Variable	SG (valor de p)	SSP (valor de p)
Estadio	0,866	0,751
N.º de CTC (<5 frente a ≥ 5)	0,995	0,136
N.º CAML (<6 frente a ≥ 6)	0,816	0,244
Tamaño de CAML (<50 μm frente a $\geq 50 \mu\text{m}$)	0,015	0,000
Quimioterapia/dirigida/ninguna	0,056	0,645
Metastásico positivo frente a negativo	0,678	0,165
Ganglio negativo, local, distante	0,017	0,231
Tamaño del tumor (T1, T2, T3 o T4)	0,012	0,485
H/M	0,036	0,796
Edad	0,088	0,066
Raza caucásica/negra/asiática/hispana)	0,152	0,055

Los análisis por SG y SSP basados en el número de CAML se muestran en la **FIG. 7**. Estos datos muestran que cuando el número de CAML en una muestra de sangre periférica de 7,5 ml es ≥ 6 CAML, tanto la SG como la SSP disminuyen en comparación con un paciente que tiene < 6 CAML en una muestra del mismo tamaño.

Se presentan datos adicionales con la SG y la SSP en la **FIG. 8**. Los datos presentados en la **FIG. 8** se basan en el tamaño de CAML: $\geq 50 \mu\text{m}$ frente a $< 50 \mu\text{m}$. Como indica el valor de p , el tamaño de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ es muy importante para predecir un mal pronóstico.

La **FIG. 9** separó los gráficos en tres tamaños de CAML diferentes: $< 50 \mu\text{m}$, $50-100 \mu\text{m}$ y $> 100 \mu\text{m}$. Está claro que cuanto mayor es el tamaño de CAML, peor es el pronóstico. También es importante tener en cuenta que el tamaño de CAML es importante para determinar el pronóstico incluso para los Estadios I y II (figura de la izquierda).

Se usó un tamaño de muestra más grande de $n = 315$ para permitir la demostración de la utilidad del tamaño de CAML para predecir el concepto de supervivencia y progresión en todos los estadios y los diversos tipos de cáncer. Los 315 pacientes con cáncer son de (mama ($n = 59$), próstata ($n = 74$), páncreas ($n = 59$), pulmón ($n = 59$), esófago ($n = 27$) y carcinoma de células renales ($n = 37$)). Están en el Estadio I (62), Estadio II (72), Estadio III ($n = 69$), Estadio IV (106) y 6 sin estadificar.

Las **FIG. 10A-10D** proporcionan información detallada de SG (figura de la izquierda) y SSP (figura de la derecha) para tamaños de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$ para los Estadios I, II, III y IV, respectivamente.

Las **FIG. 11A-11F** proporcionan información detallada de SG (figura de la izquierda) y SSP (figura de la derecha) para tamaños de CAML $\geq 50 \mu\text{m}$ y $< 50 \mu\text{m}$ para el cáncer de mama, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer pancreático, cáncer de próstata y carcinoma de células renales, respectivamente. Por estadio o por cáncer, el tamaño de CAML $> 50 \mu\text{m}$ indica una SG y una SSP deficientes. El corte de tamaño óptimo puede cambiar ligeramente dependiendo del tipo de cáncer para obtener un valor de p óptimo.

CITAS

- Adams, D., et al., *Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors*. PNAS 2014, 111(9): 3514-3519.
- Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2013/181532, con fecha del 5 de diciembre de 2013.
- Adams, D. L., et al., *Cytometric characterization of Circulating Tumor Cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch® CTC test*. Cytometry Parte A 2015; 87A: 137-144.
- Adams DL, et al. *The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters*. RSC Adv 2014, 4: 4334-4342.
- Adams et al., *Multi-phenotypic subtyping of circulating tumor cells using sequential fluorescent quenching and restaining*, Scientific Reports 2016, 6:33488 | DOI: 10.1038/srep33488.
- Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2013/078409, con fecha del jueves, 30 de mayo de 2013.

7. Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2016/33103, con fecha del jueves, 3 de marzo de 2016.
8. Zhu P, *et al.*, *Detection of Tumor-Associated Cells in Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cell Samples for Retrospective Analysis*, *J of Translational Medicine*, 2016, 14:198. DOI: 10.1186/s12967-016-0953-2.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la supervivencia global (SG) y la supervivencia sin progresión (SSP) de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar el tamaño de las células circulantes (CAML) en una muestra biológica de un primer sujeto que tiene cáncer, y comparar los resultados con un segundo sujeto que tiene cáncer, en donde se predice que la SG y la SSP del sujeto con células de mayor tamaño serán menores que la SG y la SSP del sujeto que tiene células de menor tamaño, en donde las células circulantes tienen las siguientes características:
 - (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
 - (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
 - (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.
2. Un método para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar el tamaño de las células circulantes (CAML) en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene un tamaño de aproximadamente 50 μm o más, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células tiene un tamaño superior a aproximadamente 50 μm , en donde las células circulantes tienen las siguientes características:
 - (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
 - (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
 - (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.
3. Un método para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar una relación de células circulantes (CAML) en un volumen seleccionado de una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando dicha relación es equivalente a aproximadamente 6 o más células por 7,5 ml de la muestra biológica, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer con una relación equivalente a menos de 6 células por 7,5 ml de la muestra biológica en donde las células circulantes tienen las siguientes características:
 - (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
 - (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
 - (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.
4. Un método para predecir la SG y la SSP de un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo dicho método determinar el número de puntos de CEP17 en células circulantes (CAML) en una muestra biológica de un sujeto que tiene cáncer, en donde cuando al menos una célula en dicha muestra tiene aproximadamente diez o más puntos de CEP17, se predice que la SG y la SSP del sujeto son inferiores a las de un sujeto que tiene cáncer en el que ninguna de las células de una muestra biológica del sujeto tiene aproximadamente diez o más puntos de CEP17, en donde las células circulantes tienen las siguientes características:
 - (a) núcleo poliploide atípico grande de un tamaño de aproximadamente 14-64 μm , o múltiples núcleos en una única célula;
 - (b) tamaño de célula de aproximadamente 20-300 μm de tamaño; y
 - (c) forma morfológica seleccionada del grupo que consiste en husiforme, de tipo renacuajo, redonda, oblonga, con dos piernas, con más de dos piernas, de piernas delgadas y amorfas.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha SG y/o SSP es durante un período de al menos 12 meses, preferentemente durante un período de al menos 24 meses.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el tamaño de la muestra biológica es de entre 5 y 15 ml.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las células circulantes tienen una o más de las siguientes características adicionales:
 - (d) fenotipo positivo para CD14;
 - (e) expresión de CD45;
 - (f) expresión de EpCAM;
 - (g) expresión de vimentina;
 - (h) expresión de PD-L1;

- (i) expresión del marcador CD11C monocítico;
- (j) expresión del marcador CD146 endotelial;
- (k) expresión del marcador CD202b endotelial; y
- (l) expresión del marcador CD31 endotelial.

- 5 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la fuente de la muestra biológica es uno o más de sangre periférica, sangre, ganglio linfático, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido y orina.
- 10 9. El método de la reivindicación 8, en donde la muestra biológica es sangre de la vena antecubital, sangre de la vena cava inferior, sangre de la vena femoral, sangre de la vena porta o sangre de la vena yugular.
- 15 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cáncer es un tumor sólido, cáncer en Estadio I, cáncer en Estadio II, cáncer en Estadio III, cáncer en Estadio IV, carcinoma, sarcoma, neuroblastoma, melanoma, cáncer de células epiteliales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de esófago u otro cáncer de tumor sólido.
- 20 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas para las etapas de determinación usando uno o más medios seleccionados del grupo que consiste en metodología de exclusión por tamaño, inmunocaptura, lisis de eritrocitos, agotamiento de leucocitos, gradiente de densidad de FICOLL, electroforesis, dielectroforesis, citometría de flujo, levitación magnética y diversos chips microfluídicos, o una combinación de los mismos.
- 25 12. El método de la reivindicación 11, en donde las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas usando una metodología de exclusión por tamaño que comprende el uso de un microfiltro.
- 30 13. El método de la reivindicación 12, en donde el microfiltro tiene un tamaño de poro que varía de aproximadamente 5 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros, en donde los poros del microfiltro tienen forma de poro redonda, de pista de carreras, ovalada, cuadrada y rectangular, en donde el microfiltro tiene una geometría de poros de precisión y una distribución de poros uniforme.
- 35 14. El método de la reivindicación 11, en donde las células circulantes se aíslan usando un chip microfluidico a través de clasificación física basada en el tamaño, clasificación hidrodinámica basada en el tamaño, agrupación, atrapamiento, inmunocaptura, concentrando células grandes o eliminando células pequeñas basándose en el tamaño.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las células circulantes se aíslan de las muestras biológicas para las etapas de determinación usando un ensayo de microfiltración a baja presión con microfiltros que tienen más de 160.000 poros en una matriz uniforme con un diámetro de poro de 7 μm dentro de un área de 9 mm.

Figura 1

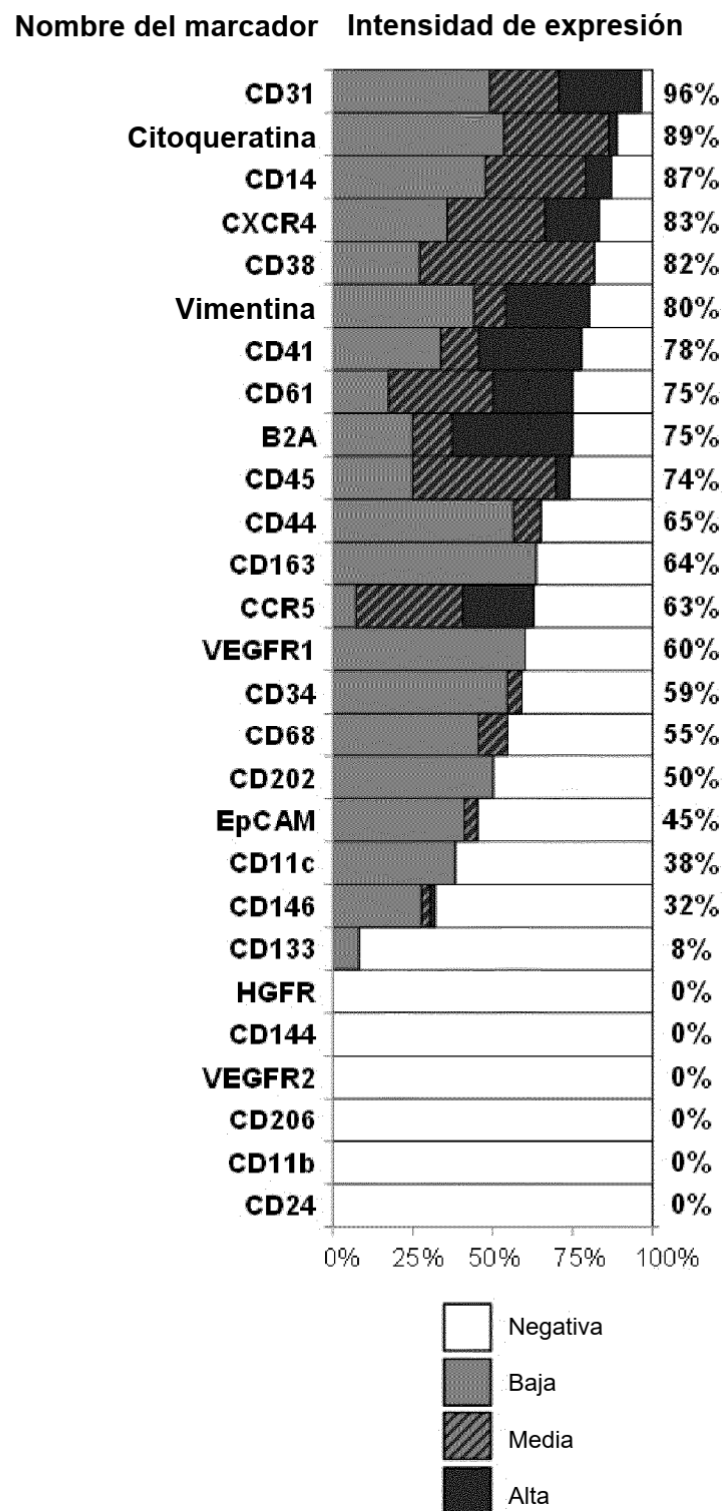


Figura 2

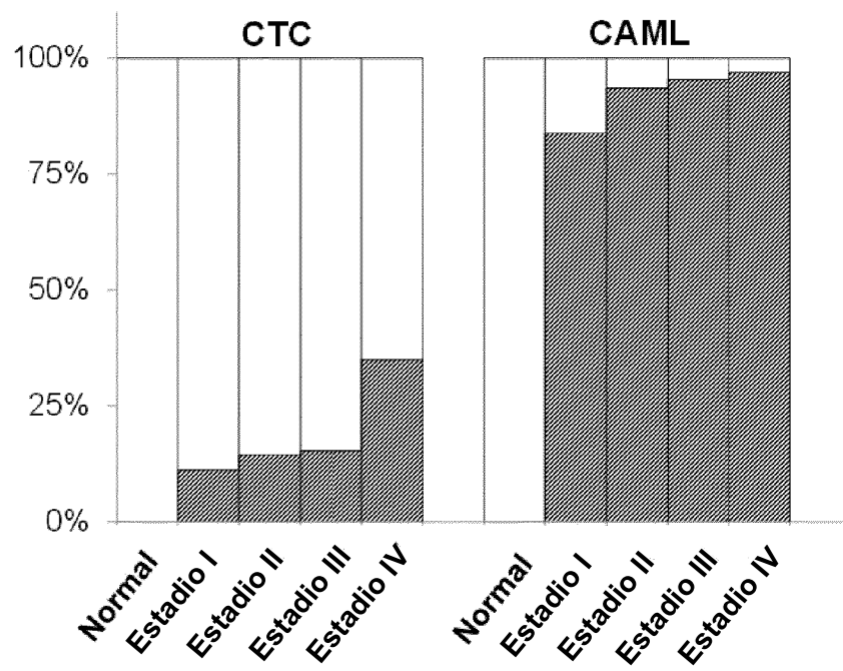


Figura 3A

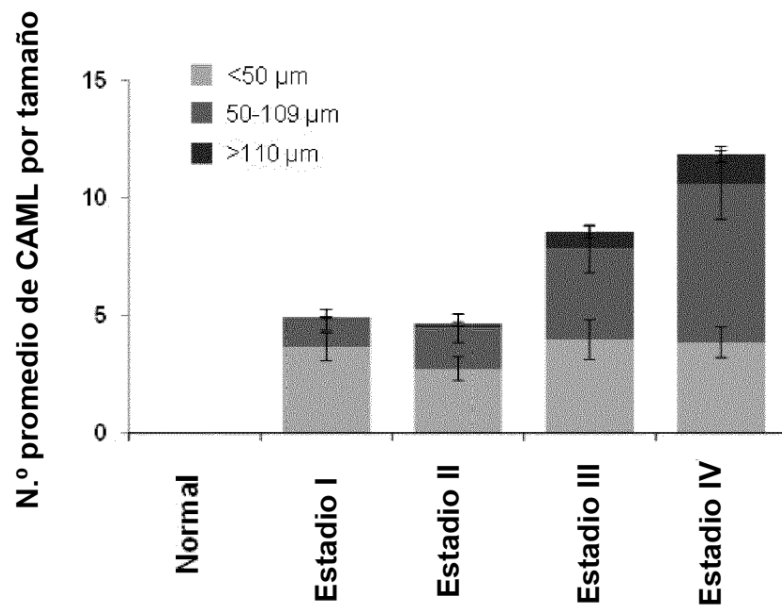


Figura 3B

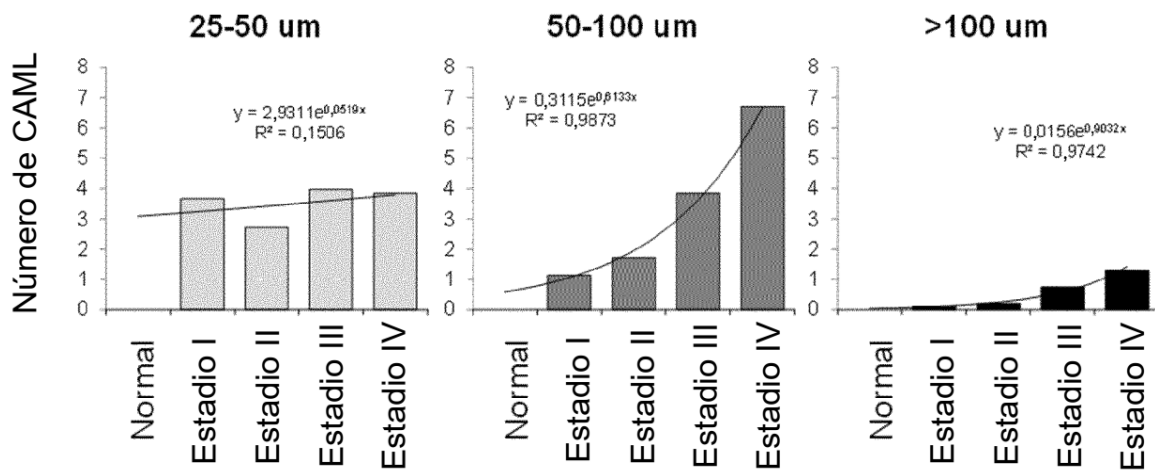


Figura 4

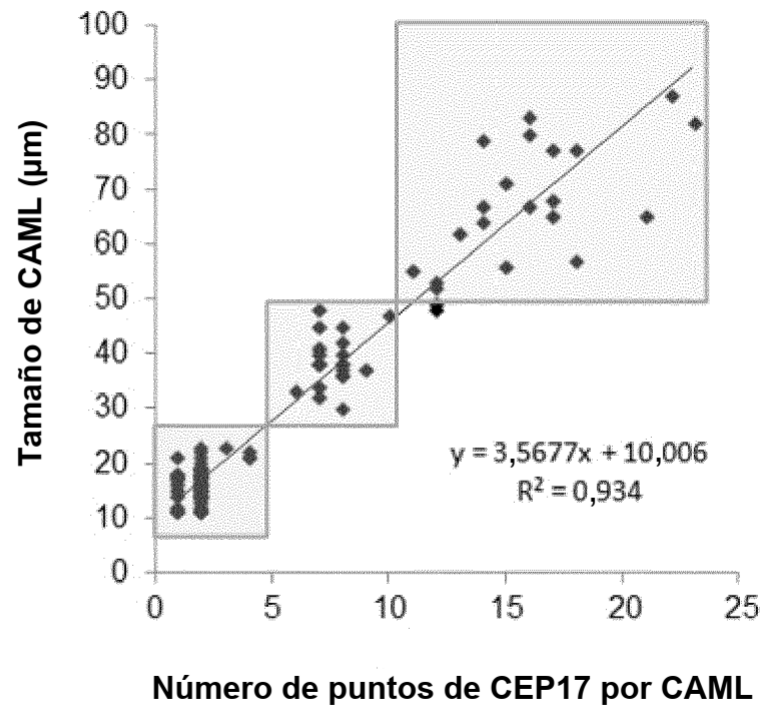


Figura 5

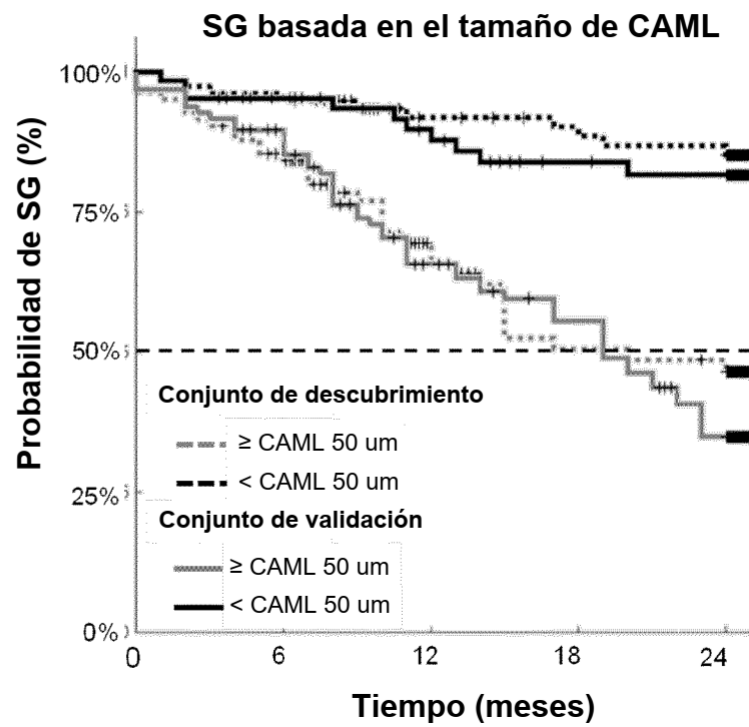


Figura 6

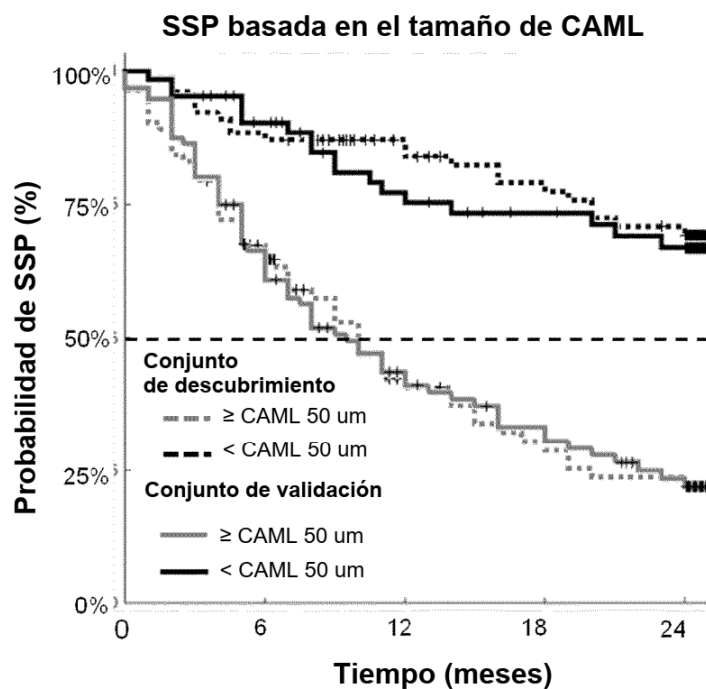


Figura 7

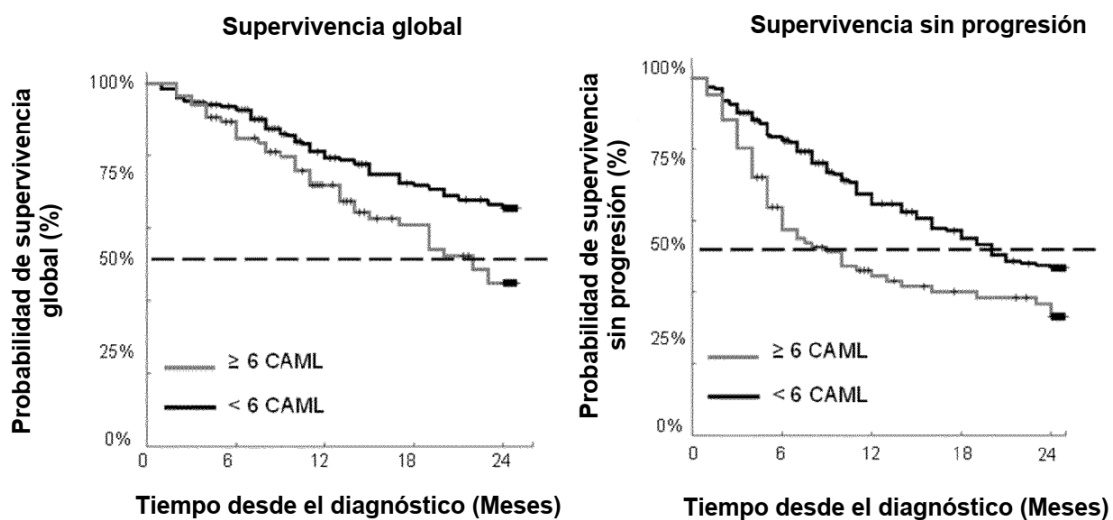
(RRI = **1,9**, IC del 95 % = 1,2-3,0, p = 0,006)(RRI = **1,8**, IC del 95 % = 1,2-2,7, p = 0,003)

Figura 8

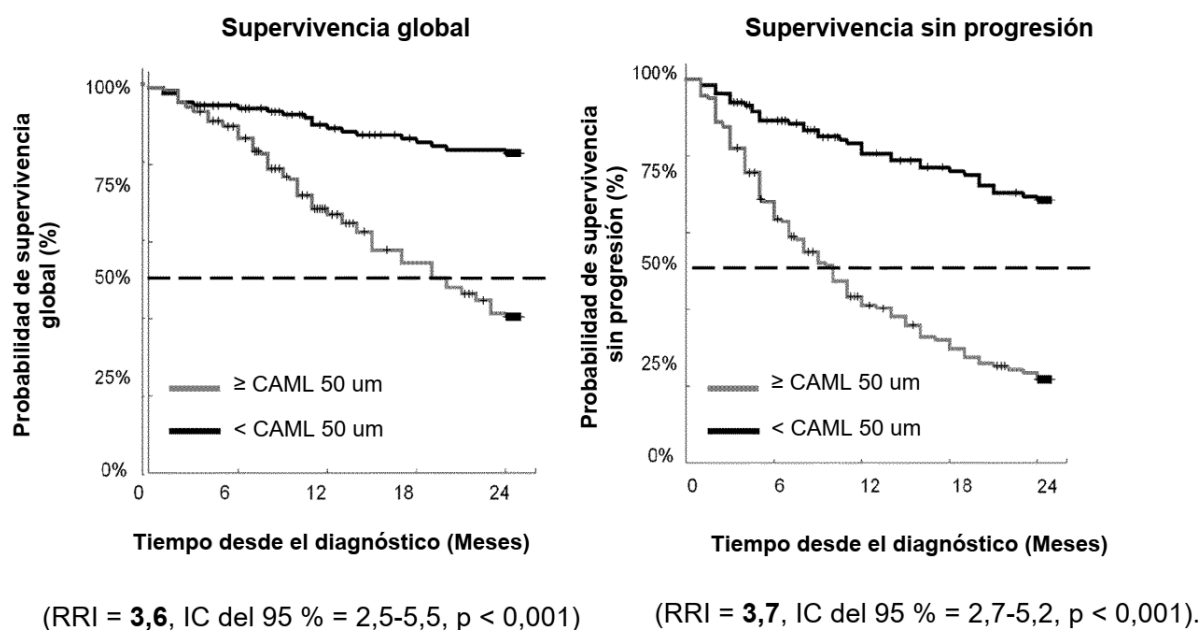


Figura 9

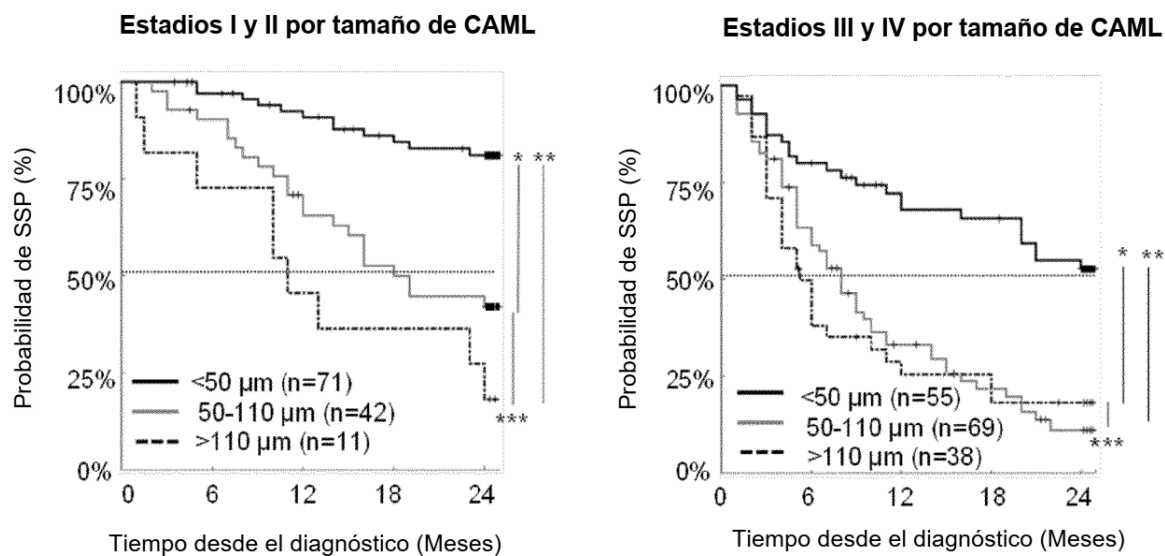


Figura 10A

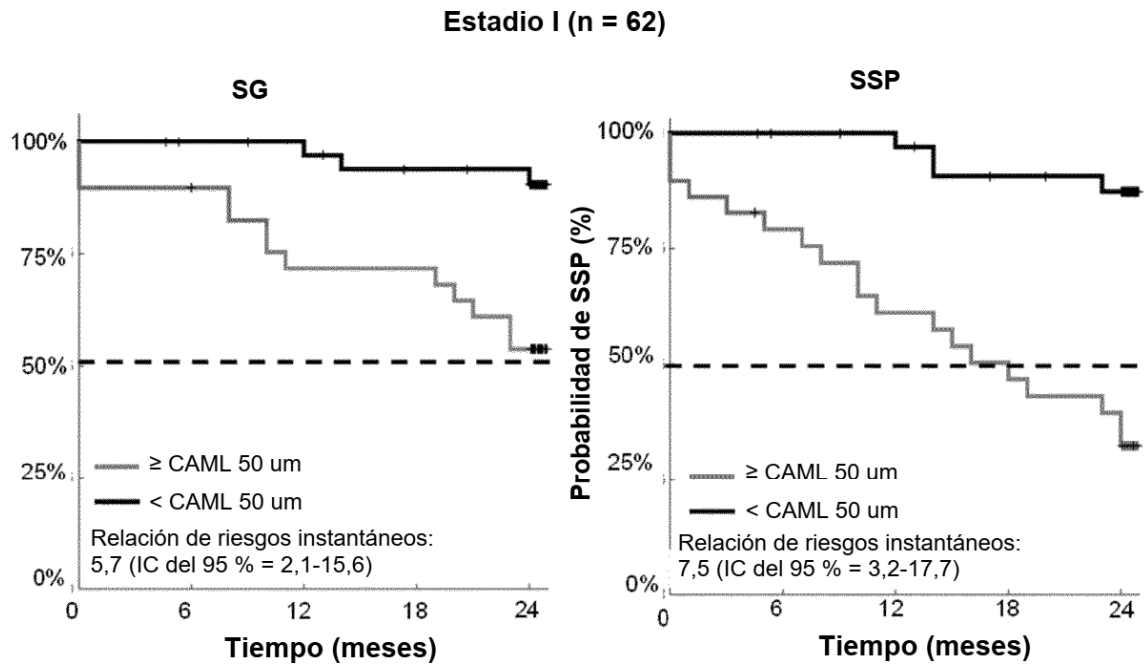


Figura 10B

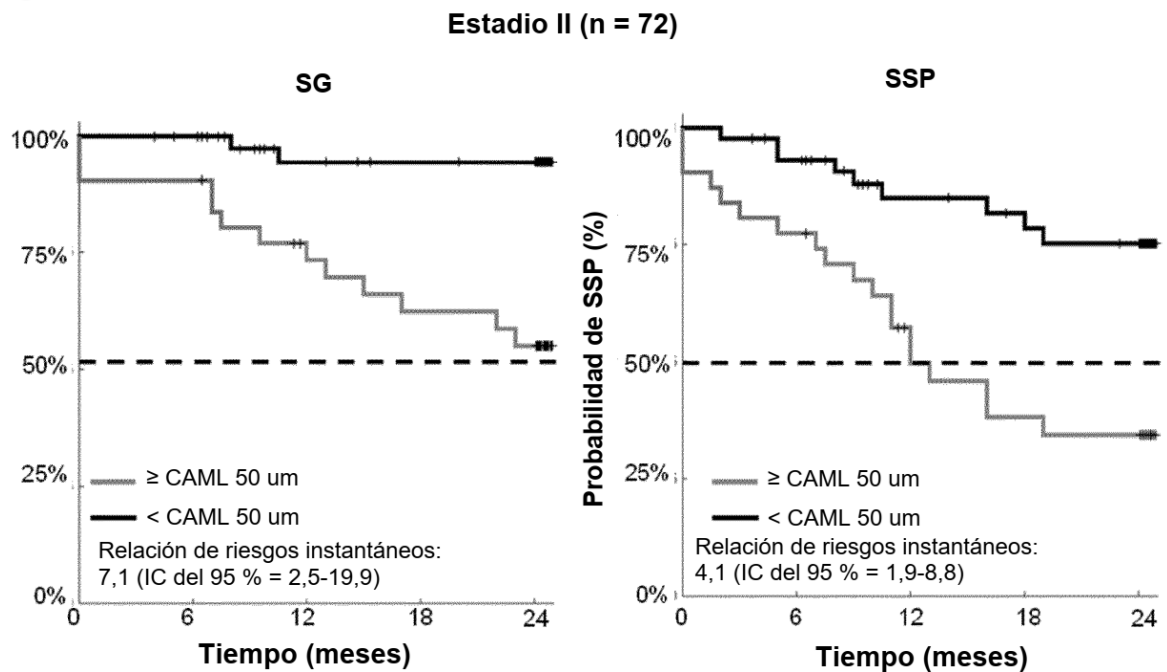


Figura 10C

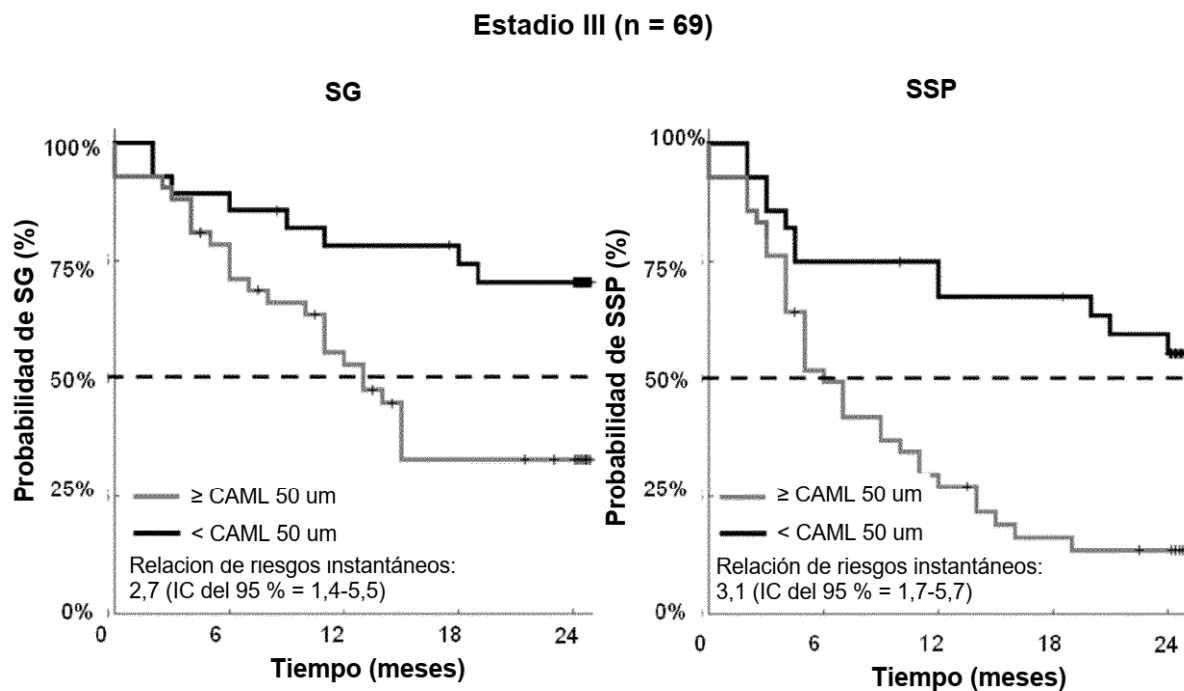


Figura 10D

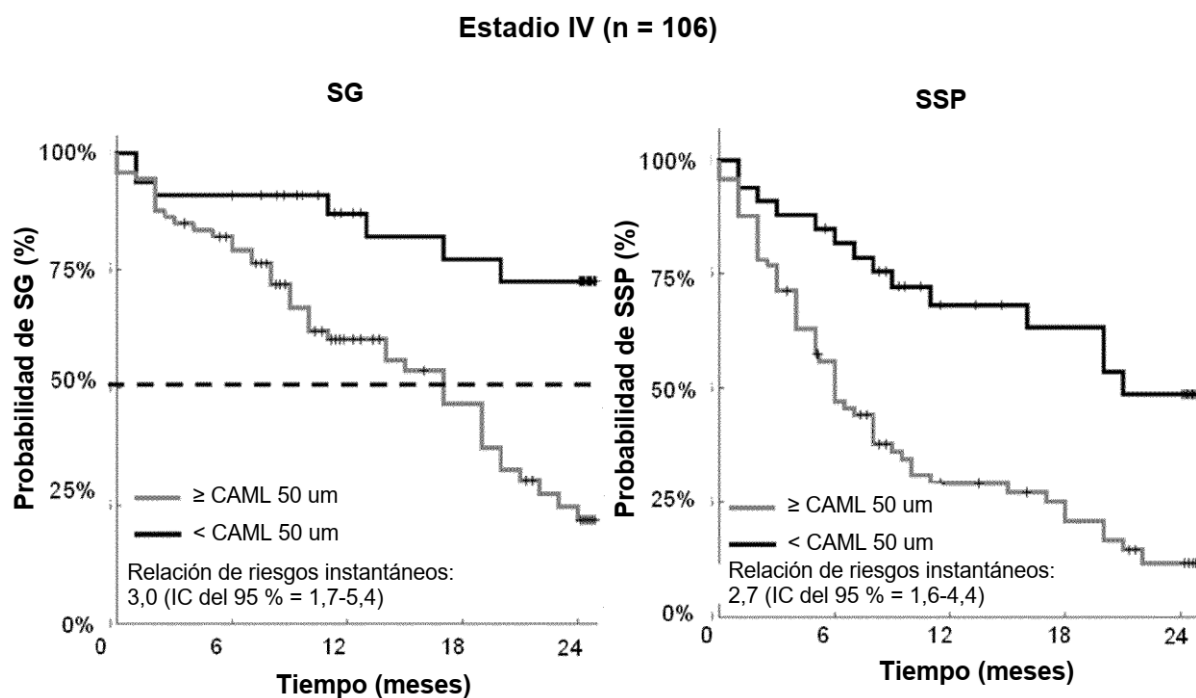


Figura 11A

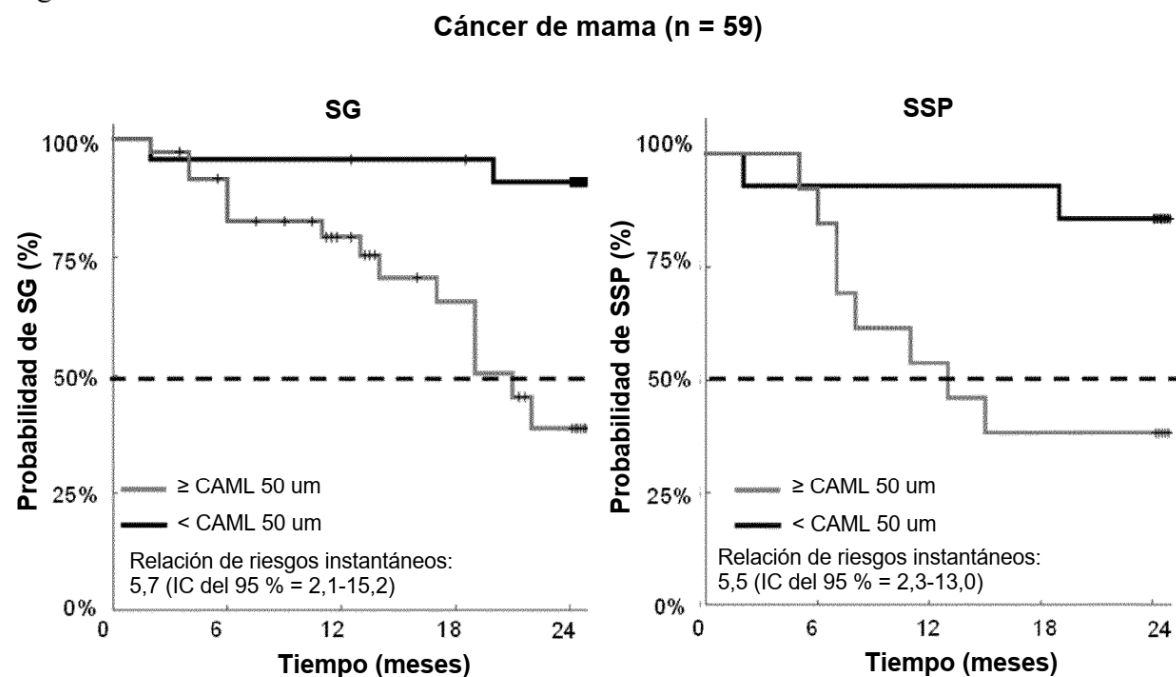


Figura 11B

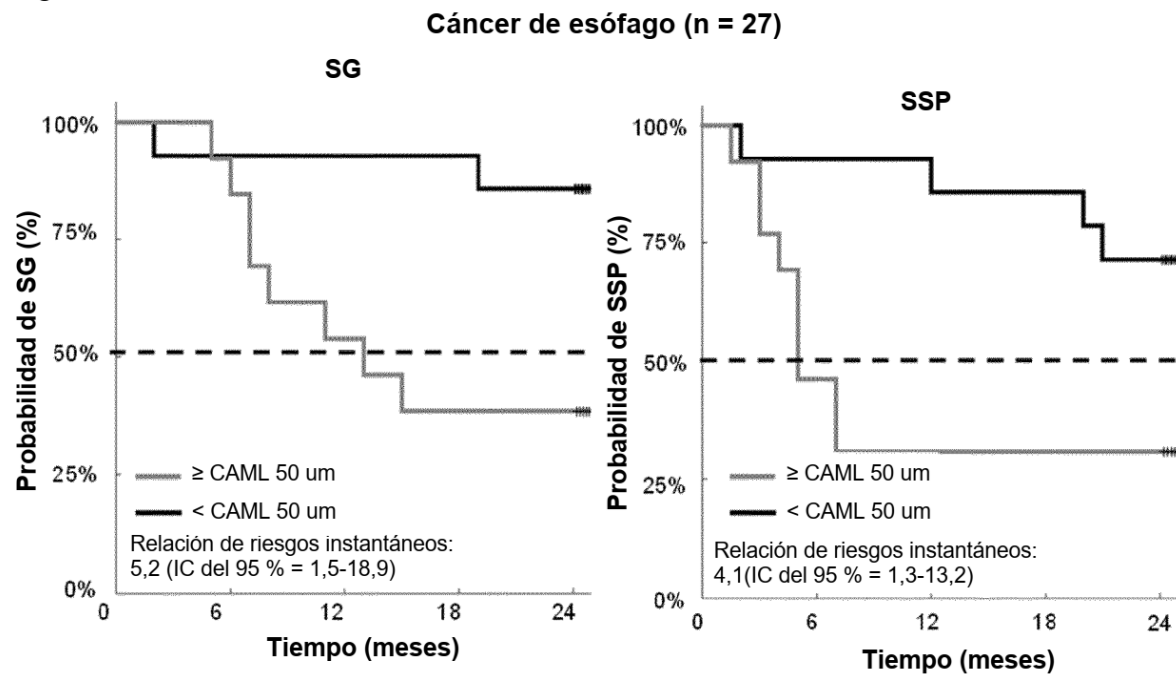


Figura 11C

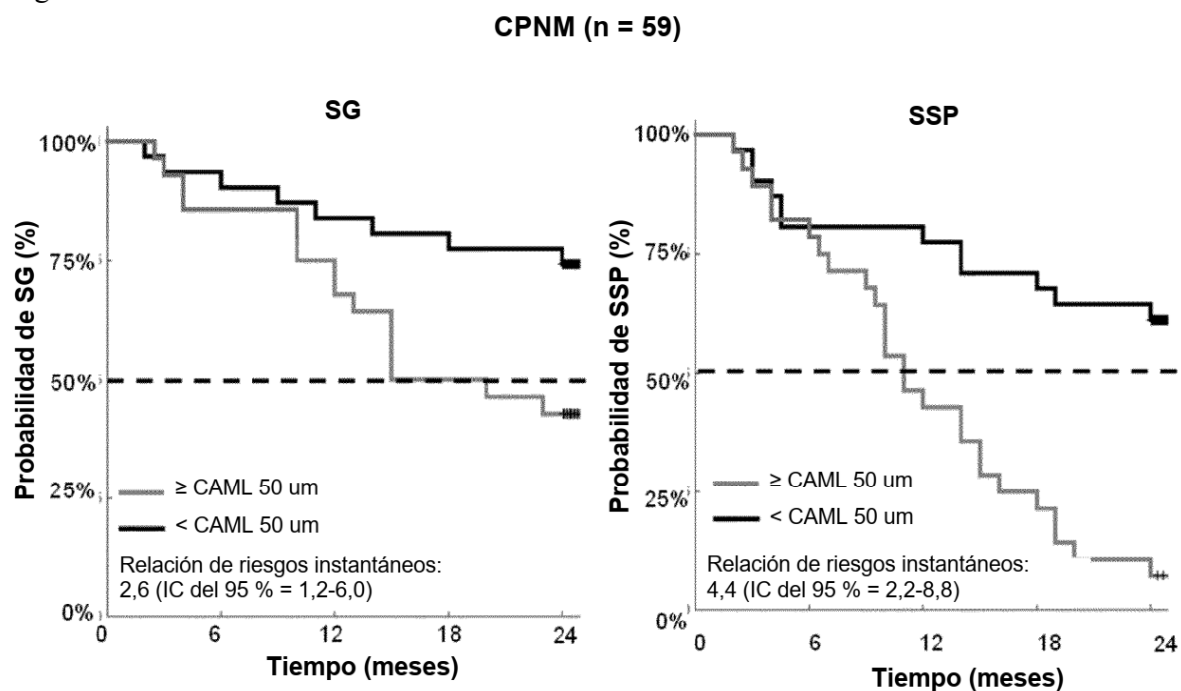


Figura 11D

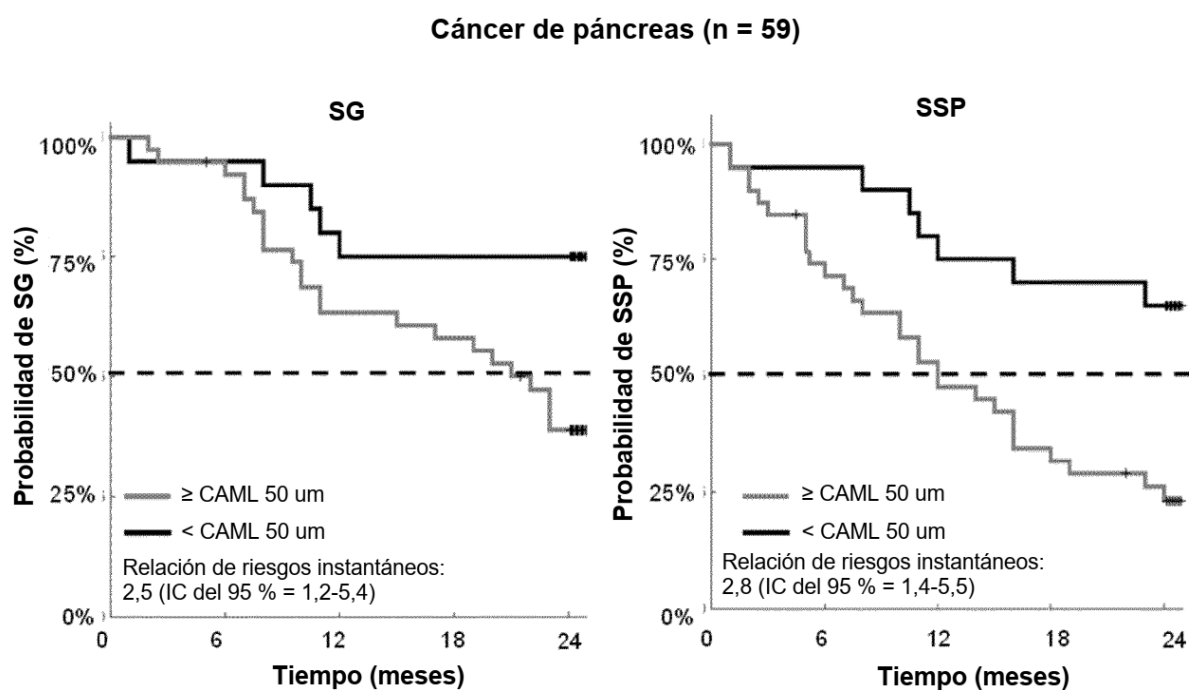


Figura 11E

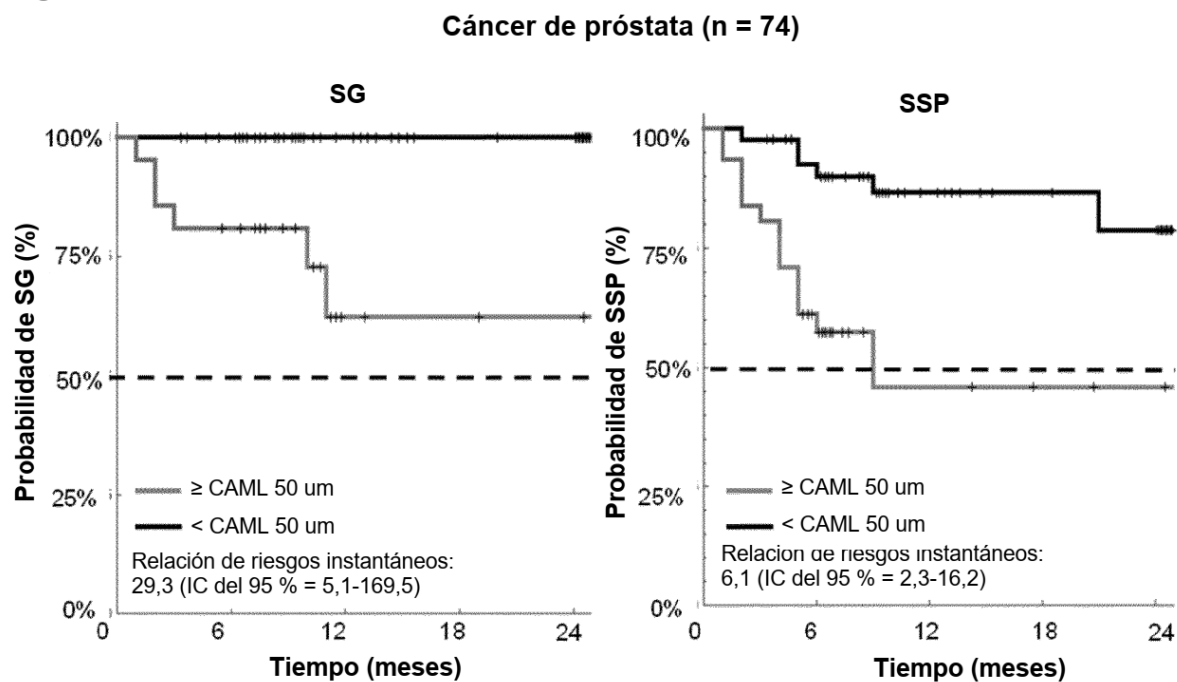


Figura 11F

