

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 725**

51 Int. Cl.:

G01Q 60/36 (2010.01)

G01N 33/483 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.10.2015 PCT/EP2015/072939**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050985**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2015 E 15771989 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2024 EP 3201635**

54 Título: **Método para predecir la progresión del cáncer mediante perfiles nanomecánicos**

30 Prioridad:

03.10.2014 EP 14187685

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

29.08.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITÄT BASEL (100.0%)

Petersgraben 35

4003 Basel, CH

72 Inventor/es:

LOPARIC, MARKO;

PLODINEC, MARIJA;

OBERMANN, ELLEN y

RAEZ, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 977 725 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

Método para predecir la progresión del cáncer mediante perfiles nanomecánicos

5 Antecedentes

10 **[0001]** El cáncer de mama es la neoplasia maligna que ocurre con más frecuencia y la segunda causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres en los países desarrollados. Sin embargo, aunque los tumores primarios rara vez son mortales, las metástasis son responsables de la mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer. Existen algunos parámetros que sirven como marcadores de pronóstico para el desarrollo de metástasis, pero a pesar de los esfuerzos considerables, todavía no es posible predecir con precisión el riesgo de un individuo. Por lo tanto, la terapia adyuvante se administra con frecuencia a pacientes que podrían haberse curado únicamente con cirugía y tratamiento antihormonal. La clasificación actual del cáncer de mama, incluidos los marcadores pronósticos y predictivos, todavía se basa principalmente en criterios clínicos e histopatológicos, es decir, la edad del paciente, el tamaño del tumor, la afectación de los ganglios linfáticos, el tipo histológico del tumor, la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona, HER2/neu, y Ki-67 y grado del tumor.

20 **[0002]** Pero la estratificación del riesgo basada únicamente en parámetros clínico-patológicos puede ser engañosa. Especialmente en el cáncer de mama temprano, HER2/neu negativo (es decir, estadios I, IIA, IIB y IIIA), estos factores clínico-patológicos no son suficientes para la toma de decisiones clínicas, particularmente con respecto a la quimioterapia adyuvante, ya que puede ocurrir un tratamiento excesivo o insuficiente sustancial. Desde 2007, las directrices internacionales recomiendan añadir más pruebas a la evaluación de riesgos establecida.

25 **[0003]** El objetivo principal de la investigación sobre el cáncer de mama es el desarrollo de marcadores de pronóstico que se evalúen mediante pruebas certificadas con garantía de calidad, que puedan utilizarse de forma rutinaria y cuyos costes sean aceptables. Estos marcadores deberían ayudar a optimizar el diagnóstico del cáncer, orientar la elección del tratamiento y apoyar el seguimiento del paciente.

30 **[0004]** Sin embargo, todas las pruebas actualmente disponibles adolecen de ciertos inconvenientes. En general, sólo están validados para subgrupos de pacientes bien definidos, por ejemplo, en pacientes con ganglios negativos y tumores moderadamente diferenciados. Además, las pruebas se realizan principalmente en instituciones centrales, lo que requiere tiempo para la entrega de las muestras del tumor al laboratorio central. Además, no existe ningún control local (de calidad) sobre el procesamiento de la muestra. Además de los factores genéticos y microambientales, datos recientes muestran que las interacciones físicas de las células cancerosas con su entorno son parámetros críticos en el proceso metastásico. Sin embargo, los esfuerzos por comprender la biomecánica del cáncer se habían polarizado en gran medida entre la experimentación a nivel de tejido y la experimentación unicelular. Como resultado, los hallazgos han sido cuestionados debido a: 1) la falta del contexto del tejido natural y 2) mediciones/análisis insuficientes para tener en cuenta las heterogeneidades intratumorales. Esto destaca que la investigación de segmentos de tejido completos con resolución subcelular proporciona una comprensión más completa de los cambios mecánicos asociados con la carcinogénesis. Esto nos motivó a desarrollar un aparato de diagnóstico basado en microscopio de fuerza atómica (AFM) conocido como ARTIDIS® ("*Automated and Reliable Tissue Diagnostics*"; US 8,756,711 B2, US 2014338073 A1, WO 2014090971 A1, WO 2015001119 A1, WO 2015018865 A1 incorporado en el presente documento por referencia) para medir los perfiles de rigidez de biopsias de tejido no adulterados de pacientes humanos en condiciones fisiológicas cercanas a las nativas con una sensibilidad de rigidez sin precedentes resuelta con una resolución espacial a escala nanométrica. Con una duración de aproximadamente 2 horas, un ensayo ARTIDIS utiliza un lápiz o punta afilada de ~10 nm que realiza ~10.000 hendiduras minúsculas en la superficie de una biopsia.

50 **[0005]** Además, Marija Plodinec et al: "The nanomechanical signature of breast cancer", Nature Nanotechnology vol. 7, núm. 11, 21 de octubre de 2012, páginas 757-765, revela que las biopsias de mama humana no adulteradas muestran distintos perfiles de rigidez basados en mediciones de microscopio de fuerza atómica de tipo indentación. Además, el documento WO 2009/142661 A1 describe el análisis de las características nanomecánicas de las células, en el que los cambios en ciertas características nanomecánicas locales de células humanas ex vivo pueden correlacionarse con la presencia de enfermedades humanas, como el cáncer. Además, el documento US 2013/0266665 A1 describe la obtención de un perfil nanomecánico de prueba y, basándose en el perfil nanomecánico de prueba, la selección de un agente terapéutico para tratar al paciente.

[0006] Basándose en estos antecedentes, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método fiable y sencillo para la estadificación del cáncer y/o proporcionar información de pronóstico y/o predicción sobre el cáncer.

60 **[0007]** El objeto se logra por la materia de la reivindicación independiente.

Definiciones

65 **[0008]** Los términos *rigidez* o *elasticidad* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refieren a la resistencia de una muestra de tejido o tejido a la deformación por una fuerza aplicada. La rigidez o elasticidad se mide como el módulo

elástico de la muestra de tejido en Pascal (Pa). Una muestra de tejido blando se caracteriza por un valor de rigidez bajo y un tejido rígido se caracteriza por un valor de rigidez elevado.

[0009] Dicha fuerza de deformación se puede aplicar a la muestra de tejido o tejido mediante un lápiz (como parte, por ejemplo, de un microscopio de fuerza atómica) que incide en la muestra de tejido o tejido, en el que el lápiz o la muestra de tejido se mueven en una dirección vertical entre sí. Para medir varios puntos en una muestra, el palpador o la muestra también se puede mover en dirección lateral, entendiendo por dirección lateral en el sentido de la invención una dirección ortogonal a la dirección vertical.

[0010] El lápiz puede ser un voladizo con una punta afilada o una partícula coloidal adherida que actúa como sonda. Por voladizo en el sentido de la invención se entiende una viga o brazo que está anclado por un solo extremo. Las desviaciones del voladizo causadas por fuerzas repulsivas o de atracción entre la superficie de la muestra y la punta pueden detectarse ópticamente, por ejemplo mediante un interferómetro o mediante un láser enfocado en la parte posterior del voladizo, y reflejarse en un fotodiodo dividido, en el que el fotodiodo registra la deflexión. del voladizo como una diferencia de voltaje, que puede convertirse en nanómetros. Alternativamente, la desviación del voladizo puede detectarse mediante un sensor piezoeléctrico, en el que la tensión del voladizo se convierte en una carga eléctrica. También, como alternativa, se puede utilizar un voladizo autodetector tal como sondas Piezo-Resistive Sensing Active (PRSA), que son, por ejemplo, voladizos de silicio con un puente piezorresistor integrado y un calentador térmico. Ventajosamente, con tales voladizos no es necesario ningún ajuste por láser.

[0011] El término área en el contexto de la presente especificación se refiere a un área que está definida por una cuadrícula de puntos (de medición), en donde cada punto corresponde a la huella de indentación del lápiz como se describió anteriormente y cada punto no tiene más de 100 μm , preferiblemente a 50 μm , 20 μm , 10 μm o 1 μm de distancia de su siguiente punto. A modo de ejemplo no limitativo, un área tiene un tamaño de 25 μm^2 , 50 μm^2 , 100 μm^2 , 200 μm^2 , 300 μm^2 , 400 μm^2 , 500 μm^2 , 600 μm^2 , 750 μm^2 , 1000 μm^2 , 5000 μm^2 o 10.000 μm^2 y los centros geométricos de dos áreas están separados por al menos 100 μm , 200 μm , 300 μm , 400 μm , 500 μm o 1 μm .

[0012] La fuerza medida y la profundidad de la indentación para cualquier muestra determinada dependen de la constante del resorte en voladizo y del radio de la punta.

[0013] El término *resolución espacial* en el contexto de la presente especificación se refiere a la distancia mínima entre dos puntos en un tejido o muestra de tejido por la cual los dos puntos pueden discriminarse con respecto a su rigidez. Una resolución espacial de al menos 1 μm , preferiblemente 100 μm , 10 μm o 1 μm significa que la distancia máxima a la que todavía se pueden discriminar dos puntos es de 1 μm , preferiblemente 100 μm , 10 μm o 1 μm . Una resolución espacial de al menos 100 μm , preferiblemente 10 μm o 1 μm abarca también resoluciones más altas. Una resolución superior a 1 μm significa que aún se pueden discriminar dos puntos que tengan una distancia inferior a 1 μm . Ejemplos de resoluciones superiores a 100 μm son 10 μm y 1 μm . Ejemplos de resoluciones superiores a 1 μm son 0,5 μm , 0,1 μm y 10 nm.

[0014] El término *muestra de tejido* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra de tejido que comprende células contiguas y matriz extracelular. Dicha muestra de tejido se puede obtener mediante una biopsia o resección.

[0015] El término *muestra de resección* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra que representa al menos una parte de un órgano o del cuerpo que se ha extraído del órgano o cuerpo. Una muestra de resección también puede comprender un órgano completo o una parte del cuerpo.

[0016] El término *muestra de biopsia de tejido* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una muestra de tejido que se obtiene mediante una biopsia y comprende células contiguas y matriz extracelular.

[0017] El término *biopsia* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un método para extraer una parte de tejido o un tejido para su examen. Dicha biopsia puede ser una biopsia por aspiración con aguja, una biopsia por punción, una biopsia central asistida por vacío, una biopsia con aguja gruesa o una biopsia con fórceps. La extracción se puede realizar con la ayuda de herramientas adecuadas, como una aguja hueca, un cuchillo redondo y afilado o un bisturí. Además, se puede obtener una muestra de biopsia de tejido mediante endoscopios o métodos endoscópicos.

[0018] El procedimiento de biopsia puede guiarse por un método adecuado tal como ultrasonido o TC (tomografía computarizada por rayos X), en el que se puede detectar o localizar un tumor o una lesión notoria.

[0019] El término *tejido normal* en el contexto de la presente memoria se refiere a un conjunto de células contiguas y matriz extracelular con función fisiológica idéntica que se caracterizan por un crecimiento normal y controlado y una función y estructura celular y extracelular normal.

[0020] El término *tumor* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una neoplasia o una lesión que se forma por un crecimiento anormal de células neoplásicas. El tumor puede ser benigno, premaligno o maligno. Se prefiere

la clasificación de muestras de biopsia de tejido de un carcinoma mamario humano. El término lesión o tumor *benigno* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que carece de la capacidad de metastatizar.

[0021] El término *tumor primario* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un tumor que se origina en el mismo tipo de tejido que el órgano o tejido circundante.

[0022] El término *metástasis* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a tumores que se han diseminado desde el tumor primario a sitios distantes (por ejemplo, órganos diferentes).

[0023] Los términos *malignidad* o "un *tumor maligno* " en el contexto de la presente memoria descriptiva se refieren a la capacidad de un tumor para penetrar la membrana basal, invadir tejidos vecinos o diseminarse por el cuerpo. Un tumor maligno es sinónimo de una neoplasia maligna o de un cáncer, en particular de un cáncer invasivo.

[0024] El término *borde del tumor* en el contexto de la presente memoria descriptiva se define como un borde redondo, liso, bien definido (principalmente en tumores benignos) o irregular, mal definido (a menudo en el caso de tumores malignos) entre un tumor y tejido adyacente. Histológicamente se define como la parte más externa del tumor donde se pueden encontrar células tumorales (Figura 1B).

[0025] El término *tejido adyacente* en el contexto de la presente memoria descriptiva se define como parte del tejido u órgano distinto del tumor (Figura 1C). El tejido adyacente normalmente rodea el tumor primario, pero también puede considerarse como cualquier parte del tejido de un órgano sin presencia de tumor.

[0026] El término *ganglio linfático adyacente* o *ganglio linfático adyacente a un tumor primario* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere particularmente a un ganglio linfático que drena un tumor. Estos ganglios linfáticos adyacentes también se denominan *ganglios linfáticos centinela*.

[0027] El término *ganglio linfático axilar* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un ganglio linfático que drena los vasos linfáticos de los cuadrantes laterales de la mama, los vasos linfáticos superficiales de las paredes del tórax y el abdomen por encima del nivel del ombligo y los vasos del miembro superior. Los ganglios linfáticos axilares también se denominan ganglios linfáticos axilares.

[0028] El término *distribución de rigidez* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a una frecuencia de diferentes valores de rigidez determinados a partir de una muestra de biopsia de tejido individual. Además, se puede ajustar una determinada distribución de rigidez a una función gaussiana. Una distribución de rigidez unimodal es una distribución de valores de rigidez discretos que tienen un máximo único, lo que indica una muestra que tiene una rigidez uniforme. Una función de distribución bimodal tiene dos máximos. Tal distribución puede ser causada por una muestra que tiene dos partes rígidas diferentes, por ejemplo un núcleo tumoral blando y una periferia rígida. Una distribución de rigidez trimodal en el sentido de la invención significa una distribución caracterizada por tres máximos locales. Una distribución trimodal puede indicar que el tejido normal, una región fronteriza caracterizada por un estroma duro y un núcleo tumoral blando han contribuido a los valores que componen la distribución. Una muestra de distribución de rigidez al menos bimodal tiene una función de distribución bimodal, trimodal o n-modal (siendo n un número entero >1).

[0029] El término *distribución de rigidez heterogénea* en el contexto de la presente especificación se refiere a una función de distribución nmodal (siendo n un número entero >1).

[0030] Una pluralidad de valores de rigidez en el contexto de la presente especificación se refiere a al menos 100, 200, 300, 400, 500 900, 1000, 1600, 2500, 3600, 4900, 6400, 8100 o 10000 valores de rigidez.

[0031] Un *marcador de pronóstico* proporciona un riesgo de incidencia y/o recurrencia de cáncer o, en otras palabras, da una indicación de la probabilidad de progresión de la enfermedad.

[0032] Un *marcador predictivo* proporciona una indicación de la respuesta del paciente al tratamiento específico.

[0033] El término *pico* en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un máximo local en la distribución del valor de rigidez y significa el valor de rigidez con la frecuencia más alta dentro de una muestra, o dentro de los valores vecinos inmediatos.

[0034] En el contexto de la presente especificación, el término *frecuencia máxima* cuando se usa con respecto a una distribución de valores de rigidez se refiere a un valor de rigidez caracterizado por un máximo local o absoluto del gráfico que representa la frecuencia de los valores de rigidez sobre los valores de rigidez. En consecuencia, un primer máximo de frecuencia es el mismo o sustancialmente el mismo que un segundo máximo de frecuencia, si el valor de rigidez del primer máximo de frecuencia es el mismo o sustancialmente el mismo que el valor de rigidez del segundo máximo de frecuencia.

[0035] El término *condiciones fisiológicas* en el contexto de la presente especificación se refiere a condiciones necesarias para preservar la integridad estructural y las propiedades mecánicas de la muestra de tejido de biopsia, manteniendo la viabilidad del tejido por cualquier agente químico o físico e incluye en particular eso después de la recolección. La muestra se almacena en un tampón fisiológico como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer o tampón de trasplante como Custodiol y la determinación de la rigidez se realiza a 20, 25, 30 o 37 °C. La solución Ringer puede complementarse además con glucosa y un cóctel de proteasa. Además, la determinación de la rigidez de la muestra de tejido de biopsia se puede realizar dentro de 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h o 72 h después de la recolección sin cambiar las propiedades mecánicas de la muestra. Las "condiciones fisiológicas" en particular no comprenden tejido congelado o tejido descongelado, ni muestras incluidas en parafina.

Descripción

[0036] La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que las lesiones metastásicas se caracterizan por un fenotipo nanomecánico similar al del tumor primario del que se originan las lesiones metastásicas.

[0037] Según la invención, se proporciona un método para clasificar una muestra de tejido obtenida de un tumor según la reivindicación 1.

[0038] En determinadas formas de realización, la muestra de tejido es una muestra de biopsia de tejido o una muestra de resección.

[0039] En formas de realización, una muestra de tumor primario que muestra una frecuencia máxima inferior a 0,5 kPa se clasifica como tumor metastatizado o que tiene una alta probabilidad de haberse diseminado al tejido adyacente, particularmente a los ganglios linfáticos adyacentes o a los ganglios linfáticos axilares.

[0040] En determinadas formas de realización, la muestra de tumor primario, particularmente la muestra de biopsia de tumor primario, comprende al menos una parte del núcleo del tumor y al menos una parte de la periferia del tumor.

[0041] En ciertas formas de realización, la muestra de tumor primario, particularmente la muestra de biopsia de tumor primario, representa al menos la mitad de la sección transversal del tumor descrita anteriormente y muestra una orientación distinta desde el centro a la periferia del tumor. En determinadas formas de realización, la muestra de biopsia del tumor primario es una biopsia cilíndrica o prismática.

[0042] En formas de realización, la pluralidad de puntos está dispuesta como una cuadrícula de n_1 por n_2 puntos, definiendo la cuadrícula un área, en la que n_1 y n_2 son, independientemente entre sí, números enteros >1 .

[0043] En determinadas formas de realización, una cuadrícula de 5 por 5 puntos (que da como resultado 25 puntos), 7 por 7 puntos, 10 por 10 puntos, 15 por 15 puntos, 20 por 20 puntos, 50 por 50 puntos o 100 por 100 puntos se miden para un área. En determinadas formas de realización, el área está definida por una cuadrícula de 24x24 puntos con un tamaño de 400 μm^2 .

[0044] En formas de realización se determinan los valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de una misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de las áreas es un múltiplo de la resolución espacial, siendo dicho múltiplo al menos 10 veces la resolución espacial. En determinadas formas de realización, el múltiplo es 20, 30 o 50.

[0045] En ciertas formas de realización, las áreas de la muestra de biopsia se colocan en la superficie de la muestra a lo largo del eje longitudinal de la muestra en una distancia de 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 15 mm o 20 mm.

[0046] En ciertas formas de realización, la pluralidad de puntos comprende 100, 400, 900, 1000, 1600, 2500, 3600, 4900, 6400, 8100, 10000 o 20000 valores de rigidez.

[0047] En formas de realización, a una muestra que muestra una distribución de rigidez unimodal se le asigna una alta probabilidad de no ser maligna.

[0048] En determinadas formas de realización, la muestra de biopsia de tejido es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 7 μm . En determinadas formas de realización, la muestra de tejido de biopsia es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 0,5 mm.

[0049] En formas de realización tumor es un carcinoma mamario humano o una metástasis en un ganglio linfático, pulmón, hueso, hígado o cerebro.

[0050] En formas de realización los valores de rigidez se determinan en condiciones fisiológicas.

[0051] En ciertas formas de realización, la rigidez de una muestra de biopsia mamaria se determina y

- a una muestra que muestra una distribución de rigidez caracterizada por un pico entre 1,1 kPa y 1,5 kPa se le asigna una alta probabilidad de ser un tejido mamario normal,
 - una muestra que muestra una distribución de rigidez caracterizada por un pico entre 1,9 kPa y 3,7 kPa se asigna a una alta probabilidad de ser una lesión benigna, y
 - una muestra que muestra una distribución de rigidez caracterizada por picos entre 0,31 kPa y 0,75 kPa y a un valor superior a 1,2 kPa se asigna a una alta probabilidad de ser un tumor maligno.

[0052] En determinadas formas de realización, una muestra que muestra una distribución de rigidez caracterizada por picos entre 0,31 kPa y 0,75 kPa y 1,2 kPa y 2,0 kPa se asigna a una alta probabilidad de ser un tumor maligno.

[0053] Siempre que se presenten en el presente documento alternativas para características individuales separables como "formas de realización", debe entenderse que dichas alternativas pueden combinarse libremente para formar formas de realización discretas de la invención descrita en el presente documento.

[0054] La invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos y figuras, de los que se pueden extraer formas de realización y ventajas adicionales. Estos ejemplos pretenden ilustrar la invención pero no limitar su alcance.

[0055] Breve descripción de las figuras.

Figura 1 muestra A - tumor B - borde del tumor y tejido adyacente C - tejido adyacente.

Figura 2 muestra el perfil nanomecánico suave del tumor primario y el tejido adyacente revela un fenotipo común detectado en las metástasis de los ganglios linfáticos. (A) Los perfiles nanomecánicos de dos pacientes con cáncer revelan distribuciones bimodales con una caída exponencial en el caso del paciente 1 con valores máximos de 0,39 +/- 0,21 kPa. para una población de células cancerosas específicas y 3,66 +/- 2,14 kPa que decae hasta 10 kPa para los componentes celulares y estromales circundantes del tejido. El tejido adyacente con características patohistológicas de los tejidos mamarios normales exhibe un pico de rigidez uniforme de 1,9 +/- 0,7 kPa (arriba). Se mide la distribución nítida y el fenotipo general más suave para el paciente 2 con valores máximos para las células de 0,45 +/- 0,18 kPa y 1,05 +/- 0,55 kPa respectivamente (abajo). El tejido adyacente de este paciente muestra una distribución bimodal con un pico suave muy prominente de 0,4 +/- 0,2 kPa, así como un pico más rígido de 1,05 +/- 0,5 kPa. En el análisis patohistológico este tejido se marca como no maligno. Por lo tanto, aquí utilizamos el término sano "corrupto" ya que los valores de rigidez del tejido y la distribución bimodal no se corresponden con los valores medidos en muestras de mama sanas de pacientes de control. (B) El paciente 1 tiene un ganglio linfático negativo para cáncer que muestra valores de rigidez de 3,02 +/- 2,10 kPa (arriba). El ganglio linfático que contiene metástasis de cáncer de mama del paciente 2 exhibe una distribución de rigidez bimodal con valores máximos para la región cancerosa de 0,49 +/- 0,23 kPa que corresponde directamente al fenotipo de células cancerosas "blandas" que se encuentran en el tumor primario y el tejido sano adyacente ("corrupto") mientras que para el resto del ganglio linfático se mide el valor de 2,11 +/- 0,78 kPa (abajo).

La figura 3 muestra una descripción histológica posterior a la AFM de las muestras de resección de dos pacientes con cáncer de mama. La tinción H&E de ambas muestras presenta características similares; es decir, el tejido conectivo y el epitelio normal no difieren significativamente de los de la mama sana (arriba). Los tumores primarios en ambos casos revelan células de carcinoma de mama invasivo con nidos infiltrantes de células que han provocado una respuesta de tejido fibroso denso (centro). La tinción H&E del ganglio linfático correspondiente del paciente 2 revela nidos de células cancerosas de mama similares a las del tumor primario (abajo a la derecha), mientras que el ganglio linfático del paciente 1 está libre de células cancerosas (abajo a la izquierda).

La figura 4 muestra histogramas normalizados que representan el perfil nanomecánico de los tumores primarios (muestras de biopsia y muestras de resección) del paciente sin ganglio linfático invadido N0 (n = 10) y con ganglios linfáticos invadidos N+ (n = 11). Los pacientes N+ muestran claramente un cambio hacia valores más suaves en el área del cáncer (por debajo de 1 kPa). Alcanzan un máximo de 0,325 kPa, mientras que los pacientes N0 alcanzan un máximo de 0,625 kPa. Ambas distribuciones siguen siendo bastante amplias y la parte del histograma por encima de 2 kPa parece muy similar en ambos casos.

La figura 5 muestra histogramas normalizados que representan el Perfil nanomecánico de los ganglios linfáticos invadidos y no invadidos correspondientes a los tumores primarios ilustrados en la Fig. 4. Los ganglios linfáticos positivos para células cancerosas (N+) tienen un pico fuerte y suave de alrededor de 0,4 kPa, mientras que los ganglios linfáticos negativos para el cáncer (N-) carecen de un pico suave.

Ejemplos:

[0056] Con el fin de transferir los resultados preliminares a un entorno clínico, la tecnología ARTIDIS se optimizó para el análisis de muestras de cáncer de mama humano no fijadas (medidas en un entorno acuoso fisiológico o tejido congelado) obtenidas mediante resecciones tumorales. Para este propósito, se recolectaron 152 muestras de tejido, incluidos cánceres de mama primarios de diversos estadios y grados, metástasis en los ganglios linfáticos y tejidos mamarios

humanos no neoplásicos, de muestras de resección de 56 pacientes sometidas a procedimientos de lumpectomía o mastectomía.

[0057] Las mediciones nanomecánicas de las muestras se realizaron como se describe en el documento US 8.756.711 B2. Brevemente, cada muestra se examinó de manera sistemática distribuyendo homogéneamente mapas FV sobre toda la superficie de la muestra para tener en cuenta posibles heterogeneidades. Se mantuvo una distancia regular de aproximadamente 500 μm entre los escaneos utilizando tornillos micrométricos o sistemas de posicionamiento automatizados. Esto dio como resultado aproximadamente de 10 a 15 mapas FV por muestra, según el tamaño total de la biopsia.

[0058] Para el análisis de las muestras por AFM, las biopsias se pegaron a una placa de cultivo utilizando pegamento epoxi de 2 componentes de secado rápido de 5 minutos. Después de un paso de secado previo de 2 minutos (para evitar la mezcla del epoxi y el tampón de la muestra), la muestra se colocó plana sobre el pegamento para optimizar el ángulo de indentación y evitar la influencia de componentes externos (por ejemplo, el soporte en voladizo).. Se colocaron puntas de pipeta que actuaban como "rampas" directamente debajo de segmentos desiguales de cada muestra para mantener la consistencia en altura. El uso de fuerza excesiva (por ejemplo, desgarro o estiramiento) se minimizó en todo momento durante la manipulación de la muestra. Todos los pasos preparativos se realizaron en un entorno tampón estéril suplementado con inhibidores de proteasa o tampón de trasplante para evitar la contaminación y garantizar que la muestra permaneciera en un estado casi in vivo. Las muestras montadas se mantuvieron en solución de Ringer helada o Custodiol hasta la prueba nanomecánica, que se realizó a temperatura ambiente o a 37 °C.

[0059] Para puntas piramidales afiladas (voladizos de nitruro de silicio de 205 μm de longitud, constante de resorte nominal del voladizo $k = 0,06 \text{ N m}^{-1}$, frecuencia de resonancia [aire] = 18 kHz), la constante elástica exacta k del voladizo se determinó antes de cada experimento con el método de ajuste térmico, mientras que la sensibilidad a la deflexión se determinó en fluido utilizando sustratos de vidrio sólido como material de referencia infinitamente rígido.

[0060] Mediciones de rigidez de contacto (módulo elástico, E) de biopsias se derivaron de la siguiente manera; Las curvas de carga-desplazamiento, también denominadas curvas de indentación de fuerza, se registraron en un sitio determinado de manera orientada tanto durante la carga como durante la descarga. Se mantuvo una distancia regular de aproximadamente 500 μm entre las regiones de escaneo utilizando tornillos micrométricos o sistemas de posicionamiento automatizados. Un conjunto individual de datos constaba de 1.024 curvas de carga-desplazamiento, a una velocidad de indentación de 16 $\mu\text{m/s}$. Esto dio como resultado aproximadamente de 15 a 20 mapas de volumen de fuerza por muestra. Cuando fue posible, los mapas de fuerza-volumen (FV) se realizaron sobre una cuadrícula de 32x32 puntos con un tamaño de escaneo de 20x20 μm a una velocidad de aprox. 1 ciclos de carga y descarga por segundo. Cada curva de carga-desplazamiento constaba de al menos 512 puntos de datos, mientras que la longitud Z se estableció entre 5 y 8 μm , dependiendo de las propiedades de la región analizada. Cada mapa FV se configuró en $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ para (i) optimizar el tiempo experimental y (ii) proporcionar un área suficientemente grande que incorpore todos los componentes dentro del tejido (p. ej., células y matriz extracelular). La fuerza de carga máxima aplicada se estableció en 1,8 nN y una profundidad de indentación de aproximadamente 150 a 3000 nm. Se obtuvieron 72 x 72 mapas FV adicionales (5184 curvas de fuerza-desplazamiento por mapa y un tamaño de píxel de 277 nm) para aumentar la resolución espacial en áreas clave de interés.

[0061] Se analizaron las curvas de indentación de fuerza usando un método descrito anteriormente (Loparic, et al., Biophysical Journal, 98(11): p. 2731-40, 2010, Plodinec, et al., Journal of Structural Biology. 174(3): págs. 476-484, 2011). Brevemente, se desarrolló un software en LabVIEW (National Instrument, EE. UU.) para el análisis automatizado de los datos de FV. Se determinó el punto de contacto. Las curvas de fuerza se obtuvieron transformando del desplazamiento piezoeléctrico a la distancia punta-muestra, que tiene en cuenta la flexión del voladizo y multiplicando la deflexión d del voladizo por la constante del resorte k para obtener la carga F . Las curvas de fuerza de descarga se analizaron realizando un ajuste lineal a el 50 % superior de la curva de fuerza, que define la rigidez entre la carga máxima $F = 1,8 \text{ nN}$ y una carga de 0,9 nN. Con este procedimiento se podrían evitar efectos extraños sobre la curva de fuerza, como por ejemplo la adherencia. El ratio de Poisson se fijó en 0,5. El módulo de Young se determinó según el método de Oliver y Pharr (Oliver et al., Journal of Materials Research, 7(6), 1564-1583, 1992). Los valores de pendiente se trazaron, analizaron y mostraron espacialmente en el SOFTWARE ARTIDIS OFFLINE.

[0062] Después de AFM, las muestras de tejido se fijaron y se incluyeron en parafina de forma orientada. Los datos de ARTIDIS han confirmado los hallazgos iniciales de que todas las muestras de carcinoma muestran fenotipos de rigidez heterogéneos con un fenotipo característico dos veces más suave en comparación con el tejido mamario circundante no neoplásico y morfológicamente normal. El tejido mamario sano de pacientes sin cáncer de mama exhibe en promedio valores de rigidez de ~1,6 kPa.

[0063] Más significativamente, los datos ilustrados en la Figura 2 y la Figura 3 muestran:

1) Los tejidos tumorales de pacientes con cáncer de mama exhiben una distribución heterogénea desde 0,4 kPa y una decadencia exponencial que puede llegar hasta 20 kPa. Identificamos muestras de cáncer de mama invasivo mediante un pico suave característico de 0,4 a 0,8 kPa. La distribución de la rigidez de las metástasis en los ganglios linfáticos

correspondientes de un mismo paciente se caracterizó por un perfil de rigidez heterogéneo con un pico suave característico de 0,4 a 0,8 kPa de manera similar al tejido del cáncer de mama primario.

2) El tejido adyacente de estos pacientes que histológicamente se calificó como "no maligno" presentó una distribución bimodal con un pico de rigidez blanda prominente que oscilaba entre 0,4 y 0,8 kPa. La presencia de tejido que según el análisis nanomecánico es canceroso, pero histológicamente no es maligno, es un indicador de mal pronóstico. Además, también estaban presentes valores de rigidez de 1,2 a 1,9 kPa, que corresponden al tejido mamario sano.

3) En los casos en los que a los pacientes se les detectó un pico de rigidez suave solo en el tumor primario, pero no se detectaron picos suaves en el tejido adyacente, no hubo metástasis en los ganglios linfáticos.

4) En el caso de que se mida el tejido adiposo, está presente un pico de rigidez específico de 0,2 kPa.

5) Debido al aumento habitual del componente graso dentro del tejido mamario durante el envejecimiento, muy a menudo se mide un pico de rigidez específica de la grasa de 0,2 kPa.

[0064] Además, los datos ilustran en las Fig. 4 y 5 que los tumores que ya se han diseminado a los ganglios linfáticos adyacentes muestran un cambio a valores más suaves en el área del cáncer.

[0065] En consecuencia, para la evaluación de la agresividad del cáncer y el pronóstico en pacientes con cáncer de mama es importante tener en cuenta no sólo el tumor primario sino también la respuesta nanomecánica del tejido adyacente.

[0066] Los datos presentados en este documento demuestran la aplicabilidad de los perfiles nanomecánicos utilizando ARTIDIS en clínicas para:

1) Pronóstico de la incidencia, progresión y reaparición

2) Predicción de la respuesta al tratamiento

3) Decisión sobre el tratamiento apropiado y el régimen de seguimiento basado en la combinación perfil nanomecánico del tumor primario y el tejido adyacente

4) Detección del tejido histológicamente "no maligno" (es decir, tejido mamario no maligno sin cambios patológicos obvios observados con métodos de detección estándar como ultrasonido, mamografía o tinción H&E después de realizarse una biopsia local) para el pico de rigidez suave con el propósito de identificar la presencia de células cancerosas localmente invasivas y el grado de agresividad del tumor mucho antes del crecimiento del tumor sólido y la presencia de síntomas.

5) La detección utilizando perfiles nanomecánicos ARTIDIS es particularmente adecuada para pacientes portadores de mutaciones genéticas como BRCA 1 y BRCA2 o cualquier otro, que tienen alto riesgo de desarrollar cáncer.

[0067] El método de creación de perfiles nanomecánicos de la invención es ideal para su uso en la práctica diaria, ya que permite una evaluación rápida in situ de la muestra y no sufre variabilidad entre observadores como, por ejemplo, otros marcadores, como el Ki-67.

[0068] El método de la invención se basa en los siguientes principios:

1. Tejidos (células y matriz extracelular) se someten a alteraciones mecánicas/estructurales a la escala nanométrica antes de que el tumor (cáncer) comience a desarrollarse.

2. Las alteraciones del Punto 1 están presentes en todo el órgano o tejido adyacente (por ejemplo, apariencia difusa/multifocal).

3. La ubicación exacta donde se producirá el cáncer por primera vez depende de las condiciones microambientales locales específicas (por ejemplo, alteraciones e interacciones dentro de las células y la matriz extracelular circundante y entre ellas).

4. La medición del perfil nanomecánico del órgano/tejido adyacente puede detectar alteraciones específicas del Punto 1.

5. La medición del perfil nanomecánico del órgano/tejido adyacente puede distinguir entre alteraciones mecánicas relacionadas con la edad y alteraciones relacionadas con pretumorales, tumores e inflamación.

6. La medición del perfil nanomecánico del órgano/tejido adyacente puede correlacionar diferentes tipos y/o grados de alteraciones mecánicas con la capacidad del tumor para progresar y/o generar metástasis.

7. Los resultados del punto 6 se pueden utilizar como marcador pronóstico y/o predictivo del desarrollo y progresión del tumor. Esto se puede utilizar prácticamente para un mejor tratamiento de pacientes con enfermedades específicas.

8. La metodología de la invención se aplica típicamente para la detección de tumores de mama (por ejemplo, detección) y como pronóstico y marcador de metástasis tumorales ya existentes o asociadas a tumores, pero no se limita al tejido mamario. También se puede utilizar para otros tumores específicos de órganos, enfermedades inflamatorias o médicamente relevantes como cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma maligno, cáncer de hígado, dermatitis, gastritis, etc.

9. Al utilizar la metodología propuesta, condiciones específicas: displasia, metaplasia., la hiperplasia (cambios pretumorales) y los cambios relacionados con la edad se pueden detectar y distinguir específicamente de los cambios relacionados con el tumor.

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar una muestra de tejido obtenida de un tumor, que comprende
 - 5 - determinar un valor de rigidez para cada uno de una pluralidad de puntos en dicha muestra con una resolución espacial de al menos 100 μm , lo que da como resultado una distribución de rigidez,
- asignar una probabilidad de malignidad a dicha muestra, en donde a una muestra que exhibe una distribución de rigidez heterogénea que tiene una frecuencia máxima por debajo de 1 kPa, se le asigna una alta probabilidad de ser maligna, en donde la distribución de rigidez heterogénea es una distribución n-modal que tiene n máximos, siendo n un número entero
10 > 1,
en donde
- dicho método se aplica a una primera muestra y una segunda muestra, dicha primera muestra es una muestra de tumor primario, y dicha segunda muestra es una muestra tomada de un ganglio linfático adyacente a dicho sitio de muestreo de dicha primera muestra o un ganglio linfático axilar, y
15 - dicha segunda muestra se clasifica como metástasis en un ganglio linfático si dicha primera muestra y dicha segunda muestra muestran ambas una distribución de rigidez heterogénea que tiene una frecuencia máxima por debajo de 1 kPa, en donde la distribución de rigidez heterogénea es una distribución n-modal que tiene n máximos siendo n un número entero > 1, y la frecuencia máxima de la segunda muestra es la misma que la frecuencia máxima de la primera muestra, en donde el valor de rigidez de la frecuencia máxima de la segunda muestra es el mismo que el valor de rigidez de la de la frecuencia máxima de la primera muestra.
20
2. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra de tejido es una muestra de biopsia de tejido o una muestra de resección.
- 25 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha pluralidad de puntos está dispuesta como una cuadrícula de n_1 por n_2 puntos, definiendo dicha cuadrícula un área.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, mediante el cual se determinan dichos valores de rigidez de al menos dos áreas diferentes de dicha misma muestra, y la distancia entre los centros geométricos de dichas áreas es un múltiplo de dicha resolución espacial de al menos 10.
30
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha pluralidad de puntos comprende 100, 400, 900, 1000, 1600, 2500, 3600, 4900, 6400, 8100 o 10000 valores de rigidez.
- 35 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha muestra de tejido es una biopsia cilíndrica o prismática con un diámetro de al menos 7 μm .
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tumor es un carcinoma mamario humano o una metástasis en un ganglio linfático, pulmón, hueso, hígado o cerebro.
40
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dichos valores de rigidez se determinan en condiciones fisiológicas.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una muestra de tumor primario que muestra una frecuencia máxima inferior a 0,5 kPa se clasifica como tumor metastatizado o como que tiene una alta probabilidad de haberse diseminado al tejido adyacente, particularmente a los ganglios linfáticos adyacentes o a ganglios linfáticos axilares.
45

Fig. 1

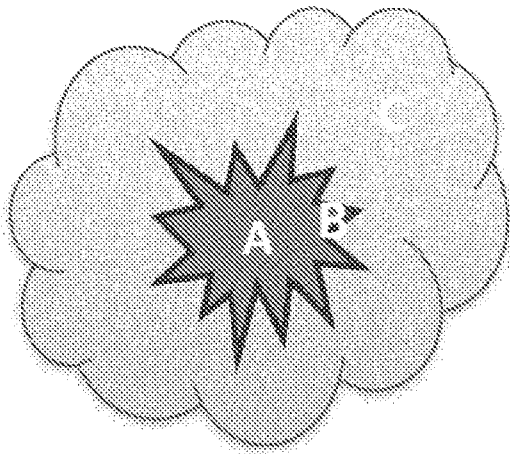
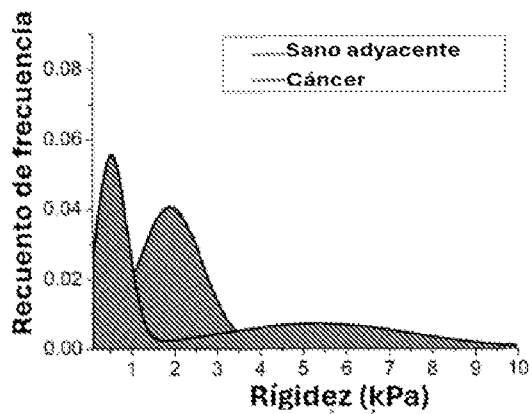


Fig. 2

A



B

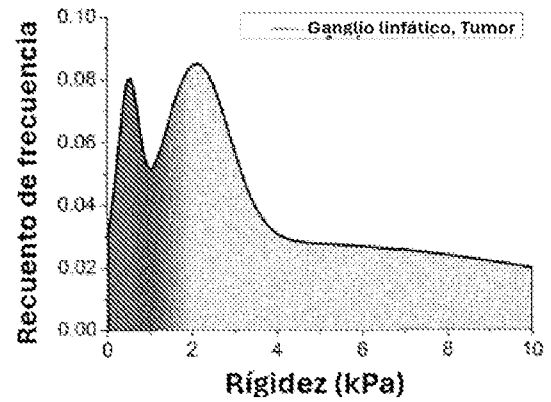
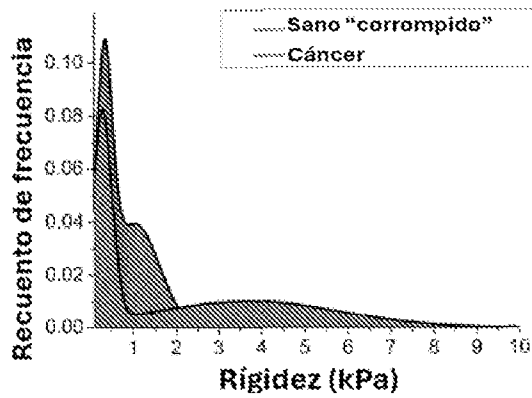
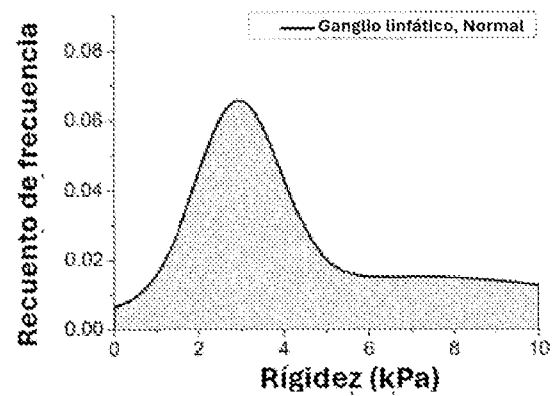


Fig. 3

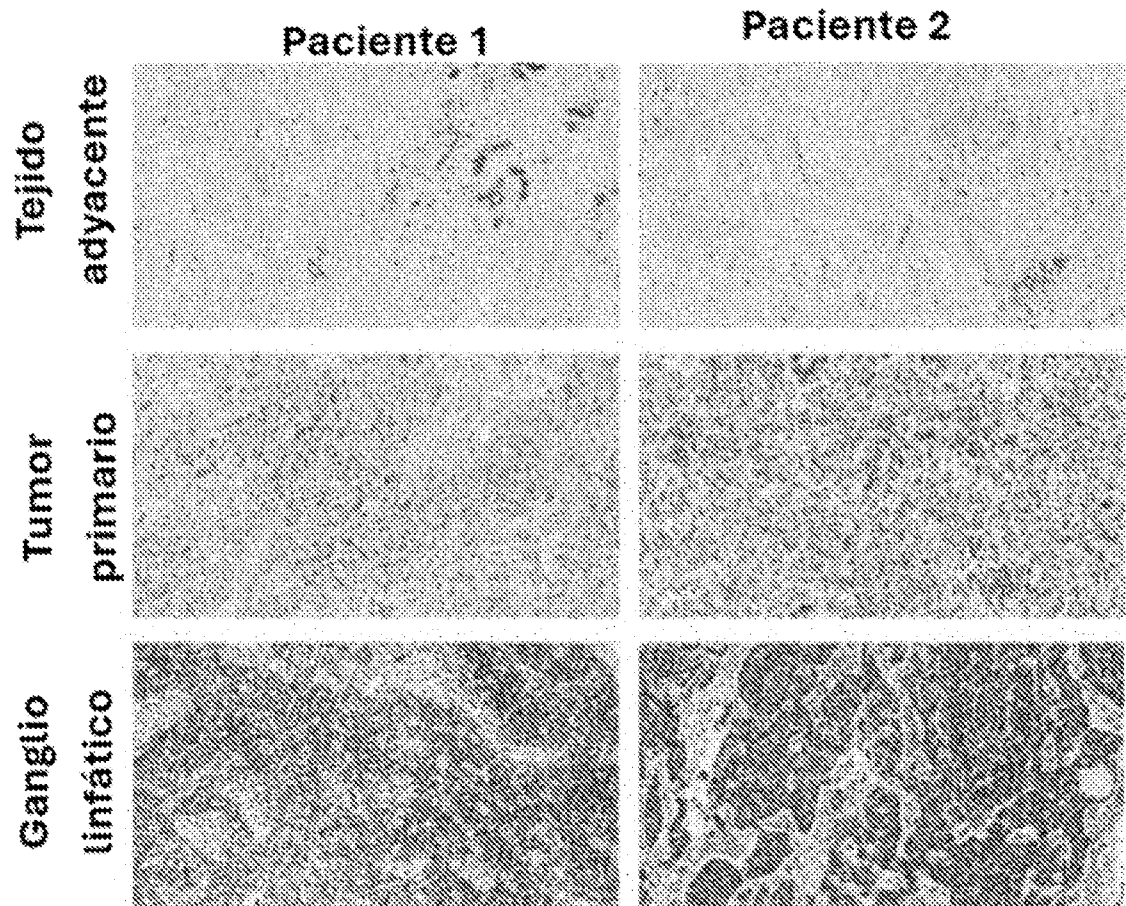


Fig. 4

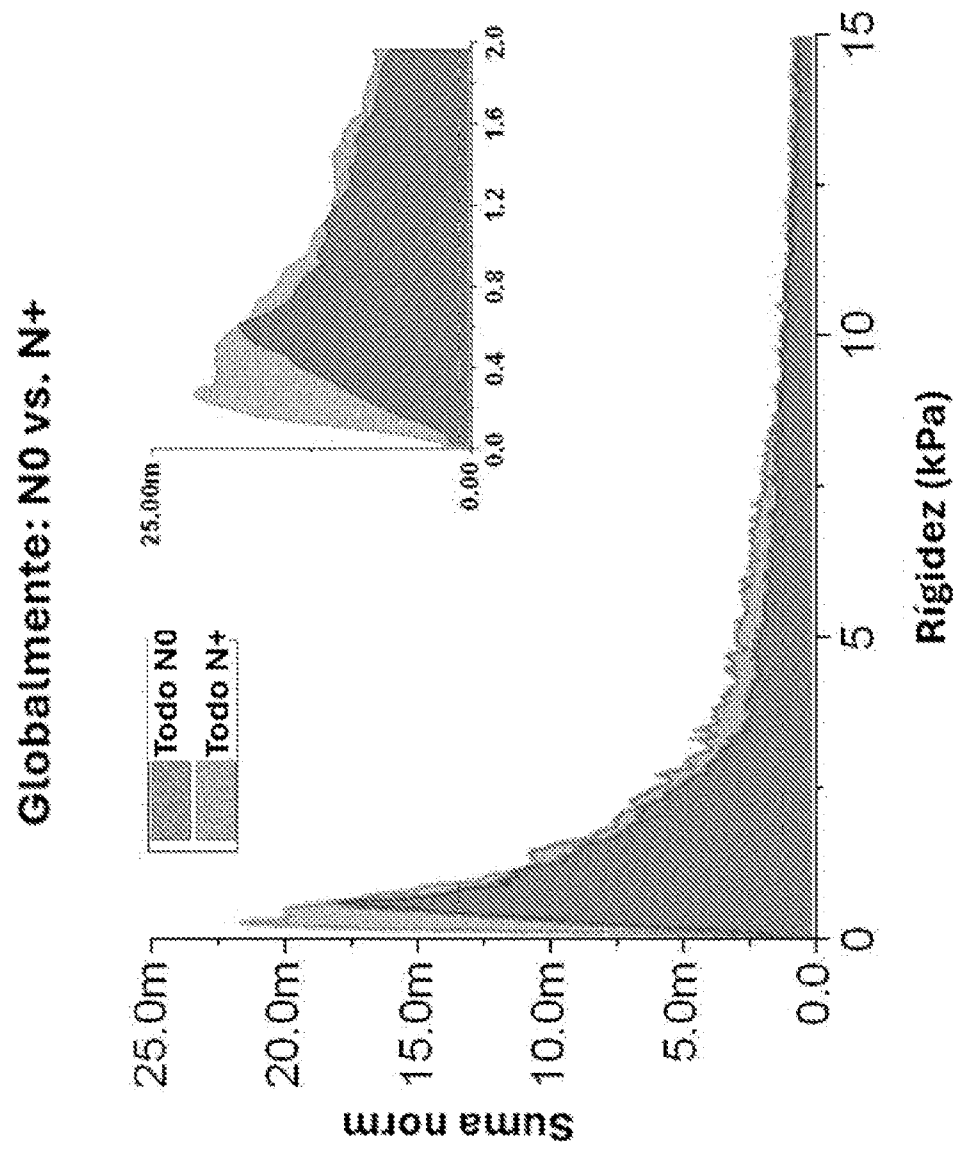


Fig. 5

N- y N+ Ganglios linfáticos

