

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 834**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2007 E 07762648 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1984030**

54 Título: **Métodos de detección de células tumorales circulantes y métodos de diagnóstico del cáncer en un sujeto mamífero**

30 Prioridad:

30.01.2006 US 763625 P

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

27.08.2013

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**KUHN, PETER y
MARRINUCCI, DENA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 420 834 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 de detección de células tumorales circulantes y métodos de diagnóstico del cáncer en un sujeto mamífero

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La descripción se refiere en general a un método para detectar células tumorales epiteliales circulantes en un sujeto mamífero y a métodos de diagnóstico del cáncer en un sujeto mamífero. Los métodos de detección o diagnóstico indican la presencia de cáncer metastásico o un cáncer en estadio temprano.

10

ANTECEDENTES

Se han observado células tumorales epiteliales circulantes (CTC) en sangre periférica de pacientes con cánceres de origen epitelial a concentraciones ultrabajas de 1 en 10^6 a 10^7 células mononucleares de sangre periférica. Kraeft *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:3020-3028, 2004; Kraeft *et al.*, Methods Mol. Med. 75:423-430, 2003; Meng *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:8152-8162, 2004; Witzig *et al.*, Clin. Cancer Res. 8:1085-1091, 2002; Pantel *et al.*, Curr. Opin. Oncol. 12:95-101, 2000; Gross *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 92:537-541, 1995. Se ha demostrado que el número de estas células se correlaciona con los resultados para las cohortes de pacientes con cáncer de mama metastásico con enfermedad progresiva en el momento del muestreo. Cristofanilli *et al.*, N. Engl. J. Med. 351:781-91, 2004. Por lo tanto, su caracterización es de considerable interés biomédico con el fin de entender cómo estas células pueden viajar a través del torrente sanguíneo a sitios anatómicamente distantes y dar lugar a una enfermedad metastásica. Por consiguiente, un instrumento para medir estas células podría ser una valiosa herramienta de diagnóstico.

15

20

25

La metástasis hematológica es la principal causa de mortalidad en el cáncer de mama, lo que contribuye a una estimación de 41.000 muertes en los Estados Unidos en 2005. Jemal *et al.* Cancer J. Clin. 55:10-30, 2005. Las pruebas indican que las células tumorales se desprenden de la masa tumoral primaria al torrente sanguíneo. Tarin, Cancer Metastasis Rev. 1:215-225, 1982; Tarin *et al.*, Cancer Res. 41:3604-3609, 1981; Klein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96:4.494-4.499, 1.999; Liotta *et al.*, Cell 64:327-336, 1991. Los factores implicados en la supervivencia de las CTC en la sangre y la metástasis final no son bien comprendidos. Chambers *et al.*, Breast Cancer Res. 2:400-407, 2000. Las CTC observadas en la sangre periférica de pacientes con cánceres de origen epitelial pueden identificarse utilizando ensayos de inmunofluorescencia por medio de anticuerpos monoclonales dirigidos contra citoqueratinas (CK), u otros marcadores específicos de células epiteliales. Moll, Subcell Biochem 31:205-262, 1998; Pantel *et al.*, J. Hemalother 3:165-173, 1994 Los ensayos clínicos prospectivos han establecido que estas células CK+ son malignas y su presencia en la sangre se correlaciona con un resultado desfavorable y una menor tasa de supervivencia, en varios estudios. Fehm *et al.*, Clin. Cancer Res. 8:2073-2084, 2002. Cristofanilli *et al.*, N. Engl. J. Med. 351:781-791, 2004; Cristofanilli *et al.*, J. Clin. Oncol. 23:1420-1430, 2005; Pierga *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:1392-1400, 2004.

30

35

40

El método más fiable actualmente disponible para la detección de CTC es la microscopía digital automatizada (MDA) mediante análisis de imágenes para el reconocimiento de las células tumorales marcadas inmunocitoquímicamente. Sin embargo, la MDA tiene la desventaja de unas velocidades de exploración muy lentas de 800 células/segundo. Kraeft *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:3020-8, 2004. La velocidad de exploración de la MDA está limitada por la latencia asociada con el hecho de desplazar por etapas la muestra muchas veces debido al limitado campo de visión.

45

Para salvar esta limitación de velocidad, se han desarrollado varias tecnologías de enriquecimiento de CTC para reducir el número total de células que necesitan ser exploradas. Hager *et al.*, Gynecol Oncol. 98:211-6, 2005; Rosenberg *et al.*, Cytometry 49:150-8, 2002; Witzig *et al.*, Clin. Cancer Res. 8:1085-1091, 2002; Umiel *et al.*, J Hematother Stem Cell Res. 9:895-904, 2000; Siewert *et al.*, Recent Results Cancer Res 158:51-60, 2001; el documento de EE.UU. 6.670.197 y Vona *et al.*, American Journal of Pathology, 156, 1, enero de 2000. Hasta la fecha el más exitoso de estos métodos de enriquecimiento es el enriquecimiento inmunomagnético (EIM). Smirnov *et al.*, Cancer Res. 65:4993-7, 2005; Allard *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:6897-904, 2004; Cristofanilli *et al.*, N. Engl. J. Med. 351:781-91, 2004; el documento de EE.UU. 2003/129676. En la mayoría de las aplicaciones de EIM, se dirigen anticuerpos monoclonales conjugados con pequeñas perlas magnéticas a la molécula de adhesión celular epitelial, EpCAM. A continuación, se manipulan las perlas en los campos magnéticos para el enriquecimiento. Sin embargo, se sabe que los niveles de expresión de EpCAM en las CTC están sustancialmente reducidos frente a los niveles de las células en los tejidos. Rao *et al.*, Int. J. Oncol. 27:49-57, 2005. Puesto que se observó una pérdida de sensibilidad en el enriquecimiento de células con expresión de EpCAM reducida, este método podría tener una baja sensibilidad para algunas CTC. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101:10501-4, 2004.

50

55

60

Motivado por las limitaciones de la tecnología disponible, se ha desarrollado un instrumento de exploración que utiliza la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica (FAST) que puede localizar las CTC a una velocidad 500 veces superior a la de la MDA con una sensibilidad comparable y una especificidad mejorada y, por consiguiente, no requiere una etapa de enriquecimiento. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101:10501-4, 2004; Curry *et al.*, Proc. de la 26ª conferencia internacional anual de la IEEE EMBS, San Francisco, CA, EE.UU., 1 al

65

5 de septiembre, 2004. El instrumento de exploración incluye un sistema de captación de luz que tiene un campo de visión muy amplio (50 mm), sin pérdida de la eficacia de captación. Esta amplia abertura de captación (un aumento de 100 veces en comparación con la MDA) se aplica con un haz delgado y extenso de filtros ópticos que captan la emisión fluorescente. Este campo de visión es lo suficientemente grande como para permitir una exploración continua y eliminar la necesidad de desplazamiento por etapas de la muestra, que es la principal fuente de latencia.

En la actualidad, las CTC se detectan y analizaron principalmente a través de marcadores inmunocitoquímicos tales como CK y el uso de tinción nuclear con DAPI. Aunque estos métodos han tenido éxito en la enumeración y distinción de las CTC, se diferencian de los métodos citopatológicos convencionales, ya que omiten la correlación con la tinción morfológica convencional de la que depende el diagnóstico patológico. Cristofanilli *et al.*, N. Engl. J. Med. 351:781-791, 2004; Fehm *et al.*, Cytotherapy 7:171-185, 2005 Esto crea dificultades a la hora de comparar las CTC con células tumorales de otros sitios obtenidas mediante procedimientos de diagnóstico de rutina. Aunque la capacidad de detectar las CTC tiene el potencial de ayudar en el diagnóstico y tratamiento individualizado del cáncer y en la eficacia del tratamiento, podría mejorarse la comprensión de la biología de las CTC incluyendo métodos citopatológicos convencionales. Existe la necesidad en la técnica de utilizar imágenes detalladas de alta resolución de las CTC con métodos de tinción convencionales para el diagnóstico patológico y la microscopía de campo claro para conferir el potencial de realizar un diagnóstico citopatológico convencional de carcinoma circulante y avanzar en la adopción de un diagnóstico utilizando las CTC en la práctica clínica.

RESUMEN

La invención proporciona un método para detectar células tumorales epiteliales circulantes en un sujeto mamífero con posible diagnóstico de cáncer que comprende:

- (i) montar una muestra de ensayo en un sustrato, proviniendo la muestra de ensayo de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de ensayo una población de células que no ha sido enriquecida en células tumorales circulantes;
- (ii) detectar la presencia o ausencia de un primer marcador en la muestra de ensayo, en el que el primer marcador es específico para las células tumorales epiteliales circulantes y es un marcador citoqueratina;
- (iii) detectar la presencia o ausencia de un segundo marcador en las células de la población de células o de un subconjunto de la población de células, en el que el segundo marcador es la morfología celular, el tamaño celular o la relación núcleo/citoplasma, y se detecta con una tinción citológica; y
- (iv) analizar la población de células detectadas por los marcadores primero y segundo para identificar las células tumorales epiteliales circulantes.

La invención también proporciona un método de cribado de un compuesto candidato a fármaco para el tratamiento del cáncer epitelial en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método:

- (i) montar unas muestras de ensayo primera y segunda en un sustrato, proviniendo la primera muestra de una muestra de sangre de un sujeto con posible diagnóstico de cáncer antes de tratar al sujeto con el compuesto candidato a fármaco, y siendo la segunda muestra de ensayo una muestra de sangre del sujeto después de tratar al sujeto con el compuesto candidato a fármaco, comprendiendo las muestras de ensayo una población de células que no ha sido enriquecida en células tumorales circulantes;
- (ii) detectar la presencia o ausencia de un primer marcador en las muestras de ensayo en las que el primer marcador es específico para las células tumorales epiteliales circulantes y es un marcador citoqueratina;
- (iii) detectar la presencia o ausencia de un segundo marcador en las células de la población de células o de un subconjunto de la población de células, en el que el segundo marcador es la morfología celular, el tamaño celular o la relación núcleo/citoplasma, y se detecta con una tinción citológica; y
- (iv) analizar la población de células detectada por los marcadores primero y segundo para identificar las células tumorales epiteliales circulantes en las muestras de ensayo antes del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco en comparación con después del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco; en el que la presencia de una disminución del número de células epiteliales tumorales circulantes en la muestra después del tratamiento en comparación con un número de células epiteliales tumorales circulantes en la muestra antes del tratamiento indica la eficacia del compuesto candidato a fármaco en el tratamiento del cáncer en el sujeto mamífero.

La presente descripción se refiere en general a un método para detectar células tumorales epiteliales circulantes (CTC) en un sujeto mamífero o un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto mamífero. La presente descripción proporciona adicionalmente un método de cribado de un compuesto candidato a fármaco en un sujeto mamífero como tratamiento contra el cáncer. El cáncer puede ser un cáncer metastásico o un cáncer en estadio temprano. La presente descripción proporciona adicionalmente un aparato para su uso en un método de detección de células tumorales circulantes para proporcionar el cribado, el seguimiento y la gestión de pacientes en el punto de atención médica del cáncer metastásico o un cáncer en estadio temprano.

Se describe un método para detectar células tumorales epiteliales circulantes en un sujeto mamífero con posible diagnóstico de cáncer que comprende obtener una muestra de ensayo de la sangre del sujeto mamífero,

comprendiendo la muestra de ensayo una población de células, montar la muestra de ensayo en un sustrato, detectar un primer marcador en la muestra de ensayo que se une selectivamente a las células tumorales circulantes, detectar un segundo marcador en la muestra de ensayo que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células, y analizar la población de células detectadas por los marcadores primero y segundo para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes. En un aspecto del método, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la presencia de cáncer metastático en el sujeto mamífero. En un aspecto adicional, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la presencia de un cáncer en estadio temprano en el sujeto mamífero, o la presencia o ausencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la existencia de un estado libre de enfermedad o de una patología no perceptible en el sujeto mamífero. En un aspecto adicional, la presencia o ausencia de células tumorales circulantes en la muestra supervisa la gestión del tratamiento durante el tratamiento del cáncer o la recuperación del cáncer. En un aspecto detallado, la población de células es una población de células mixtas. El sustrato puede ser un sustrato plano.

En un aspecto del método, el montaje de la muestra de ensayo en el sustrato plano forma una monocapa biológica. El primer marcador o el segundo marcador pueden ser un marcador fluorescente. En un aspecto adicional, el primer marcador se une selectivamente a las células epiteliales. En un aspecto detallado, el primer marcador es un marcador citoqueratina. El segundo marcador puede ser una tinción citológica para identificar la célula tumoral circulante por su morfología, tamaño o relación núcleo/citoplasma. La tinción citológica puede ser la de Wright-Giemsa. El primer marcador o el segundo marcador puede ser un marcador específico de célula. En un aspecto detallado, el marcador específico de célula es citoqueratina, CD45, M30, receptor de quimiocinas, CXCR1, CXCR4, CD44, CD24, VEGF, EGFR o HuR. La muestra de ensayo puede comprender adicionalmente una población de células separada mediante un tercer marcador. Un aspecto adicional del método comprende separar la población de células antes de montar la muestra de ensayo en el sustrato plano.

El método para detectar células tumorales circulantes en el sujeto mamífero comprende adicionalmente analizar la población de células por el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucléolos, la calidad del citoplasma o la cantidad de citoplasma. El método puede comprender adicionalmente analizar la población de células midiendo las células intactas con una relación núcleo/citoplasma alta, las células intactas con una relación núcleo/citoplasma baja, las células apoptóticas tempranas o las células apoptóticas tardías, e identificar las células tumorales circulantes. En otro aspecto del método, la detección del primer marcador comprende adicionalmente analizar la población de células mediante la fijación de las células al sustrato, explorar la población de células en el sustrato mediante una matriz de fibra óptica, y formar imágenes de las células por microscopía digital mediante una relocalización. En el método, la detección del segundo marcador comprende adicionalmente relocalizar las células epiteliales identificadas por el primer marcador mediante microscopía digital. En un aspecto detallado, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la presencia de cáncer, incluido pero no limitado a, linfoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de la corteza suprarrenal o cáncer de próstata.

Se describe un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto mamífero con posible diagnóstico de cáncer, en el que el método comprende obtener una muestra de ensayo de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de ensayo una población de células, montar la muestra de ensayo en un sustrato, detectar un primer marcador en la muestra de ensayo que se une selectivamente a las células tumorales circulantes, detectar un segundo marcador en la muestra de ensayo que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células, y analizar la población de células detectada por los marcadores primero y segundo para identificar y caracterizar las células tumorales circulantes. En un aspecto del método, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la presencia de cáncer metastático en el sujeto mamífero. En un aspecto adicional, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la presencia de un cáncer en estadio temprano en el sujeto mamífero, o la presencia o ausencia de las células tumorales circulantes en la muestra indica la existencia de un estado libre de enfermedad o de una patología no perceptible en el sujeto mamífero. En un aspecto adicional, la presencia o ausencia de las células tumorales circulantes en la muestra supervisa la gestión del tratamiento durante el tratamiento del cáncer o la recuperación del cáncer. En un aspecto detallado, la población de células es una población de células mixtas. El sustrato puede ser un sustrato plano.

En un aspecto del método, el montaje de la muestra de ensayo en el sustrato forma una monocapa biológica. El primer marcador o el segundo marcador puede ser un marcador fluorescente. En un aspecto adicional, el primer marcador se une selectivamente a las células epiteliales. En un aspecto detallado, el primer marcador es un marcador citoqueratina. El segundo marcador puede ser una tinción citológica para identificar la célula tumoral circulante por la morfología, el tamaño o la relación núcleo/citoplasma. La tinción citológica puede ser la de Wright-Giemsa. El primer marcador o el segundo marcador puede ser un marcador específico de célula. En un aspecto detallado, el marcador específico de célula es citoqueratina, CD45, M30, receptor de quimiocinas, CXCR1, CXCR4, CD44, CD24, VEGF, EGFR o HuR. La muestra de ensayo puede comprender adicionalmente una población de células separadas mediante un tercer marcador. Un aspecto adicional del método comprende separar la población de células antes de montar la muestra de ensayo en el sustrato. La población de células puede separarse

mediante varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante lisis de glóbulos rojos o separando las células para un marcador celular. La separación de células para un marcador celular puede producirse como una selección positiva para las células tumorales circulantes o como una selección negativa para eliminar las células no tumorales.

5 El método para el diagnóstico del cáncer en el sujeto mamífero comprende adicionalmente analizar la población de células por el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucléolos, la calidad del citoplasma o la cantidad de citoplasma. El método puede comprender adicionalmente analizar la población de células midiendo las células intactas con una relación núcleo/citoplasma alta, las células intactas con una relación núcleo/citoplasma baja, las células apoptóticas tempranas o las células apoptóticas tardías, e identificar las células tumorales circulantes. En otro aspecto del método, la detección del primer marcador comprende adicionalmente analizar la población de células fijando las células al sustrato, explorando la población de células en el sustrato mediante una matriz de fibra óptica y formando imágenes de las células por microscopía digital mediante una relocalización. En el método, la detección del segundo marcador comprende adicionalmente relocalizar las células epiteliales identificadas por el primer marcador mediante microscopía digital. En un aspecto detallado, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica la presencia de cáncer, incluido pero no limitado a, linfoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de la corteza suprarrenal o cáncer de próstata.

25 En un aspecto del método, la presencia de células epiteliales tumorales circulantes en la muestra indica la probabilidad de recurrencia del cáncer en el sujeto mamífero. En un aspecto adicional del método, la presencia de células tumorales circulantes en la muestra indica el estado de remisión del cáncer en el sujeto mamífero.

30 Se describe un método de cribado de un compuesto candidato a fármaco para el tratamiento del cáncer en un sujeto mamífero, en el que el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto candidato a fármaco al sujeto mamífero con posible diagnóstico de cáncer, obtener muestras de ensayo a partir de sangre del sujeto antes y después del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco, comprendiendo las muestras de ensayo una población de células que se sospecha pueda contener células tumorales circulantes, montar las muestras de ensayo en un sustrato, detectar un primer marcador en las muestras de ensayo que se une selectivamente a las células tumorales circulantes, detectar un segundo marcador en las muestras de ensayo que se une a la población de células o a un subconjunto de la población de células, y analizar la población de células detectada por los marcadores primero y segundo para identificar las células tumorales circulantes en las muestras de ensayo antes del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco en comparación con después del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco, en el que la presencia de una disminución del número de células tumorales circulantes en la muestra después del tratamiento en comparación con un número de células tumorales circulantes en una muestra antes del tratamiento indica la eficacia del compuesto candidato a fármaco en el tratamiento del cáncer en el sujeto mamífero. El cáncer puede ser un cáncer metastásico o un cáncer en estadio temprano. La población de células puede ser una población de células mixtas. El sustrato puede ser un sustrato plano.

45 En un aspecto del método, el montaje de la muestra de ensayo en el sustrato forma una monocapa biológica. El primer marcador o el segundo marcador puede ser un marcador fluorescente. En un aspecto adicional, el primer marcador se une selectivamente a las células epiteliales. En un aspecto detallado, el primer marcador es un marcador citoqueratina. El segundo marcador puede ser una tinción citológica para identificar la célula tumoral circulante por la morfología, el tamaño o la relación núcleo/citoplasma. La tinción citológica puede ser la de Wright-Giemsa. El primer marcador o el segundo marcador puede ser un marcador específico de célula. En un aspecto detallado, el marcador específico de célula es citoqueratina, CD45, M30, receptor de quimiocinas, CXCR1, CXCR4, CD44, CD24, VEGF, EGFR o HuR. La muestra de ensayo puede comprender adicionalmente una población de células separadas mediante un tercer marcador. Un aspecto adicional del método comprende la separación de la población de células antes de montar la muestra de ensayo en el sustrato. La población de células puede separarse mediante varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante lisis de glóbulos rojos o separando las células para un marcador celular. La separación de células para un marcador celular puede producirse como una selección positiva para las células tumorales circulantes o como una selección negativa para eliminar las células no tumorales.

60 El tipo de cáncer incluye, pero no se limita a, linfoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rhabdomyosarcoma, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de la vejiga urinaria, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de la corteza suprarrenal o cáncer de próstata.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 La figura 1 muestra la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica (FAST).

La figura 2 muestra un ejemplo de una célula tumoral circulante (CTC) identificada por un patólogo encontrada en la sangre periférica de un paciente con cáncer de mama (20x).

La figura 3 muestra un gráfico de la intensidad total de objetos identificados por FAST para un paciente con cáncer y para células HT-29 en un sustrato separado utilizado para supervisar la preparación de la muestra.

La figura 4 muestra una tinción de Wright-Giemsa y una imagen de fluorescencia de una CTC típica encontrado en pacientes con cáncer de mama.

La figura 5 muestra un ejemplo de CTC identificada por un patólogo encontrada en la sangre periférica de un paciente con cáncer de mama (60x) y una tinción de Wright-Giemsa correspondiente de la misma CTC (100x).

La figura 6 muestra un espectro de CTC teñidas con Wright-Giemsa y con fluorescencia identificadas en un paciente.

La figura 7 muestra una probable CTC experimentando la fase final de apoptosis.

Las figuras 8A-8D muestran las características histológicas y citológicas de un tumor primario y metastásico en un paciente.

La figura 9 muestra las CTC apoptósicas verificadas como CK+ caspasa-3⁺ encontradas en un paciente con cáncer de mama.

La figura 10 muestra el estado y los recuentos de CTC de pacientes con enfermedad progresiva, determinado mediante hallazgos clínicos y/o radiológicos con mayor probabilidad de tener CTC detectadas en sangre periférica mediante el tándem FAST-MDA.

La figura 11 muestra la tasa de supervivencia global de los pacientes con cáncer de mama en base a la determinación de CTC mediante el tándem FAST-MDA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se refiere en general a un método para detectar células tumorales epiteliales circulantes (CTC) en un sujeto mamífero o a un método de diagnóstico del cáncer metastásico o un cáncer en estadio temprano en un sujeto mamífero. La presente descripción se refiere adicionalmente a un método de cribado de un compuesto candidato a fármaco en un sujeto mamífero para el tratamiento del cáncer metastásico. Se describe el método para detectar CTC en el sujeto mamífero, que comprende obtener de un tejido del sujeto mamífero con posible diagnóstico de cáncer, una muestra de sangre que comprende una población de células mixtas que se sospecha pueda contener CTC, montar las células sanguíneas y las CTC en un sustrato para formar una monocapa biológica, detectar en la monocapa biológica un primer marcador que se une selectivamente a las CTC, detectar en la monocapa biológica un segundo marcador que se une a la población de células mixtas o a un subconjunto de la población de células mixtas, analizar la población de células detectada por el primer marcador y el segundo marcador para identificar las CTC, indicando la presencia de CTC en la muestra la presencia de cáncer metastásico o cáncer en estadio temprano en el sujeto mamífero. La presencia o ausencia de CTC en la muestra puede indicar la existencia de un estado libre de enfermedad o de una patología no perceptible en el sujeto mamífero.

Aunque no según la presente invención, el método podría proporcionar un protocolo de fijación de células para identificar células de origen epitelial dentro de una muestra de sangre, junto con la tecnología de exploración de matriz de fibras (FAST) para detectar las CTC en la sangre de pacientes con cáncer. En este protocolo, se aíslan en un portaobjetos, por ejemplo, como una monocapa biológica, glóbulos blancos (GB) vivos, por ejemplo, leucocitos y otras células de la sangre. Los leucocitos incluyen, pero no se limitan a: linfocitos T, monocitos, eosinófilos y neutrófilos, implicados en la fagocitosis; y basófilos implicados en la respuesta inflamatoria. En un método de la presente invención, los GB y las CTC se fijan en portaobjetos adhesivos especialmente recubiertos y marcados mediante inmunofluorescencia con un cóctel de anticuerpos anti-citoqueratina (CK) en la superficie del portaobjetos después de la fijación y la permeabilización. Como las células normales de la sangre y de la médula ósea son de origen mesenquimal, no expresan las proteínas CK, haciendo que las células epiteliales diseminadas sean fácilmente distinguibles de las células sanguíneas normales. A continuación, se analizan los portaobjetos mediante FAST y se obtienen las coordenadas de las células raras en cada portaobjetos.

Pueden utilizarse los métodos que utilizan FAST y el protocolo de fijación celular para investigar la prevalencia de las CTC en pacientes con cáncer de pulmón y de mama metastásico. Una ventaja adicional del método permite al patólogo relocalizar y examinar las células de interés para la caracterización y confirmación patológica. En la presente invención, el protocolo incluye adicionalmente retirar el cubreobjetos y/o solubilizar los medios de montaje solubles en agua en cada portaobjetos teñido con fluorescencia y volver a teñir las mismas células mediante un segundo marcador celular, por ejemplo, una tinción de Wright-Giemsa convencional, para aportar una mayor comprensión de la morfología, el tamaño y la heterogeneidad de las CTC. Los grupos de células raras y las células raras individuales CK⁺ conocidas que se localizaron mediante FAST y el protocolo de fijación celular pueden evaluarse morfológicamente. Aunque las imágenes de fluorescencia de las CTC han ayudado a verificar su identidad, la tinción de Wright-Giemsa ha proporcionado información citológica adicional sobre las CTC. En un aspecto adicional de la descripción, puede utilizarse el método para evaluar los diferentes marcadores celulares que son específicos para una enfermedad, una patología, un tipo de célula o un estado celular.

La capacidad para detectar y caracterizar las CTC tiene el potencial de ayudar en el diagnóstico y el tratamiento individualizado de los pacientes con cáncer. Debido a su rareza, se requieren métodos especiales para

investigar las CTC. La presente invención proporciona un enfoque que permite el uso de métodos citopatológicos convencionales para la caracterización morfológica detallada de las CTC en sangre obtenida de pacientes con cáncer de mama y proporciona detalles de las características citológicas de un espectro de CTC. Las células nucleadas recuperadas de sangre entera se depositan en portaobjetos adhesivos, marcados mediante inmunofluorescencia, y se analizan con la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica para la detección de CTC. El acoplamiento de estas técnicas con los métodos de tinción de rutina permite la identificación y la evaluación de las CTC utilizando la microscopía óptica. Al utilizar métodos patológicos convencionales para observar las células, las CTC presentan un alto grado de pleomorfismo inter- e intra-paciente en las preparaciones de sangre entera, y las CTC intactas se identifican con unas relaciones núcleo/citoplasma alta y baja junto con las CTC que presentan características apoptóticas. Las observaciones morfológicas sugieren que también puede verse circulando en sangre el espectro completo de células presentes en los sitios del tumor primario y metastásico, y además proporcionan un posible marco de clasificación morfológica dentro del cual investigar las propiedades de los subconjuntos de células implicadas en la metástasis.

Se ha validado para la identificación de CTC un protocolo de fijación celular que utiliza la inmunofluorescencia indirecta para las células de origen epitelial, utilizado junto con la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica (FAST) para la detección de CTC. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101:10501-10504, 2004. El sistema FAST ha establecido su utilidad potencial para la detección de CTC en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama metastásico. La presente invención proporciona los resultados de este enfoque en tándem con métodos de tinción para el diagnóstico patológico, por ejemplo, la tinción de Giemsa o la tinción de fluorescencia, y microscopía óptica para estudiar la heterogeneidad de las CTC y comparar los resultados con el análisis de tejido tumoral primario y metastásico. Este enfoque permite una verificación de alta calidad de las CTC de sangre obtenida de pacientes con cáncer y ha facilitado la creación de una galería de imágenes que proporciona características morfológicas y citológicas detalladas de un espectro de CTC.

MICROSCOPIA DIGITAL AUTOMATIZADA Y TECNOLOGÍA DE EXPLORACIÓN DE MATRIZ DE FIBRA ÓPTICA

Se proporcionan métodos para detectar células tumorales de origen epitelial que circulan en sangre periférica a concentraciones ultra-bajas en pacientes con cáncer. Aunque no según la presente invención, podría desarrollarse un instrumento capaz detectar rápidamente y con precisión células raras en circulación mediante la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica (FAST). El citómetro FAST puede localizar células raras marcadas mediante inmunofluorescencia en sustratos de vidrio a velocidades de exploración 500 veces superiores a las de la microscopía digital automatizada convencional. Estas altas velocidades de exploración se logran captando las emisiones de fluorescencia utilizando un haz de fibras con un amplio campo de visión (50 mm). Las altísimas velocidades de exploración hacen posible la capacidad de detectar eventos raros sin el requisito de una etapa de enriquecimiento. Se utilizó el citómetro FAST para detectar, formar imágenes y volver a formar imágenes de las CTC en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama. Esta tecnología tiene el potencial de servir como herramienta de diagnóstico y pronóstico clínicamente útil para los oncólogos en el punto de atención médica. El uso de un sustrato fijo permite volver a identificar y volver a teñir las células, lo que permite obtener información biológica y morfológica adicional a partir de células identificadas y recogidas con anterioridad.

Se ha utilizado la tecnología FAST para la detección a alta velocidad de las CTC en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en estadio IV. La exploración por FAST permite la formación eficaz de imágenes de las CTC con MDA de manera que 10 ml de sangre que contienen aproximadamente 60 millones de glóbulos blancos puede evaluarse en 80 minutos. Los avances tecnológicos deberían permitir la reducción de este tiempo de exploración más de un 75%. Se utilizan adicionalmente imágenes MDA de alta resolución para la identificación de CTC. Los resultados apoyan el uso de este instrumento para el cribado, el seguimiento y la gestión de pacientes en el punto de atención médica. Por último, la capacidad de relocalizar las células permite la caracterización morfológica y potencialmente la molecular de las CTC, demostrando así su valor potencial para la investigación de las metástasis.

La microscopía digital automatizada (MDA) en combinación con la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica (FAST) es un método fiable para detectar células cancerosas en sangre y una herramienta importante para el diagnóstico y seguimiento de tumores sólidos en las primeras etapas. El método de detección preferente, MDA, es demasiado lento para explorar zonas amplias de sustrato. Un enfoque que utiliza FAST aplica técnicas de impresión láser para el problema de detección de las células raras. Con la citometría FAST, se utiliza la óptica de impresión láser para excitar 300.000 células por segundo, y la emisión se capta en un campo de visión muy amplio, lo que permite una aceleración 500 veces mayor frente a la MDA con una sensibilidad comparable y una especificidad superior. La combinación de enriquecimiento FAST y formación de imágenes MDA tiene el rendimiento necesario para una detección fiable en sangre del cáncer en estadio temprano. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 101:10501-10504, 2004.

Se estima que las CTC están presentes en circulación a concentraciones entre 10^{-6} y 10^{-7} . Pantel y Otte, Semin. Cancer Biol 11:327-237, 2001. En el caso del extremo inferior de este intervalo, 10^{-7} , se necesita una muestra de al menos 100 millones de células hematopoyéticas para detectar al menos una CTC con una probabilidad elevada (99,995%). El análisis de MDA de una muestra de este tamaño tardaría 18 horas, lo que da

como resultado 3.000-30.000 objetos para un examen citopatológico. Borgen, *et al.*, Cytometry 46:215-221, 2001; Bauer, *et al.*, Clin. Cancer Res. 6:3.552-2.559, 2.000; Kraeft, *et al.*, Clin. Cancer Res. 6:434-442, 2000; Mehes, *et al.*, Cytometry 42:357-362, 2000. En base al rendimiento utilizando MDA y FAST, una exploración previa mediante FAST de 100 millones de células tardaría 5 minutos y daría como resultado 1.500 objetos para una nueva exploración posterior mediante MDA. Con la mejora de la especificidad del enfoque en tándem, esta nueva exploración con MDA requeriría un examen manual posterior de sólo 300 objetos. Con el enfoque en tándem, la tarea de cribar 100 millones de células hematopoyéticas podría ser completada en 1 hora.

Microscopía Digital Automatizada. Se podrían alimentar las coordenadas de las células potenciales identificadas por el citómetro FAST al sistema de formación de imágenes de eventos raros (REIS), un sistema de microscopía digital de exploración totalmente automatizado. Los componentes de hardware del REIS y el software de exploración patentado se han descrito detalladamente en otra parte. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. EE.UU. 101:10501-10504, 2004; Kraeft *et al.*, Clin. Cancer Res. 6:434-442, 2060; Kraeft *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:3020-3028, 2004.

Sistema óptico. El amplio campo de visión podría ser habilitado por un haz de fibra óptica con los extremos asimétricos. Como se muestra en la figura 1, el extremo de captación es largo (50 mm) y estrecho (2 mm), mientras que el extremo de transmisión es circular (11,3 mm de diámetro). Cuando está en funcionamiento, un láser de iones de argón explora el sustrato que está encima del extremo de captación, y la emisión captada se colima posteriormente después de la abertura circular. La emisión de las sondas fluorescentes se filtra utilizando filtros dicróicos convencionales antes de la detección en un fotomultiplicador. La muestra se mueve por del trayecto de exploración del láser en una platina que se desplaza en una dirección ortogonal a la dirección de exploración del láser. La ubicación de una célula fluorescente se determina con precisión mediante las posiciones de la platina y la exploración en el momento de la emisión. La mecánica de la exploración permite una determinación precisa del lugar de emisión (mejor que 100 μm) para su posterior revisión. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. Ciencia. EE.UU. 101:10501-10504, 2004.

Se hace funcionar el láser a una velocidad de 100 exploraciones por segundo utilizando un espejo girado por galvanómetro, mientras que el sustrato se mueve a $2 \text{ mm} \cdot \text{seg}^{-1}$ sobre el mismo, lo que produce una velocidad de exposición de $1 \text{ cm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$. El galvanómetro puede operar a esta velocidad de exploración en un ángulo de exploración de 25° con respuesta temporal lineal angular. Una lente de campo F-Theta transforma la deflexión del espejo real de $15,2^\circ$ en desplazamiento lineal con una precisión de transformación superior al 0,1%, lo que da como resultado una distorsión reproducible sobre el campo de $<82 \mu\text{m}$ que puede eliminarse en el software. El haz enfocado de 10 μm de diámetro es transformado en un tamaño de punto elíptico, $10 \times 20 \mu\text{m}$, por el ángulo de incidencia de 60° . El eje mayor de la elipse, que es normal a la dirección de barrido, define la resolución de píxeles a lo largo de una dimensión. La velocidad de barrido de $10 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ define el tiempo de tránsito por píxel de 1 μseg .

El umbral de detección intrínseca del citómetro FAST se determina actualmente mediante la autofluorescencia procedente del borosilicato de la fibra óptica y las lentes de colimación que es estimulada por la luz láser dispersada. Para una potencia de láser de 50 mW que incide sobre un sustrato de cuarzo, esta autofluorescencia es ≈ 15 veces la combinación de todas las demás fuentes de ruido (tales como el ruido de la electrónica) y corresponde a la emisión equivalente de 1.000 moléculas de fluoresceína. Sin embargo, para la detección de OTC la autofluorescencia medida procedente de la sangre excede esta autofluorescencia intrínseca en 10 veces, y, por consiguiente, es la autofluorescencia procedente de la sangre la que determina el umbral de detección eficaz para esta aplicación.

Se realizó una comparación del umbral de detección entre FAST y la microscopía digital en presencia de autofluorescencia procedente de la sangre utilizando un portaobjetos de calibración que contenía una serie de diluciones de colorante Alexa Fluor 488 en filas que diferían en la concentración por un factor de 2. Ambos instrumentos exploraron los portaobjetos, y se comparó la intensidad de la señal para cada fila con la potencia de la autofluorescencia procedente de una muestra de sangre en condiciones de exploración idénticas. En presencia de autofluorescencia de fondo, FAST puede detectar una fluorescencia celular que sea aproximadamente ocho veces más débil que la que puede ser detectada con un microscopio digital. Esta diferencia puede atribuirse a una combinación de una mayor eficacia de excitación de la sonda Alexa Fluor 488 por el láser de 488 nm y una mayor eficacia de excitación de la autofluorescencia procedente de la sangre por la fuente de luz de mercurio de banda ancha del microscopio. Esta ventaja en la detección permite que FAST detecte células con niveles más bajos de fluorescencia y, por lo tanto, niveles más bajos de proteína diana expresada.

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

En un aspecto de la invención, el método para detectar células tumorales epiteliales circulantes en un sujeto mamífero o el método de diagnóstico del cáncer metastásico en un sujeto mamífero utiliza un aparato para

5 formar imágenes de una superficie generalmente plana. Véanse las solicitudes de EE.UU. nº 2004/0071330 y nº 2004/0071332. Aunque no según la presente invención, en un aspecto adicional, el método podría utilizar un aparato generador de imágenes capaz detectar rápidamente y con precisión células raras en circulación utilizando la tecnología de exploración de matriz de fibra óptica (FAST). Podría utilizarse un aparato generador de imágenes para formar imágenes de una superficie generalmente plana. Una platina de traslación lineal traslada linealmente la superficie en una primera dirección. Un haz de fibra óptica tiene un primer extremo de unos extremos de la primera fibra paralelos dispuestos para definir una abertura de entrada lineal dispuesta perpendicular a la primera dirección y paralela a la superficie. El haz de fibra óptica tiene además un segundo extremo que define una abertura de salida generalmente circular. Cada primer extremo de la fibra se comunica ópticamente con la abertura de salida generalmente circular. Una fuente de radiación de exploración explora linealmente un haz de radiación a lo largo de la superficie generalmente plana bajo la abertura de entrada. El haz de radiación interactúa con la superficie para producir una señal luminosa que es captada por la abertura de entrada y transmitida por el haz de fibra óptica hasta la abertura de salida. Se dispone un fotodetector para que detecte la señal luminosa en la abertura de salida generalmente circular. Un procesador de rasterización se comunica con la platina del generador de imágenes y la fuente de radiación de exploración para coordinar la exploración del haz de radiación y la traslación lineal de la superficie para efectuar una rasterización del haz de radiación en la superficie.

20 Puede prepararse una muestra como una monocapa biológica extrayendo una muestra de un fluido biológico, incluido pero no limitado a, sangre o partes de sangre de un sujeto. En un aspecto, la muestra es una monocapa de células. La muestra de fluido se trata con un material fluorescente, tal como, pero no limitado a, un colorante marcador, que se une selectivamente a diferentes tipos de moléculas biológicas, que pueden estar en la superficie o en el interior de la célula, tales como proteínas, ácidos nucleicos u otras moléculas. En la técnica se conocen marcadores adecuados para el marcado de varios tipos diferentes de células de interés clínico, incluidos los tipos de células cancerosas, células fetales u otras células apropiadas seleccionadas a considerar. Pueden desarrollarse, entre otros, marcadores para numerosas otras células tales como células cerebrales, células hepáticas, así como células bacterianas. El material emite una señal característica, tal como fluorescencia o fosforescencia, sensible a una irradiación de excitación seleccionada, tal como irradiación mediante una longitud de onda o espectro luminoso, irradiación de rayos X, irradiación con haz de electrones, o similares, seleccionados. La luminiscencia característica tiene por lo general una longitud de onda o rango espectral de longitudes de onda características. Mientras que los colorantes son el proceso de marcado predominante, existen otras técnicas incluidas el uso de marcadores conocidos como sondas de nano-partículas de ADN y puntos cuánticos.

35 Aunque no según la presente invención, en otro aspecto, podrían utilizarse un aparato y un método para identificar células raras en una monocapa biológica. Véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. Nº 2004/0071332. Las células raras en la monocapa biológica emiten una luminiscencia característica sensible a la exposición a una radiación de excitación. Una platina de traslación es capaz de trasladar la monocapa biológica en una primera y en una segunda dirección. Un haz de fibra óptica incluye una pluralidad de fibras que tienen cada una un primer extremo y un segundo extremo. Los primeros extremos están dispuestos para definir una abertura de recepción generalmente rectangular que tiene una gran relación de aspecto cuya dimensión larga es perpendicular a la primera dirección. Los segundos extremos están dispuestos para definir una abertura de salida que tiene una forma compacta. Una fuente de radiación barre linealmente un haz de radiación de excitación a través de la primera porción de la monocapa biológica con una dirección de barrido perpendicular a la primera dirección. Se dispone una zona de interacción de la fuente de radiación y la primera porción de la monocapa biológica con relación a la abertura de recepción de manera que la luminiscencia característica producida en la zona de interacción sea captada por la abertura de recepción. Se dispone un fotodetector para que detecte la luminiscencia característica captada en la abertura de salida. Un controlador controla la traslación de la platina del generador de imágenes y el barrido de la fuente de radiación para rasterizar el haz de radiación de excitación a través de la primera porción de la monocapa biológica para identificar células raras en la primera parte de la monocapa biológica en base a la luminiscencia característica detectada durante la rasterización. El controlador controla adicionalmente la traslación de la platina de traslación en una segunda dirección para colocar una segunda porción de la monocapa biológica en una posición en la que la fuente de radiación barre linealmente el haz de radiación de excitación a través de la segunda porción de la monocapa biológica con una dirección de barrido perpendicular a la primera dirección. Se disponen una zona de interacción de la fuente de radiación y la segunda porción de la monocapa biológica con relación a la abertura de recepción de manera que la luminiscencia característica que se produce en la zona de interacción sea captada por la abertura de recepción. Se dispone el fotodetector para que detecte la luminiscencia característica captada en la abertura de salida de la segunda porción.

60 Aunque no según la presente invención, en otro aspecto podría concebirse un método para obtener una posición de una célula rara, por ejemplo, una célula tumoral circulante (CTC), dentro de una monocapa biológica. Véase, por ejemplo, la solicitud de EE.UU. Nº 2004/0131241. Se coloca un portaobjetos que porta al menos una célula rara y tiene marcas de retícula dispuestas en posiciones que forman sustancialmente un ángulo recto, en un soporte de portaobjetos de un primer sistema de formación de imágenes. Se define un primer espacio de coordenadas del sistema de formación de imágenes, y se asignan las coordenadas de las marcas de retícula en el primer espacio de coordenadas. Se define un segundo espacio de coordenadas de un segundo sistema de formación de imágenes, y se asignan las coordenadas de las marcas de retícula en el segundo espacio de coordenadas. Utilizando las coordenadas asignadas de las marcas de retícula del primer espacio de coordenadas,

se calculan los parámetros de conversión de coordenadas. Después de ello, se asignan las coordenadas de al menos un objeto en el primer espacio de coordenadas, y las coordenadas del primer espacio de coordenadas del objeto se convierten en coordenadas únicas en un segundo espacio de coordenadas, utilizando los parámetros de conversión de coordenadas.

5 Una vez que la célula rara o CTC ha sido localizada, puede retirarse el cubreobjetos sobre la monocapa biológica o pueden solubilizarse los medios de montaje solubles en agua en cada portaobjetos teñido con fluorescencia. Pueden volver a teñirse las mismas células utilizando un segundo marcador celular, por ejemplo, tinción de Wright-Giemsa convencional para aportar una mayor comprensión de la morfología, el tamaño y la heterogeneidad de las CTC. Pueden localizarse y evaluarse morfológicamente grupos de células raras y células raras individuales positivas para citoqueratina (CK⁺) conocidas. Aunque las imágenes de fluorescencia de las CTC han ayudado a verificar su identidad, la tinción de Wright-Giemsa ha proporcionado información adicional sobre las CTC.

10 Aunque no según la presente invención, en un aspecto adicional, podría utilizarse este proceso para evaluar los diferentes marcadores celulares que son específicos para una enfermedad, una patología, un tipo de célula o un estado celular. Los métodos de la presente invención ayudarán a caracterizar las CTC. Permite una verificación de alta calidad de las CTC a partir de sangre obtenida de pacientes con cáncer sin enriquecimiento, y aportan una mayor comprensión de la morfología y las características de las CTC.

15 La búsqueda de CTC metastásicas raras sugiere que muchas CTC son apoptóticas e incapaces de formar metástasis, y se estima que sólo 1 célula cancerosa diseminada de entre 10.000 incluso puede establecer una metástasis. Por lo tanto, la detección, la clasificación morfológica y la caracterización molecular de estas células raras podrían dirigirse a tratamientos dirigidos y novedosos, lo que demuestra la importancia clínica de las CTC.

20 Debe entenderse que la presente invención no se limita a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos concretos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el fin de describir formas de realización concretas solamente, y no pretende ser limitativa. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similar.

25 El término "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende abarcar variaciones del $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferentemente $\pm 5\%$, incluso más preferentemente $\pm 1\%$, y aún más preferentemente $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos descritos.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención. Aunque puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica para el ensayo de la presente invención, en el presente documento se describen los materiales y métodos preferentes. Al describir y reivindicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

35 "Monocapa biológica" se refiere a una muestra de sangre que puede existir en diversos estados de separación o purificación celular. Por ejemplo, la monocapa biológica puede estar parcialmente purificada y contener células mononucleares y otras células después de haberse producido la lisis de los glóbulos rojos.

40 "Separación de la población de células antes de montar la muestra de ensayo en un sustrato" se refiere a la eliminación de un subconjunto de la población de células de la muestra de ensayo, por ejemplo, la muestra de sangre. La separación puede producirse mediante lisis selectiva de células y centrifugación de una subfracción de las células. La separación también puede producirse utilizando un marcador celular fluorescente y la separación de células activadas por fluorescencia. La separación de células para un marcador celular puede producirse como una selección positiva para las células tumorales circulantes o como una selección negativa para eliminar las células no tumorales.

45 El "sustrato" sostiene la muestra de ensayo, por ejemplo, una muestra de sangre que contiene células montadas para la detección y el análisis. En un aspecto, el sustrato puede ser plano. En un aspecto adicional, el sustrato puede tener cierta curvatura. El sustrato puede explorarse mediante el sistema FAST y las células tumorales circulantes pueden localizarse por microscopía digital.

50 "Sujeto", "sujeto mamífero" o "paciente" se refiere a cualquier sujeto o paciente mamífero al que pueden aplicarse los métodos de la invención. "Mamífero" se refiere a pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales de experimentación tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. En una forma de realización ejemplar de la presente invención, para identificar a los sujetos pacientes para el tratamiento según los métodos de la invención, se emplean métodos de cribado aceptados para determinar los factores de riesgo asociados con una

65

afección o enfermedad posible o diana, por ejemplo, cáncer, o para determinar el estado de una afección o enfermedad existente en un sujeto. Estos métodos de cribado incluyen, por ejemplo, tratamientos convencionales para determinar los factores de riesgo que pueden estar asociados con la afección o enfermedad posible o diana. Estos y otros métodos de rutina permiten al médico seleccionar pacientes que necesitan el tratamiento utilizando los métodos y las formulaciones de la invención.

"Cáncer", "malignidad", "tumor sólido" o "trastorno hiperproliferativo" se utilizan como términos sinónimos y se refieren a cualquiera de una serie de enfermedades que se caracterizan por la proliferación anormal y no controlada de las células, la capacidad de las células afectadas de diseminarse localmente o a través del torrente sanguíneo y del sistema linfático a otras partes del cuerpo (es decir, generar metástasis), así como cualquiera de una serie de características estructurales y/o moleculares distintivas. Una "célula maligna" o "cancerosa" o una "célula de tumor sólido" se entiende como una célula que tiene propiedades estructurales específicas, no está diferenciada y es capaz de invadir y generar metástasis. "Cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasias o tumores malignos encontrados en mamíferos, incluidos los carcinomas y sarcomas. Son ejemplos los cánceres de mama, de pulmón, de pulmón de células no pequeñas, de estómago, de cerebro, de cabeza y cuello, meduloblastoma, de hueso, de hígado, de colon, genitourinario, de vejiga, del aparato urinario, de riñón, testicular, de útero, de ovario, de cuello uterino, de próstata, melanoma, mesotelioma y sarcoma. (Véase DeVita, *et al.*, (Eds.), 2001, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6ª Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). "Enfermedad hiperproliferativa" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento del tejido normal. Por lo tanto, una célula hiperproliferativa es una célula que está proliferando más rápidamente que las células normales.

"Asociado al cáncer" se refiere a la relación de un ácido nucleico y su expresión, o la falta del mismo, o una proteína y su nivel o actividad, o la falta de la misma, con la aparición de malignidad en una célula sujeto. Por ejemplo, el cáncer puede asociarse con la expresión de un gen concreto que no se expresa, o que se expresa a menor nivel, en una célula normal y saludable. A la inversa, un gen asociado al cáncer puede ser uno que no se expresa en una célula maligna (o en una célula en proceso de transformación), o que se expresa a menor nivel en la célula maligna de lo que lo hace en una célula normal y saludable.

En el contexto del cáncer, el término "transformación" se refiere al cambio que experimenta una célula normal a medida que se convierte en maligna. En los eucariotas, el término "transformación" puede utilizarse para describir la conversión de células normales en células malignas en cultivo celular.

"Células proliferantes" son aquellas que están experimentando activamente la división celular y creciendo exponencialmente. "Pérdida del control de la proliferación celular" se refiere a la propiedad de las células que han perdido los controles del ciclo celular que garantizan normalmente la restricción apropiada de la división celular. Las células que han perdido tales controles proliferan a un ritmo más rápido de lo normal, sin señales estimuladoras, y no responden a las señales inhibitorias.

"Cáncer avanzado" se refiere a un cáncer que ya no está localizado en el sitio del tumor primario o un cáncer que está en estadio III o IV según la American Joint Committee on Cancer (AJCC).

"Bien tolerado" se refiere a la ausencia de cambios adversos en el estado de salud que se producen como resultado del tratamiento y que influirán en las decisiones sobre el tratamiento.

"Metastásico" se refiere a células tumorales, por ejemplo, cáncer genitourinario o tumor sólido humano, que son capaces de establecer lesiones tumorales secundarias en los pulmones, el hígado, los huesos o el cerebro de ratones inmunodeprimidos tras la inyección en la almohadilla de grasa mamaria y/o en el sistema circulatorio del ratón inmunodeprimido.

"Cáncer en estadio temprano" se refiere a células tumorales que no se han diseminado desde el origen del sitio primario del tumor a otros lugares del cuerpo, o se refiere a células tumorales no metastásicas.

Un "primer marcador" y un "segundo marcador" identifican una célula tumoral circulante mediante tinción citológica o mediante un marcador específico de célula. Las tinciones citológicas incluyen, pero no se limitan a, tinción de Wright-Giemsa, u otras tinciones citológicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, B.F. Atkinson, *Atlas of Diagnostic Cytopathology*. 2ª edición, W.B. Saunders Company, Ed., 2003. Los marcadores específicos de célula incluyen, pero no se limitan a, marcadores citoqueratina, CD45, M30, receptor de quimiocinas, CXCR1, CXCR4, CD44, CD24, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), o factor de estabilidad del ARNm HuR. Estos marcadores identifican diversos tipos de células, incluidas células de origen hematopoyético, citoqueratinas en células epiteliales, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, CD44, receptor de superficie celular que reconoce el ácido hialurónico, receptores de quimiocinas, tales como CXCR1 o CXCR4.

"Separación" en el contexto de las células tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la separación física de las células, como puede lograrse utilizando, por ejemplo, un separador de células activado por

fluorescencia, y al análisis de células en base a la expresión de marcadores de superficie celular, por ejemplo, análisis FACS en ausencia de separación.

5 Se puede "analizar la población de células por el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucléolos, la calidad del citoplasma o la cantidad de citoplasma" y "analizar la población de células midiendo las células intactas con una relación núcleo/citoplasma alta, las células intactas con una relación núcleo/citoplasma baja, las células apoptóticas tempranas o las células apoptóticas tardías, e identificar las células tumorales circulantes" utilizando la técnicas y los métodos de análisis que se describen en B.F. Atkinson, Atlas of Diagnostic Cytopathology. 2ª edición, W.B. Saunders Company, Ed., 2003, Y B.F. Atkinson y J.F. Silverman, Atlas of Difficult Diagnoses in Cytopathology, 1ª edición, W.B. Saunders Company, 1998.

10 "Gestión del tratamiento del cáncer o la recuperación del cáncer" se refiere a ensayos de diagnóstico *in vivo* o *in vitro* para determinar el estadio de la progresión del cáncer o la eficacia de un tratamiento terapéutico del cáncer concreto.

15 **TRATAMIENTO DEL CÁNCER** (Aunque esto no según la presente invención).

20 Un "tumor sólido" incluye, pero no se limita a, sarcoma, melanoma, carcinoma, u otro cáncer de tumor sólido.

25 "Sarcoma" se refiere a un tumor que está compuesto por una sustancia como el tejido conectivo embrionario y está compuesto generalmente por células muy concentradas embebidas en una sustancia fibrilar u homogénea. Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a, condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma de tejido adiposo, liposarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioide, cloroma, coriocarcinoma, sarcoma embrionario, tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma del estroma, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado idiopático múltiple, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectásico.

35 "Melanoma" se refiere a un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas incluyen, por ejemplo, melanoma acral-lentiginoso, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma léntigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de extensión superficial.

40 "Carcinoma" se refiere a un nuevo crecimiento maligno compuesto de células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes y dar lugar a metástasis. Los carcinomas ejemplares incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de la corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma basoscamocelular, carcinoma broncoalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriiforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, comedocarcinoma, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma cribiforme, carcinoma en coraza, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma ductal, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epiernoide, carcinoma epitelial adenoides, carcinoma exofítico, carcinoma ulcerado del estómago, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células de la granulosa, carcinoma de la matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hürthle, carcinoma hialino, hipernefronema, carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma mucinoso, carcinoma mucoide, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoso, carcinoma de mucosa, carcinoma mixomatoso, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células de en grano de avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasivo, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoide, carcinoma de Schneider, carcinoma escirro, carcinoma escrotal, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoidales, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma en collar, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectode, carcinoma de células de transición, carcinoma tuberoso, carcinoma verrucoso y carcinoma veloso.

65 "Leucemia" se refiere a enfermedades malignas progresivas de los órganos que forman la sangre y se caracteriza generalmente por una proliferación y un desarrollo distorsionados de los leucocitos y sus precursores en sangre y en médula ósea. La leucemia generalmente se clasifica clínicamente en base a (1) la duración y el carácter de la enfermedad - aguda o crónica; (2) el tipo de célula implicada; mielóide (mielógena), linfóide (linfógena) o

monocítica; y (3) el aumento o no aumento del número de células anormales en la sangre - leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, la leucemia no linfocítica aguda, la leucemia linfocítica crónica, la leucemia granulocítica aguda, la leucemia granulocítica crónica, la leucemia promielocítica aguda, la leucemia de células T del adulto, la leucemia aleucémica, una leucemia leucocitaria, leucemia basófila, leucemia blastocítica la leucemia bovina, leucemia mieloide crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinófila, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mieloide, leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia plasmocítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas.

Los cánceres adicionales incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, el mieloma múltiple, el neuroblastoma, el cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de pulmón, el rhabdomyosarcoma, la trombocitosis primaria, la macroglobulinemia primaria, los tumores de pulmón de células pequeñas, los tumores cerebrales primarios, el cáncer de estómago, el cáncer de colon, el insulinoma pancreático maligno, el carcinóide maligno, el cáncer de vejiga urinaria, las lesiones cutáneas precancerosas, el cáncer testicular, los linfomas, el cáncer de tiroides, el neuroblastoma, el cáncer de esófago, el cáncer del tracto genitourinario, la hipercalcemia maligna, el cáncer cervical, el cáncer de endometrio, el cáncer de la corteza suprarrenal y cáncer de próstata.

MARCADOR DETECTABLE

El grupo detectable o marcador concreto utilizado en el ensayo puede ser detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. El tipo concreto de marcador no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica de un anticuerpo al marcador celular en la célula o la célula tumoral circulante utilizada en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables se han desarrollado bien en el campo de los ensayos o inmunoensayos y, en general, puede aplicarse a la presente invención la mayoría de cualquiera de los marcadores útiles en tales métodos. Por lo tanto, una marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de Texas, rodamina, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , ^{121}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), otros agentes de formación de imágenes tales como microburbujas (para la formación de imágenes por ultrasonido), ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , (para la tomografía por emisión de positrones), $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In (para la tomografía por emisión de fotón único), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras comúnmente utilizadas en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como perlas de plástico o vidrio coloreado u oro coloidal (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, y similares). Las patentes que describen el uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE.UU N^{os} 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Véase también Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR).

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

Los marcadores no radioactivos se fijan con frecuencia por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. A continuación, el ligando se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que es intrínsecamente detectable o se une covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Pueden utilizarse varios ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, puede utilizarse junto con los anti-ligandos de origen natural marcados. Como alternativa, puede utilizarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo.

Las moléculas también pueden conjugarse directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterases y glicosidasas, u oxidorreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, y similares. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalacinadionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas de marcado o que producen señales que pueden utilizarse, véase la patente de EE.UU N^o 4.391.904.

Los medios de detección de marcadores son bien conocidos por los expertos en la materia. Así, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en la autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente,

puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, por medio de película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando a la enzima los sustratos apropiados y detectando el producto de reacción resultante. Por último, los marcadores colorimétricos simples pueden detectarse simplemente observando el color asociado con el marcador. Por lo tanto, en diversos ensayos con tiras reactivas, el oro conjugado aparece con frecuencia de color rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, pueden utilizarse ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, las partículas recubiertas con antígeno son aglutinadas por las muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, ninguno de los componentes necesita estar marcado y la presencia del anticuerpo diana se detecta mediante simple inspección visual.

Con frecuencia, el marcador celular y los anticuerpos para el marcador celular serán marcados uniendo, covalente o no covalentemente, una sustancia que proporcione una señal detectable.

Otras formas de realización y usos resultarán evidentes para un experto en la materia a la luz de las presentes descripciones.

FORMAS DE REALIZACIÓN EJEMPLARES

EJEMPLO 1

Sistema FAST, microscopía digital automatizada e identificación de células tumorales circulantes

Preparación de muestras: Fijación celular y marcado por inmunofluorescencia de muestras de pacientes.
Las muestras de sangre se procesan en sustratos de gran tamaño (10,8 x 7,6 cm con un área activa de 9,5 x 4,5 cm) utilizando una versión modificada de un protocolo descrito con anterioridad. Kraeft *et al.*, *Methods Mol Med.* 75:423-30, 2003. En resumen, se somete a lisis sangre anticoagulada con ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) con tampón de cloruro de amonio isotónico (NH₄Cl 155 mM, 10 mM, KHCO₃, EDTA 0,1 mM, pH 7,4) a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la centrifugación, el sedimento de células mononucleares restante se lava, se vuelve a suspender en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se fija el número total de células mononucleares de sangre periférica vivas a sustratos adhesivos personalizados (Paul Marienfeld GmbH & Co., KG, Bad Mergentheim, Alemania). Las células se incuban durante 40 minutos a 37°C en PBS y a continuación se añade medio de cultivo (medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) al 45%, RPMI al 45%) que contiene proteínas de suero (suero de ternera fetal al 10%) para promover la fijación, y la incubación continúa durante otros 20 minutos. Las células depositadas se fijan en paraformaldehído al 2% (pH 7,2-7,4) durante 20 minutos, se aclaran dos veces en PBS, y a continuación se fijan adicionalmente y se permeabilizan en metanol helado durante 5 minutos, se aclaran en PBS y se bloquean con suero AB humano al 20% (Nabi Diagnóstico, Boca Raton, FL) en PBS a 37°C durante 20 minutos. A continuación se incuban los sustratos a 37°C durante 1 hora con un anticuerpo monoclonal anti-pancitoqueratina (H-1388, Sigma, St. Louis, MO) que reconoce las citoqueratinas humana 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 y 19. Posteriormente, los sustratos se lavan en PBS, se incuban con una mezcla de Alexa Fluor 488 y anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 555 (A-21121 y A-21425, Molecular Probes, Eugene, OR) a 37°C durante 30 minutos. La contratinción nuclear se realiza con 0,5 µg/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (D-21490, Molecular Probes) en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los sustratos se montan en un medio de montaje acuoso (Tris 20 mM, pH 8,0, galato de n-propilo al 0,5% y glicerol al 90%) y se dejan en la oscuridad durante toda la noche para que el medio de montaje se seque antes de sellar los bordes con esmalte de uñas.

Sistema FAST. El escáner FAST explora muestras a una velocidad de 25M células min⁻¹ con una sensibilidad del 98% y una especificidad de 10⁻⁵. (Krivacic *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 101:10501-10504, 2.004). La velocidad de exploración (100 líneas seg⁻¹) es el resultado de un raster de láser rápido. Un láser de iones de argón de 10m W excita la fluorescencia de las células marcadas que se capta en un sistema óptico con un amplio campo de visión (50 mm). Este campo de visión está habilitado por un haz de fibras ópticas con extremos asimétricos como se muestra en la figura 1. El haz de fibras tiene una apertura numérica de 0,66. La resolución del sistema de exploración (12 µm) viene determinado por el tamaño del foco del láser de exploración. La emisión de las sondas fluorescentes se filtra utilizando filtros dicróicos convencionales antes de la detección en un fotomultiplicador. Se logra una velocidad de exploración del láser de 10m/seg con un espejo de exploración controlado por galvanómetro. La muestra se mueve ortogonalmente a través del trayecto de exploración del láser en una platina portaobjetos a una velocidad de 3 mm seg⁻¹. La ubicación de una célula marcada con fluorescencia se determina mediante las posiciones de la platina y la exploración en el momento de la emisión hasta una precisión de +/-70 µm El umbral de detección de emisión del sistema óptico FAST es comparable al de MDA que forma imágenes de los objetos identificados por FAST y que se describe más adelante. La determinación de la sensibilidad y especificidad de FAST utilizando una muestra modelo de línea celular así como los detalles del sistema óptico FAST se describen en otro lugar. Kraeft *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 10:3020-8, 2004.

Microscopio: El microscopio digital automatizado (MDA) es un microscopio de fluorescencia invertido TE2000U de Nikon (Melville, NY). Se utiliza un objetivo de microscopio Plan Fluor de 20X (distancia de trabajo extra larga, NA=0,45) para la obtención de imágenes inicial y se utiliza un objetivo Plan Fluor de 40X (distancia de trabajo extra larga, NA=0,6) para la obtención de imágenes para el análisis celular. Las distancias de trabajo para los objetivos de 20X y 40X son, respectivamente, 7,4 mm y 2,7 mm-3,7 mm (collar de corrección). Los diámetros del campo de visión a través de estos objetivos son 1,1 mm y 0,55 mm, aunque los tamaños de imagen reales están limitados por la formación de imágenes del CCD. El microscopio tiene ruedas de filtros de emisión y excitación automatizadas y (Lamda 10-2, Sutter Instrument, Novalto, CA) con conjunto de filtros de triple banda para DAPI, isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) (61000V2, Chroma Technology Corp, Rockingham, VT). Las imágenes digitales se obtienen a través de una cámara digital Retiga EXi Fast 1394 Mono Cooled (QImaging, Burnaby, BC, Canadá). La cámara tiene 1392x1040 de 6,45 μm píxeles cuadrados; por lo que a través de un objetivo de 20X el área real de la que se forman imágenes es de 448 μm x 335 μm . La cámara está instalada en un puerto lateral y recibe un 80% de la luz captada. Se utiliza una platina X-Y-Z (MS-2000, Applied Scientific Instrumentation, Eugene, OR) con algoritmo de enfoque automático de vídeo analógico para mover la muestra hasta una ubicación X,Y predeterminada, y para obtener el mejor plano focal utilizando una unidad Z unida al eje de focalización fina del microscopio Nikon. La retroalimentación del enfoque automático es habilitada por una cámara de vídeo monocromo (CCD100, DAGE-MTI Inc., Michigan City, IN) que detecta el 20% de la señal de DAPI a través de un cabezal trinocular y alimenta la intensidad de la señal al controlador MS-2000 para la comparación de contraste. El cambiador de filtros, los obturadores, y la cámara digital son controlados por un paquete de software comercial (SimplePCI + AIC, Compix Inc., Cranberry Township, PA) y el enfoque automático se activa cada vez que la platina se mueve a una nueva ubicación.

Identificación de CTC. Las CTC se identifican a partir de imágenes de fluorescencia de 3 colores de 40X, que presentan fluorescencia de los dos anticuerpos secundarios anti-citoqueratina (CK) y la tinción nuclear DAPI. La identificación de CTC es realizada de forma independiente por al menos un patólogo, que desconocía el estado del sujeto. Los criterios de identificación de CTC consisten en fluorescencia positiva para CK con un patrón de tinción típico de CK apropiado, en Alexa 555 y en Alexa 488 combinado con fluorescencia DAPI. Las características morfológicas típicas incluyen un núcleo y una célula redonda agrandados, una relación núcleo/citoplasma alta y una fluorescencia de citoqueratina estriada que recuerda al citoesqueleto subyacente. Sólo las células intactas y bien definidas se cuentan como CTC (figura 2) en este estudio. Los falsos positivos son principalmente un resultado de los agregados de anticuerpos.

La figura 2 muestra un ejemplo de CTC identificada por un patólogo encontrada en la sangre periférica de un paciente con cáncer de mama (20x). La CTC se tiñe con anti-CK-AlexaFluor 488 (verde) y anti-CK-AlexaFluor 555 (rojo). Los núcleos celulares se tiñen de azul con DAPI. A) Imagen compuesta, B) DAPI solamente, C) anti-CK-AlexaFluor 555, D) anti-CK-Alexa 488.

Tinción de Wright-Giemsa. Los cubreobjetos se retiran de los portaobjetos teñidos con fluorescencia y se aclaran en PBS. A continuación se inunda el portaobjetos con tinción de Wright-Giemsa (Fisher Scientific, Kalamazoo, MI) durante 3 minutos. Se añaden al portaobjetos cubierto de tinción 1,5 ml de tampón fosfato pH 6,8 (Fisher Scientific, Kalamazoo, MI) y se mezclan la tinción y el tampón agitando suavemente durante 1 minuto. A continuación se deja reposar la mezcla sobre el portaobjetos durante 2 minutos más antes de aclarar el portaobjetos con agua desionizada y se deja secar al aire.

EJEMPLO 2

Localización de las células tumorales epiteliales circulantes mediante la tecnología FAST

Se ha utilizado la tecnología FAST para localizar rápidamente CTC en muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama en estadio IV. Los objetos fluorescentes identificados en la exploración por FAST se relocalizan a su vez con una platina automatizada en un microscopio de fluorescencia y se forman imágenes de los mismos con una cámara digital. Las imágenes de alta resolución de los objetos son posteriormente analizadas en busca de CTC. La precisión de la localización con FAST es $\pm 70 \mu\text{m}$, que resulta más que adecuada para la relocalización automática en el campo de visión de la formación de imágenes (448 μm x 335 μm) con un microscopio de 20X. La relocalización con MDA de los objetos identificados por FAST está totalmente automatizada. Se utilizan marcas de alineación (20 μm de retículas fiduciales visibles para FAST y microscopía de campo claro) para transformar las posiciones de los objetos identificados por FAST al sistema de coordenadas del microscopio. Se utiliza un enfoque automático para centrarse en cada imagen de forma independiente utilizando la tinción con DAPI de glóbulos blancos.

El tiempo de relocalización y formación de imágenes de un objeto identificado por FAST en el MDA es de aproximadamente 8 segundos por objeto: esto incluye 2,5 segundos de exposición y cambio de filtro, 1,5 segundos para el desplazamiento de la platina y la adaptación, 3 segundos para el enfoque automático más 1 segundo para otras etapas intermedias y escritura de datos en el almacenamiento conectado a red. Con una especificidad de 10^{-5} ,

el análisis de una muestra de 60M células, que es típica de una muestra de 10 ml, requiere la obtención de imágenes de 600 objetos y tarda aproximadamente 80 minutos.

5 Se ha ensayado la posibilidad de repetición del sistema en una muestra modelo de sangre periférica con adiciones de células de la línea celular colorrectal HT-29. Se prepararon tres muestras que contenían cada una células HT-29 en el intervalo de 10 a 21 células. Cada muestra se exploró 10 veces con el citómetro FAST y a continuación se obtuvieron imágenes de alta resolución de todos los objetos. En cada caso, el FAST detectaron exactamente las mismas células en las mismas ubicaciones. A continuación se exploraron las muestras con el microscopio sin necesidad de utilizar las ubicaciones de FAST utilizando el software de identificación de imágenes de células. La exploración con microscopio detectó todas las células que fueron detectadas por el citómetro FAST y ninguna célula más.

15 Se ha utilizado el sistema para detectar las CTC en pacientes con cáncer de mama como se describe en la sección Métodos. Se incluyeron en el estudio 31 mujeres con cáncer de mama metastásico y proporcionaron 50 muestras de sangre periférica. Los pacientes con enfermedad progresiva tenían recuentos de CTC significativamente mayores ($p < 0,0001$) que los que se mantuvieron estables o respondieron al tratamiento. La mediana del recuento de CTC en pacientes con enfermedad progresiva fue de 8,5, mientras que la mediana del recuento de CTC en pacientes con enfermedad estable o sensible fue de 1 (figura 10). Con una mediana de seguimiento de 1 año, 11 pacientes habían muerto. Como lo demuestra el análisis de Kaplan-Meier, los pacientes con ≥ 5 CTC tuvieron una supervivencia media de 212 días (figura 11), mientras que la mediana de supervivencia para los pacientes con 0-4 CTC no se había alcanzado después de 1 año ($p = 0,0012$). También se examinaron muestras de sangre periférica de donantes sanos, y no se encontraron CTC en ninguna de las 15 muestras de donantes sanos.

25 Para investigar el efecto del nivel de expresión de CK en la sensibilidad de detección, se evaluó el brillo de las CTC y los falsos positivos detectados en una muestra de 10 ml de un paciente con cáncer con un gran número de CTC. La figura 3 muestra un gráfico de la intensidad total de los objetos identificados por FAST para un paciente con cáncer y para células HT-29 en un sustrato separado utilizado para supervisar la preparación de la muestra. Se eligieron datos con un número inusualmente elevado de CTC para ilustrar la distribución de la intensidad de CTC, que es típica de otras muestras. Mientras que el nivel de intensidad de CTC abarca 2 logs, todos ellos son al menos 10 veces más brillantes que el límite de detección de FAST, como se demuestra a partir de la detección de falsos positivos tenues. Esto proporciona la seguridad de que las CTC están siendo detectadas incluso con intervalos tan amplios de niveles de fluorescencia. También se muestra la intensidad de fluorescencia de células HT-29 tratadas junto con la muestra del paciente en un sustrato separado. La variación de la intensidad de las células HT-29 es sustancialmente inferior a la variación de las intensidades de CTC. Esta diferencia sugiere que hay una gran variación de la expresión de CK en las CTC.

40 Aunque las imágenes de fluorescencia de las CTC han ayudado en su identificación, se aplicó una tinción de Wright-Giemsa convencional para proporcionar información y validación adicional sobre las CTC. Para realizar esta tinción, se amplió el protocolo para eliminar el cubreobjetos en cada portaobjetos teñido con fluorescencia y volver a teñir las mismas células utilizando tinción de Wright-Giemsa. B. F. Atkinson, Atlas of Diagnostic Cytopathology. 2ª edición, W.B. Saunders Company, Ed., 2003. Esta tinción permite mejorar el análisis de la morfología, el tamaño y la heterogeneidad. Puesto que la ubicación de las CTC se conoce con precisión, las células raras individuales y pueden localizarse los grupos de células raras y volver a formar imágenes de los mismos con MDA para su evaluación morfológica, como se ilustra en la figura 4.

50 La figura 4 muestra la tinción de Wright-Giemsa (izquierda) de una CTC típica encontrada en pacientes con cáncer de mama (aceite 100x); imagen de fluorescencia (derecha) de la CTC correspondiente teñida con anti-CK-AlexaFluor 488 y anti-CK-AlexaFluor 555 (rojo). Los núcleos celulares se tiñen de azul con DAPI (imagen tomada a 20x y ampliada a efectos comparativos).

EJEMPLO 3

Optimización de la detección de tumores epiteliales circulantes y análisis de imágenes por FAST

55 La formación de imágenes de microscopía digital automatizada tarda aproximadamente 8 segundos por objeto fluorescente localizado por FAST, que da como resultado un tiempo de obtención de imagen por paciente de 80 minutos con la especificidad actual. Aunque este tiempo de obtención es adecuado para la investigación, una obtención más rápida sería valiosa para aplicaciones de laboratorio clínico. Para aumentar la velocidad de detección de CTC, se exploran dos enfoques para reducir el tiempo de obtención de datos: mejorar la especificidad y reducir el tiempo de exploración del microscopio.

65 Se espera un aumento importante de la especificidad como resultado de la mejora del análisis de imágenes por FAST. Puede utilizarse la proporción de marcador, la intensidad de fluorescencia y el tamaño del objeto para diferenciar las CTC de los falsos positivos. Para optimizar los filtros de análisis de imágenes, se construirá una base de datos de las características de exploración por FAST para los verdaderos y falsos positivos. Con esta base de

datos pueden optimizarse los filtros de software de FAST sin reducir la sensibilidad. Se introducirán mejoras en el proceso de preparación de la muestra para reducir los falsos positivos. Tales cambios en el proceso incluyen la observación estricta de la preparación de los reactivos y el protocolo de conservación, la optimización de la concentración de colorante para reducir al mínimo los agregados de colorantes y alternativas de bloqueo para minimizar la unión no específica. Además, se espera que la automatización de la preparación de la muestra de como resultado una reducción uniforme de artefactos fluorescentes. Se espera una mejora de la especificidad superior a 2 veces a través de la mejora del filtrado y la preparación de muestras.

Para reducir el tiempo de obtención de imágenes de MDA, se realizarán varias mejoras para reducir los tiempos de exposición, desplazamiento de la platina y enfoque automático. La principal contribución a la reducción del tiempo de exposición proviene de aumentar la sensibilidad de la MDA. Para ello, se aumentará la apertura numérica del objetivo del microscopio (por ejemplo, para 20X, de 0,45 a 0,75) reduciendo la distancia de trabajo. Se diseñará un conjunto de filtros personalizado para maximizar la intensidad de excitación y la transmisión de la fluorescencia débil, y la fuente de luz de mercurio será reemplazada por una más brillante, tal como una lámpara de xenón. Con la precisión de la relocalización, los píxeles de CCD pueden agruparse para reducir los tiempos de exposición. Por ejemplo, una agrupación de 2x2 reduce el tamaño de la imagen de 224x117 μm , que es lo suficientemente grande como para capturar todos los objetos identificados por FAST. Se espera que estas mejoras reduzcan el tiempo de exposición 4 veces, de 2s a 0,5s.

Para mejorar el enfoque automatizado, el único movimiento en dirección z será reemplazado con una combinación de movimiento a escala fina aplicado con un accionador piezoeléctrico en la platina y un movimiento mecánico a escala del recorrido. Esta mejora reducirá significativamente el tiempo de enfoque (de ~ 1 s a 15 ms) eliminando el giro mecánico del servomotor y reduciendo la latencia del movimiento en la platina para iniciar el enfoque automático. Con todas estas mejoras, se espera que el tiempo de obtención de imágenes se reduzca más del 50% a menos de 4 segundos, lo que junto con las mejoras de la especificidad reducirán el tiempo medio de obtención de imágenes de MDA por debajo de 20 minutos para una muestra de 10 ml.

El instrumento FAST ofrece una precisión de detección comparable a la del microscopio digital automatizado. La especificidad y sensibilidad de detección global se han demostrado con anterioridad. Krivacic *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 101:10501-10504, 2004. En el presente documento se ha demostrado que el instrumento tiene un umbral de detección y una posibilidad de repetición de la medición excelente que resulta más que adecuado para detectar las grandes variaciones observadas en la intensidad de CTC. Esta intensidad es una variación atribuida a las variaciones de los niveles de expresión de CK en las CTC. Tales variaciones son coherentes con los bajos niveles de expresión descritos en los carcinomas. Willipinski-Stapelfeldt *et al.*, Clin. Cancer Res. 11:8006-8014, 2005.

Para la identificación de CTC, se utilizan varios criterios en base a la morfología celular, incluidos detalles del tamaño celular, la relación núcleo/citoplasma, el patrón y la intensidad de fluorescencia para identificar poblaciones de células que estaban presentes exclusivamente en los pacientes con cáncer de mama. Utilizando estos criterios, no se encontraron células en 15 testigos sanos. Los pacientes con enfermedad progresiva tenían tendencia a más CTC por muestra que los pacientes con enfermedad estable o sensible.

Sin embargo, el tamaño limitado de la muestra, un seguimiento limitado y el desarrollo del método en curso en esta serie, impide en este momento cualquier afirmación sobre la importancia pronóstica de las CTC detectadas por FAST. Además, puesto que los tamaños de muestra son pequeños y no se planifican prospectivamente, las pruebas estadísticas que muestran diferencias significativas entre los grupos no añaden información significativa al conjunto de datos y se excluyeron deliberadamente.

La gran variación en los niveles de CTC (0-659 CTC) que se detectaron en las 31 mujeres con cáncer de mama metastásico descritas en el presente documento es similar a la del intervalo descrito por Cristofanilli (0-1.000s) para un estudio mucho mayor de 177 pacientes. Este amplio intervalo dinámico de recuentos de CTC en la presente serie y los de las demás es del mismo orden de magnitud de ~ 3 log observado con muchos marcadores tumorales proteicos utilizados en plasma, y refleja la heterogeneidad biológica del cáncer de mama metastásico. Sin embargo, se descubrió que las CTC están casi universalmente presentes en los pacientes con cáncer de mama metastásico, después de haberlas detectado en el 86% de los pacientes metastásicos analizados. A efectos comparativos, Cristofanilli y colaboradores describieron > 2 CTC en el 61% de los pacientes con cáncer de mama metastásico progresivo, mientras que Allard descubrió > 2 CTC en el 37% de un grupo de 422 pacientes con cáncer de mama metastásico progresivo y estable. Allard *et al.*, Clin. Cancer Res. 10:6897-904, 2004; Cristofanilli *et al.*, N. Engl. J. Med. 351:781-91, 2004. Se descubrió una tendencia de los pacientes con enfermedad progresiva a presentar un mayor número de CTC en comparación con los pacientes estables. Esta observación puede ser clínicamente pertinente porque un recuento alto de CTC puede identificar a los pacientes que están siguiendo un tratamiento ineficaz y sugerir al médico que modifique el tratamiento. La práctica clínica actual se basa en el uso de estudios de imágenes que no están disponibles como ensayos de diagnóstico en el punto de atención médica para identificar cuándo los pacientes presentan enfermedad progresiva. Para determinar si una exploración por FAST puede servir como método menos costoso y más conveniente para la toma de decisiones sobre el tratamiento, se requieren evaluaciones prospectivas de FAST como sustituto para la evaluación por imágenes para guiar la elección

de la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico. Se desconoce el papel de FAST en el cribado primario para cáncer de mama en mujeres no afectadas o el cribado secundario de mujeres con cáncer en estadio temprano o enfermedad no metastásica para evidencia de recidiva. Se requieren datos adicionales acerca de la incidencia de las CTC en pacientes con cáncer de mama en estadio I y II en el momento del diagnóstico y después del tratamiento primario para determinar el valor de la detección de CTC como metodología de cribado.

Debido a que la exploración por FAST identifica las células utilizando citoqueratinas internas que se conservan incluso en los tumores epiteliales más indiferenciados, puede tener ventajas sobre las técnicas que, con el fin de lograr el enriquecimiento, dependen de la detección de proteínas de superficie expresadas de diversas formas que no se expresan de manera uniforme en todos los pacientes con cáncer de mama. Por ejemplo, los subconjuntos de pacientes con cáncer de mama pueden no expresar Ep-CAM y por lo tanto no ser detectados utilizando ese método para el enriquecimiento. Uno de tales subgrupos puede ser pacientes con carcinoma lobular. Este subconjunto comprende un 15% de los pacientes con cáncer de mama, y presenta poca o ninguna expresión de Ep-CAM en muestras de tumores primarios tal como se mide mediante inmunohistoquímica. Went *et al.*, Human Pathology 35:122-128, 2004. Además, la Ep-CAM es conocida por estar regulada negativamente en las CTC en comparación con el tumor primario. Rao *et al.*, Int. J. Oncol. 27:49-57, 2005. Los resultados favorables con FAST hasta ahora justifican la obtención adicional de muestras del paciente en el contexto de un ensayo clínico prospectivo que compare los resultados de los pacientes en grupos con distinto número de CTC, y comparaciones directas de FAST y otras tecnologías en las poblaciones de pacientes.

Por último, el diagnóstico clínico de carcinoma en los pacientes se ve sustancialmente beneficiado por la capacidad para llevar a cabo la evaluación patológica de las células malignas utilizando tinciones histológicas convencionales. Se utilizó la tinción de Wright-Giemsa en las presentes formas de realización ejemplares, ya que es la tinción más comúnmente utilizada en muestras clínicas de sangre periférica. La capacidad de revisar y volver a teñir las células con FAST hace de la tecnología un mecanismo factible para el diagnóstico morfológico del carcinoma a partir de muestras de sangre periférica. Esta capacidad es esencial si el análisis de las CTC se va a aplicar a poblaciones de pacientes que de otro modo no se sabe que tienen enfermedad metastásica detectable, ya que pocos médicos confiarían sólo en las imágenes inmunofluorescentes para realizar un diagnóstico de cáncer. Una evaluación citomorfológica cuidadosa de las células intactas por un patólogo con la incorporación de técnicas de evaluación complementarias sigue siendo el método de referencia para el diagnóstico del cáncer a partir de un número limitado de células malignas. Dado que las células de cáncer de mama en sangre no han sido ampliamente estudiadas morfológicamente por su rareza y pueden tener diferentes características morfológicas que en otras partes del cuerpo, será necesario obtener un "atlas" o galería de imágenes de CTC de una amplio intervalo de pacientes con cáncer de mama como parte de la evolución del diagnóstico. FAST es una herramienta ideal para crear un "atlas" de tales imágenes.

Se ha demostrado que la exploración por FAST puede localizar con rapidez y precisión las CTC en sangre periférica a concentraciones muy bajas. El instrumento tiene una excelente posibilidad de repetición y tiene un umbral de detección más que adecuado para la detección de células con grandes variaciones de los niveles de expresión del antígeno diana, CK. Este sistema de exploración se integró con MDA y utilizó este sistema para identificar las CTC en la mayoría de los pacientes con cáncer de mama en estadio IV, mientras que no se detectó ninguna CTC en 15 donantes sanos, lo cual se compara favorablemente con otros estudios presentados. Además, se pueden relocalizar y examinar las células de interés para la caracterización y la confirmación patológica mediante la tinción de Wright-Giemsa. Este análisis de las CTC se ampliará utilizando biomarcadores celulares de cáncer y tinciones adicionales para caracterizar mejor las CTC y establecer una mayor importancia clínica.

Este sistema promete posibilitar nuevas investigaciones sobre la caracterización molecular y clasificación morfológica de las CTC, así como aplicaciones para el cribado, el seguimiento y la gestión de pacientes con cáncer en el punto de atención médica.

EJEMPLO 4

Recuentos de CTC en un subconjunto de pacientes con cáncer de mama metastásico en estadio IV

Se examinaron CTC positivas para CK en más de 30 pacientes con cáncer de mama metastásico conocido. Se identificaron las células utilizando exploración por FAST con microscopía de fluorescencia posterior como se ha descrito anteriormente. Una revisión con enmascaramiento realizada por un patólogo confirmó la identidad de las CTC en estos pacientes a partir de imágenes de fluorescencia de 40X de 3 colores. Los criterios para la identificación de CTC a partir de las imágenes de fluorescencia consisten en fluorescencia positiva para CK en Alexa 555 y Alexa 488, con un patrón de tinción típico de CK apropiado, por encima de la tinción nuclear DAPI. En el estudio de validación inicial ambulatorio se examinaron pacientes con cáncer de mama metastásico en estadio III y en estadio IV con diversos grados de enfermedad. En todos los pacientes con cáncer metastásico, salvo uno, se identificaron CTC de que van de 1 a más de 1.000 CTC. Además, se examinaron 10 donantes sanos en los que se identificaron CTC.

Se seleccionaron seis pacientes representativos con cáncer de mama metastásico con diferentes tipos de características del tumor primario para investigar las poblaciones de CTC inter- e intra-paciente. Se identificó un

5 amplio intervalo de CTC, que va desde 6 hasta 659 CTC por paciente, utilizando los criterios establecidos anteriormente los pacientes A a F. Los datos clínicos de estos pacientes se resumen en la Tabla 1. Con posterioridad a la obtención de las imágenes de fluorescencia, se relocalizaron un subconjunto de células raras individuales positivas para CK identificadas y grupos de células raras de esta población y se evaluaron adicionalmente después de la tinción con Wright-Giemsa (figura 5).

10 La figura 5 muestra i) Ejemplo de CTC identificada por un patólogo encontrada en la sangre periférica de un paciente con cáncer de mama (60x). La CTC se tiñe con anti-CK-AlexaFluor 488 (verde) y anti-CK-AlexaFluor 555 (rojo). Los núcleos celulares se tiñen de azul con DAPI. A) Imagen compuesta, B) DAPI solamente, C) anti-CK-AlexaFluor 555, D) anti-CK-Alexa 488. ii) Tinción de Wright-Giemsa correspondiente de la misma CTC (100x).

Tabla 1. Información clínica del subgrupo de pacientes con cáncer de mama metastásico.

Paciente	Edad	Tamaño del tumor primario	Grado del tumor primario	Estadio en el momento del diagnóstico	Tipo de tumor	Número de CTC
A	58	1,2 cm	BSR 7/9	T4N1	ductal infiltrante	26
B	66	0,8 cm	No disponible	T1N0	ductal infiltrante	26
C	37	1,7 cm	BSR 7/9	T1N1	ductal infiltrante	659
D	45	1,0 cm	BSR 6/9	T1N0	ductal infiltrante	19
E	40	4,5 cm	BSR 9/9	T2N0	ductal infiltrante	46
F	49	>2, <5 cm	BSR 7/9	T2N1	Inf. mixta ductal/lobular	6

15 EJEMPLO 5

Características morfológicas de las CTC: cuatro subtipos reconocibles

20 Debido a los detalles morfológicos proporcionados por las células teñidas con Wright-Giemsa, los criterios morfológicos se ha ampliado de lo que se había escrito anteriormente. Complementando el análisis por fluorescencia descrito por Fehm *et al.*, la tinción de Wright-Giemsa seguida del análisis por microscopía óptica genera información detallada sobre el núcleo y el citoplasma, destacando las características requeridas para el diagnóstico citopatológico y morfológico del carcinoma. Fehm *et al.*, *Cytotherapy* 7:171-185, 2005. Además, esto permite la identificación de las CTC con relaciones núcleo/citoplasma variables, similares a las observadas en el tejido de tumor primario y metastásico, lo que sugiere que se consideran parte de la población de CTC. El análisis de microscopía fluorescente y óptica de las CTC demostró un alto grado de pleomorfismo en las preparaciones de sangre entera, tanto entre pacientes como dentro de los pacientes de este subconjunto de pacientes. El análisis de las CTC teñidas con Wright-Giemsa se utilizó para clasificar las CTC en varios subtipos morfológicos, como se detalla más adelante.

30 Las CTC de los pacientes se clasificaron en los siguientes cuatro tipos morfológicos: 1) células intactas con relaciones N/C (núcleo/citoplasma) altas, 2) células intactas con relaciones N/C de bajas a moderadas, 3) células que mostraban características morfológicas de apoptosis temprana, y 4) células que mostraban características morfológicas de apoptosis tardía. Las CTC de ejemplo de estas categorías se presentan en la figura 6 y las proporciones de CTC encontradas en los pacientes A a F utilizando esta clasificación se muestran en la Tabla 2. Las categorías de clasificación se analizan con más detalle.

40 La figura 6 muestra un ejemplo de las CTC identificadas a partir del paciente C. Las imágenes pareadas de las células que muestran resultado de tinción de Wright-Giemsa e imagen de CK+ fluorescente. Izquierda: tinción de Wright-Giemsa de CTC (aceite 100x). Derecha: imagen de fluorescencia de las CTC correspondientes teñidas con anti-CK-AlexaFluor 488 (verde). Los núcleos celulares se tiñen de azul con DAPI (imagen tomada a 20x y ampliada a efectos comparativos). 1a-c) células de tipo 1 con N/C alta, 2a-c) células de tipo 2 con N/C baja, 3a-c) células de tipo 3 apoptóticas tempranas, 4a-c) células de tipo 4 apoptóticas tardías, 5a-c) CTC agrupadas.

Tabla 2. Porcentaje de CTC identificadas en categorías.

[] = Número absoluto de células identificadas en la categoría específica. No se encontraron grupos de CTC en el paciente A, E, o F. El paciente B tenía dos dobletes, el paciente C tenía siete dobletes, un triplete y un grupo cuadruplete, el paciente D tenía dos dobletes y un grupo de 9 CTC.

Paciente	A	B	C	D	E	F
Tipo 1 (N/C alta)	34,6% [9]	30,8% [8]	22,9% [151]	36,8% [7]	30,4% [14]	16,7% [1]
Tipo 2 (N/C baja)	3,8% [1]	3,8% [1]	10,5% [69]	42,1% [8]	19,6% [9]	0,0%
Tipo 3 (apoptósica temprana)	57,7% [15]	57,7% [151]	31,9% [210]	15,8% [3]	26,1% [12]	66,7% [4]
Tipo 4 (apoptósica tardía)	3,8% [1]	7,7% [2]	34,7% [229]	5,3% [1]	23,9% [11]	16,7% [1]
Células totales	26	26	659	19	46	6

Las células de tipo 1, o "células con relación N/C alta", son ligeramente más grandes que los glóbulos blancos circundantes, con relaciones núcleo/citoplasma muy altas y sólo un escaso borde de citoplasma anfófilo frente a eosinófilo. Los núcleos son redondos u ovalados y en ocasiones ligeramente lobulados, sin irregularidades marcadas. La cromatina es con frecuencia vesicular, con nucléolos prominentes y generalmente eosinófilos. Estas células se ajustan citomorfológicamente a los criterios aceptados tanto para las CTC positivas verdaderas como analizó Fehm, como para los criterios citopatológicos convencionales para las células de carcinoma escasamente diferenciadas. Fehm *et al.*, *Cytotherapy* 7:171-185, 2005, Atkinson, *Atlas of Diagnostic Cytopathology*. Editado por W.B. Saunders Company, 2003.

Las células de tipo 2, o "células con relación N/C baja", son el diagnóstico para las células de carcinoma metastásico tras una cuidadosa revisión de las imágenes morfológicas detalladas, sin embargo, no cumplen todos los criterios establecidos actualmente para las CTC. Debido al pequeño tamaño o baja relación N/C, serían de recuentos de otros investigadores, sin embargo, debido a la correlación con la tinción de Wright-Giemsa, pueden clasificarse como CTC. Las células muestran detalle nuclear intacto, sin pruebas morfológicas de cambios apoptóticos, pero a diferencia de las células de tipo 1, estas células tienen una relación núcleo/citoplasma más baja. Además, pueden ser ligeramente más pequeñas que las células de tipo 1, con un diámetro aproximadamente igual a, o incluso en ocasiones menor que, los glóbulos blancos cercanos, y tienen nucléolos menos prominentes. El núcleo se sitúa en ocasiones excéntricamente, y las células tienen un borde moderado de citoplasma denso que aparece naranjofilo en la tinción de Wright-Giemsa. Esta categoría de célula corresponde a células de carcinoma de moderadamente a bien diferenciadas. Atkinson, *Atlas of Diagnostic Cytopathology*. Editado por W.B. Saunders Company, 2003.

Las dos categorías de células restantes son las que muestran pruebas morfológicas de apoptosis y se clasifican según el grado de cambio morfológico identificado, en "apoptosis temprana" y "apoptosis tardía". Atkinson, *Atlas of Diagnostic Cytopathology*. Editado por W.B. Saunders Company, 2003. Aunque podrían darse argumentos para unir estas dos categorías e incluir todas las células que muestren cualquier prueba morfológica de apoptosis en una categoría grande, se separan en el presente documento con fines de estudio. Las dos categorías de células morfológicamente apoptóticas comprende la mayoría de las CTC detectadas en este grupo de pacientes en estadio IV.

El tipo 3, denominado en el presente documento "apoptosis temprana", son células que muestran los cambios morfológicos iniciales asociados con la apoptosis temprana. Las células muestran condensación y reducción del volumen de los materiales nucleares, produciendo núcleos de aspecto "vidrioso" hipercromáticos con pérdida de detalle nuclear en la tinción de Wright-Giemsa, pero sin pérdida global de contorno y sin fragmentación nuclear. El "festoneado" ocasional del contorno nuclear redondeado se clasifica como apoptosis "temprana", a diferencia de la nítida fragmentación del núcleo, que se describe más adelante en la categoría "tardía". Las alteraciones del citoplasma sin pruebas de cambio nuclear también se clasifican como "temprana", por ejemplo, la formación de inclusiones citoplasmáticas o "formación de vesículas en su superficie" en una célula con detalle nuclear de lo contrario intacto. La categoría "temprana" de las células contiene muchas de las CTC que parecen sorprendentemente pequeñas en tamaño para una célula de carcinoma, y probablemente explica parte de la heterogeneidad de tamaño señalado en el presente documento y en otras descripciones publicadas de poblaciones circulantes, ya que muchas de las células son observadas en el proceso de muerte. Mehes *et al.*, *Haematologia* (Budap) 31:97-109, 2001.

Las células de tipo 4, denominadas en el presente documento "apoptosis tardía" muestran características morfológicas de apoptosis bien desarrolladas, tal como la fragmentación nuclear. Se incluyen en esta categoría las células con el contorno citoplasmático global de una células de carcinoma típica, pero con pérdida de material nuclear hasta el punto de que el único fragmento nuclear restante puede ser una pequeña mancha azul en la tinción

de Wright-Giemsa. Schmidt *et al.*, Int. J. Biol Markers 19:93-99, 2004. Inicialmente, algunas de estas células fueron consideradas posibles falsos positivos en el presente sistema de detección con fluorescencia, pero una cuidadosa revisión de su citomorfología con tinción de Wright-Giemsa y la comparación con otras CTC que muestran los cambios dentro del espectro de temprana a tardía a completamente degenerada, lo que sugiere que estas CTC presentan cambios apoptóticos tardíos. De hecho, estructuras similares a células ocasionales que consisten en grupos de inclusiones positivas a citoqueratina con características de Wright-Giemsa del citoplasma cargado de citoqueratina (citoplasma naranjofilo denso) probablemente representan la etapa final real de la apoptosis, pero debido a la ausencia completa de cualquier material nuclear dentro de estas estructuras, no se consideran en el presente sistema como CTC (figura 7). La figura 7 muestra una probable CTC experimentando la etapa final de apoptosis. Las células de este tipo no se utilizan en el recuento de CTC, ya que los materiales nucleares se encuentran ausentes.

Por último, se observan con cierta frecuencia otras dos variantes morfológicas, que, aunque no se cree que merezcan una categoría morfológica independiente, sin embargo, pueden proporcionar información pertinente para el comportamiento biológico de las CTC. El primero de estos son grupos, incluidos los dobletes, tripletes y grupos ocasionales de cinco a nueve células (figura 6. Véase 5a-5c). Los grupos de CTC constituyen una o más de las 4 primeras categorías mencionadas anteriormente y cada célula se cuenta como una CTC independiente. El segundo consiste en células apoptóticas (tipo 3 ó 4) pequeñas que están en proceso de ser fagocitadas activamente por los glóbulos blancos con las características nucleares de los monocitos. No está claro si este fenómeno representa un mecanismo frecuente y dirigido de eliminación de CTC por el componente circulante del sistema reticuloendotelial o es un evento no específico aleatorio.

EJEMPLO 6

25 Estudio de caso del paciente C: Comparación de las células tumorales en diversos lugares del cuerpo

Con el fin de entender la relación morfológica entre los sitios del tumor primario y metastásico, y las CTC, se estudió retrospectivamente al paciente C con mayor detalle, incluido un examen histopatológico de la biopsia diagnóstica con aguja de la mama, la lumpectomía y disección axilar, una posterior biopsia positiva de médula ósea (figura 8). Su tumor primario fue un carcinoma ductal infiltrante de 1,7 cm, BSR 7/9 (formación de túbulos 3, grado nuclear 3, actividad mitótica 1) con cuatro de veinte ganglios linfáticos axilares positivos en el momento de la resección inicial. El tumor es ER/PR positivo/positivo y HER-2/neu negativo.

Las figuras 8A-8D muestran las características histológicas y citológicas del tumor primario y metastásico del paciente C. La figura 8A muestra un tumor primario del paciente C, que muestra un carcinoma ductal infiltrante. Los focos malignos muestran células pleomórficas, algunas con relaciones N/C altas (flecha a) y otras con relaciones N/C bajas (flecha b). La foto II muestra una sección teñida con hematoxilina y eosina de una metástasis de los ganglios linfáticos del paciente C, que muestra variabilidad de la relación N/C dentro de la metástasis. a) Células tumorales metastásicas con una relación N/C alta. b) Células tumorales metastásicas con una relación N/C baja. La figura 8C muestra una sección de la biopsia con aguja gruesa (biopsia core) teñida con PAS del paciente C, que muestra pleomorfismo dentro de la metástasis de médula ósea. a) Célula con relación N/C alta. b) Célula con relación N/C baja. La figura 8D muestra una monocapa aspirada de médula ósea teñida con Wright-Giemsa del paciente C. a) Células con relación N/C alta. b) Células con relación N/C baja.

La comparación citomorfológica entre las células tumorales en el sitio primario y en los diversos sitios de metástasis demuestra la concordancia citológica; por lo que, en este caso, como en muchos casos de cáncer de mama metastásico, no hay pruebas de desdiferenciación significativa en los sitios de metástasis. Además, la comparación de las CTC intactas (Tabla 2, Tipos 1 y 2) con las células del tumor primario y metastásico muestra una mezcla de células con relación N/C alta y células con relación N/C baja en todos los sitios. Esta correlación demuestra la conservación del pleomorfismo intrínseco del tumor de este paciente en diversos sitios diferentes, sin subcategoría morfológica particular de células, es decir, células grandes con relación N/C alta, que predominan en un sitio frente a otro. Por lo tanto, no se identifican indicios que sugieran la migración dirigida de un subclón de células morfológicamente distinto a la sangre periférica en comparación con otros sitios.

La figura 9 muestra una CTC encontrada en un paciente con cáncer de mama que se describió morfológicamente como experimentando apoptosis. La imagen emparejado es positiva para citoqueratina (CK⁺ fluorescente) y caspasa-3⁺ fluorescente. El análisis fenotípico confirma que la célula es apoptótica.

EJEMPLO 7

60 Las imágenes de células tumorales epiteliales circulantes de pacientes describen la morfología de una población de células distinta

Debido a su rareza, las CTC de cáncer de mama están sólo empezando a ser ampliamente estudiadas morfológicamente. El protocolo y la tecnología de la presente invención permiten crear una galería de imágenes de

CTC teñidas con una tinción para patología convencional de una variedad de pacientes para comenzar a describir la morfología de las CTC como una población distinta de células en un compartimiento tisular ahora accesible.

5 Tal como se utiliza en la práctica de la patología convencional, tinciones tales como la de Wright-Giemsa proporcionan información sobre el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucléolos, la calidad del citoplasma y la cantidad de citoplasma, y permiten distinguir entre una célula tumoral maligna y las células de fondo benignas en las muestras de tejido. Se aplicó el uso de tinción de Wright-Giemsa para permitir una comparación morfológica de las CTC con las células tumorales recuperadas de otros sitios del tumor.

10 La clasificación actual de las CTC mediante fluorescencia y tinción de Wright-Giemsa está en general de acuerdo con otros informes sobre la apariencia morfológica de las CTC, pero amplía las anteriores categorías de clasificación de CTC, proponiendo la presencia de una subpoblación de células con menor relación N/C entre la población circulante. Fehm *et al.*, *Cytotherapy* 7:171-185, 2005. Además, se confirmó morfológicamente la presencia de células apoptósicas, como han descrito los investigadores anteriormente indicados, y esta población se subclasificó adicionalmente en células que mostraban cambios tempranos y tardíos. Larson *et al.*, *Cytometry A* 62:46-53, 2004; Mehes *et al.*, *Am J Pathol* 159:17-20, 2001.

20 Los grupos de CTC también son comunes en algunos pacientes, y han sido descritos también en los documentos anteriormente indicados como patognomónicos para las CTC. Fehm *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 8:2073-2084, 2002. En la práctica convencional de la patología, en la evaluación de otros tejidos semisólidos o líquidos, tales como líquido pleural o ascítico y el material aspirado de médula ósea, la presencia de grupos ha sido aceptada como prueba sólida de la diferenciación del epitelio, y por lo tanto de malignidad en los sitios en los que las células epiteliales no se encuentran normalmente.

25 Los cánceres de mama son conocidos por presentar un fenotipo heterogéneo, tanto en los tumores originales como en los focos metastásicos. Klein *et al.*, *Lancet* 360:683-689, 2002; Kuukasjarvi *et al.*, *Cancer Res.* 57:1597-1604, 1997. Una cuestión es si las células en tránsito entre estos dos lugares presentan una heterogeneidad similar, o si sólo entran al torrente sanguíneo un subconjunto morfológico tal como las células con relación N/C alta muy indiferenciadas. Aunque la cuestión de qué fracción de CTC tiene en realidad el potencial biológico para formar tumores metastásicos sigue sin respuesta, los presentes estudios morfológicos de CTC sugieren que la población que necesita ser considerada como posible sospechosa incluye todo el espectro de células dentro de un tumor, ya que todas se encuentran circulando en la sangre. Esta observación está de acuerdo con las observaciones de Klein y colaboradores, que demostraron pruebas citogenéticas de que la selección de células que se expanden clonalmente que conduce a la metástasis se produce después de haber tenido lugar la diseminación. Klein *et al.*, *Lancet* 360:683-689, 2002. Mientras que algunas CTC encontradas en pacientes con cáncer de mama son grandes, redondas, tienen una relación núcleo/citoplasma alta y tienen una expresión de CK de moderada a alta, muchas de ellas no presentan una o más de estas características. La heterogeneidad de las células entre los pacientes A-F y dentro del paciente C en solitario ilustra el pleomorfismo de las CTC tanto entre como dentro de las muestras de pacientes.

40 El paciente C, que fue seleccionado para una amplia correlación morfológica, tiene un alto número de CTC. La composición citológica de las células en el tumor primario, las metástasis axilares, las metástasis de médula ósea y la sangre periférica del paciente es similar, con la excepción de que las formas más apoptósicas se observan en la sangre periférica. Por lo tanto, en este paciente no hay pruebas morfológicas de que el componente circulante represente un subclón particularmente poco diferenciado, sino más bien parece representativo de la población de células tumorales fenotípicamente heterogénea en el tumor primario.

50 El protocolo de fijación de las células en tándem con una exploración por FAST permite que un médico o patólogo combine un método de detección específico y sensible con un análisis secuencial de las CTC, y lo que es más importante, prevé la relocalización de las células de interés en su posición fija para su estudio adicional, incluido el diagnóstico citomorfológico. La inclusión de la tinción de Wright-Giemsa en el ensayo ha permitido incluir métodos convencionales de citopatología en la clasificación de los tipos de CTC que se encuentran en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama metastásico. La heterogeneidad de CTC inter- e intra-paciente ha sido demostrada. Este estudio se ampliará con biomarcadores celulares existentes y de reciente evolución que pueden predecir el patrón de diseminación metastásica en los individuos, y también puede ser útil para identificar el tejido de origen de las células epiteliales circulantes detectadas, especialmente en individuos en los que no se ha diagnosticado cáncer. La capacidad de indagar sobre las CTC con marcadores proteicos adicionales puede permitir el cribado y el diagnóstico de tumores epiteliales malignos a partir de muestras de sangre periférica.

60 Cuando en el presente documento se utilizan intervalos para propiedades físicas tales como el peso molecular, o propiedades químicas tales como las fórmulas químicas, se pretende incluir todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y formas de realización específicas en el mismo.

65 Los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse numerosos cambios y modificaciones a las formas de realización de la invención y que tales cambios y modificaciones pueden realizarse sin alejarse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de detección de células tumorales epiteliales circulantes en un sujeto mamífero con posible diagnóstico de cáncer, que comprende:
- (i) montar una muestra de ensayo en un sustrato, proviniendo la muestra de ensayo de sangre del sujeto, comprendiendo la muestra de ensayo una población de células que no ha sido enriquecida en células tumorales circulantes;
 - 10 (ii) detectar la presencia o ausencia de un primer marcador en la muestra de ensayo, en la que el primer marcador es específico para las células tumorales epiteliales circulantes y es un marcador citoqueratina;
 - (iii) detectar la presencia o ausencia de un segundo marcador en las células de la población de células o de un subconjunto de la población de células, en el que el segundo marcador es la morfología celular, el tamaño celular o la relación núcleo/citoplasma, y se detecta con una tinción citológica; y
 - 15 (iv) analizar la población de células detectada por los marcadores primero y segundo para identificar las células tumorales epiteliales circulantes.
2. Método según la reivindicación 1 en el que el sustrato es un sustrato plano.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 en el que el montaje de la muestra de ensayo en el sustrato forma una monocapa biológica.
4. Método según la reivindicación 1 en el que el primer marcador se detecta utilizando un marcador fluorescente.
- 25 5. Método según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente analizar la población de células por el detalle nuclear, el contorno nuclear, la presencia o ausencia de nucléolos, la calidad del citoplasma o la cantidad de citoplasma.
- 30 6. Método según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente analizar la población de células midiendo las células intactas con una relación núcleo/citoplasma alta, las células intactas con una relación núcleo/citoplasma baja, las células apoptósicas tempranas o las células apoptósicas tardías, e identificar las células tumorales circulantes.
- 35 7. Método según la reivindicación 1 en el que la detección del primer marcador comprende adicionalmente analizar la población de células fijando las células al sustrato, explorando la población de células en el sustrato mediante una matriz de fibra óptica y formando imágenes de las células por microscopía digital mediante una relocalización.
- 40 8. Método según la reivindicación 7 en el que la detección del segundo marcador comprende adicionalmente relocalizar las células epiteliales identificadas por el primer marcador mediante microscopía digital.
9. Método de cribado de un compuesto candidato a fármaco para el tratamiento de un cáncer epitelial en un sujeto mamífero, comprendiendo dicho método:
- 45 (i) montar unas muestras de ensayo primera y segunda en un sustrato, siendo la primera muestra una muestra de sangre de un sujeto con posible diagnóstico de cáncer antes de tratar al sujeto con el compuesto candidato a fármaco y siendo la segunda muestra de ensayo una muestra de sangre del sujeto después del tratar al sujeto con el compuesto candidato a fármaco, comprendiendo las muestras de ensayo una población de células que no ha sido enriquecida en células tumorales circulantes;
 - (ii) detectar la presencia o ausencia de un primer marcador en las muestras de ensayo en las que el primer marcador es específico para las células tumorales epiteliales circulantes y es un marcador citoqueratina;
 - 50 (iii) detectar la presencia o ausencia de un segundo marcador en las células de la población de células o de un subconjunto de la población de células, en el que el segundo marcador es la morfología celular, el tamaño celular, o la relación núcleo/citoplasma, y se detecta con una tinción citológica; y
 - (iv) analizar la población de células detectada por los marcadores primero y segundo para identificar las células tumorales epiteliales circulantes en las muestras de ensayo antes del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco en comparación con después del tratamiento con el compuesto candidato a fármaco; en
 - 55 el que la presencia de una disminución del número de células tumorales epiteliales circulantes en la muestra después del tratamiento en comparación con un número de células epiteliales tumorales circulantes en la muestra antes del tratamiento indica la eficacia del compuesto candidato a fármaco en el tratamiento del cáncer en el sujeto mamífero.

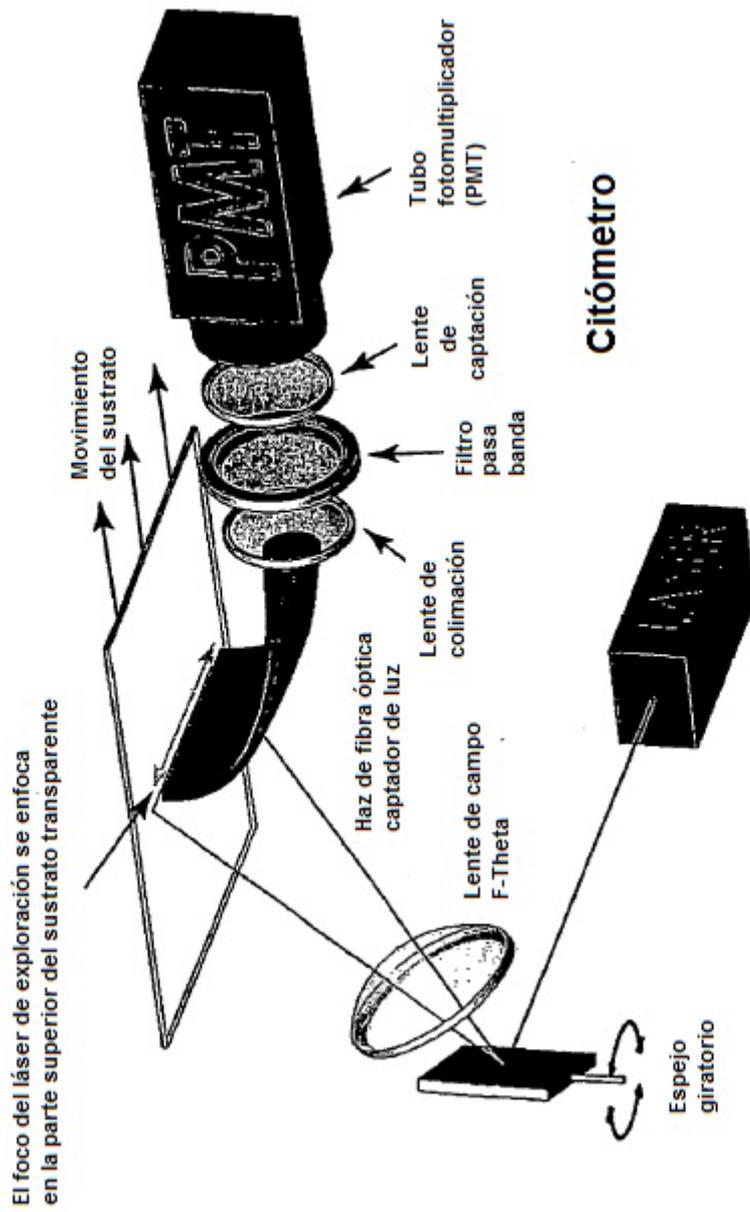


Figura 1

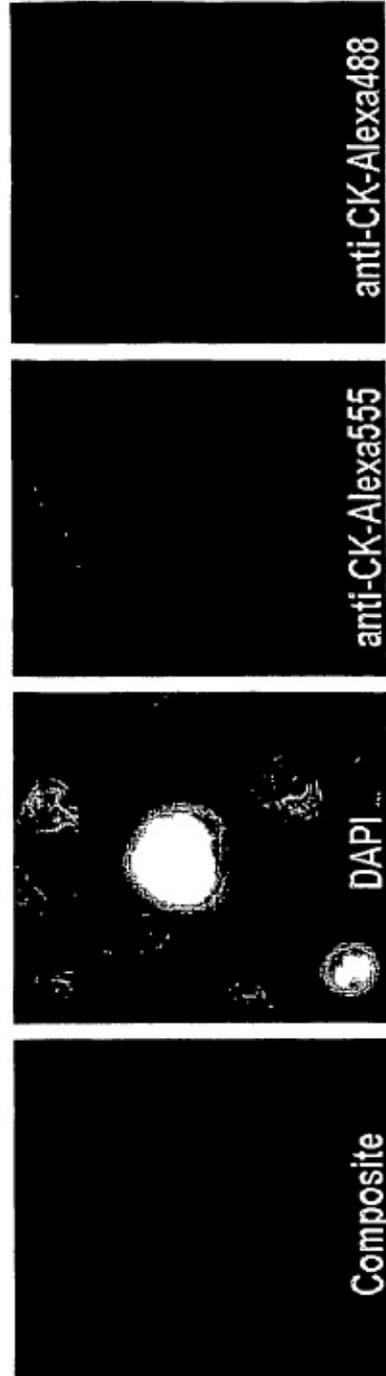


Figura 2

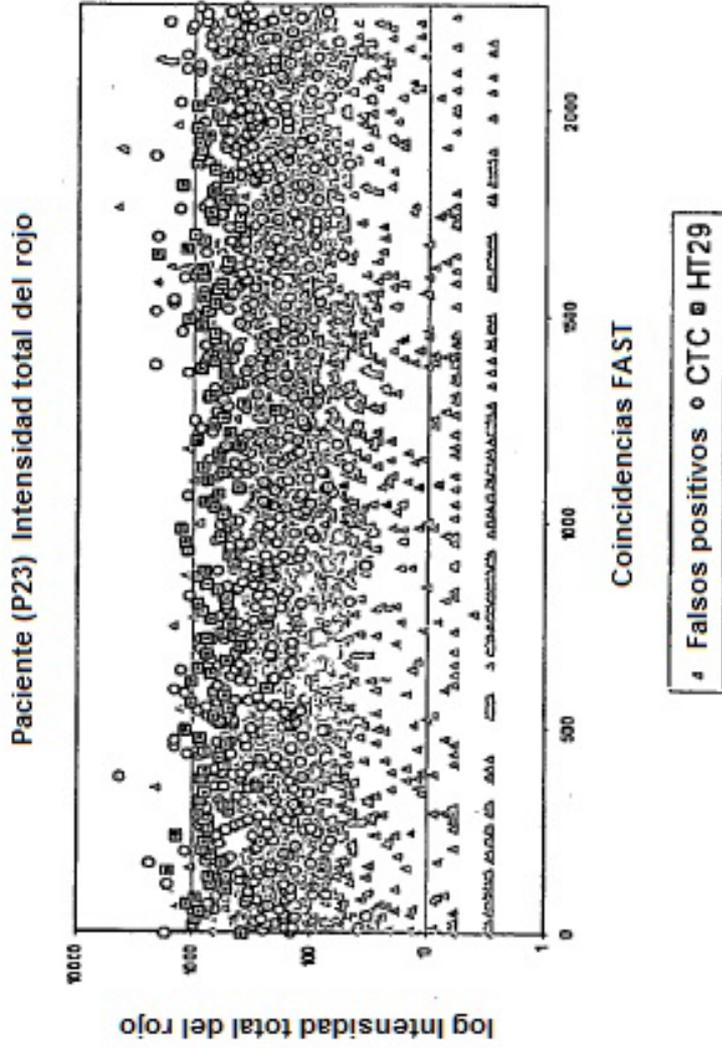


Figura 3

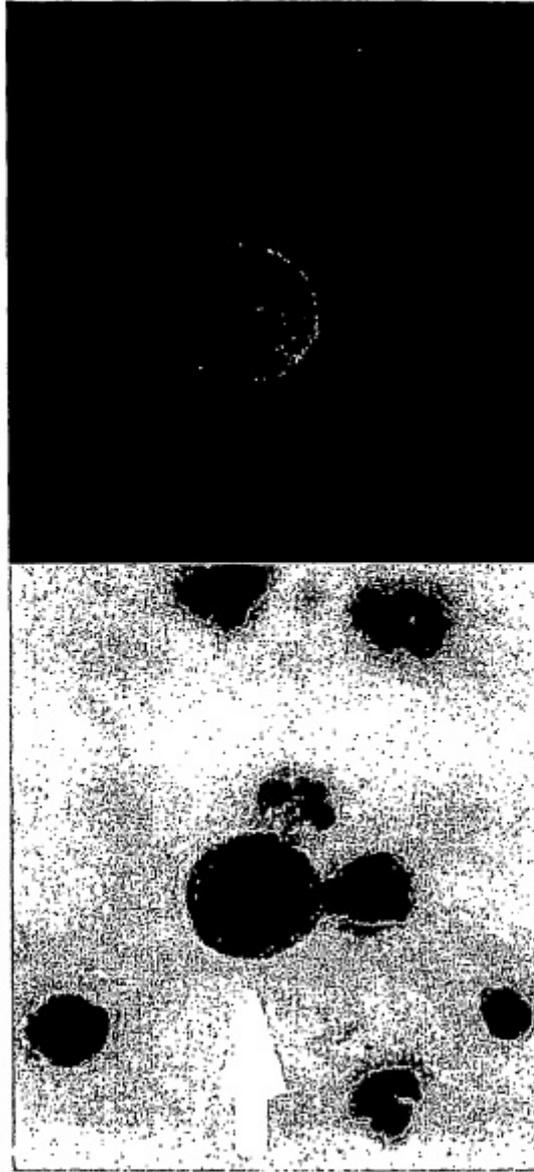


Figura 4

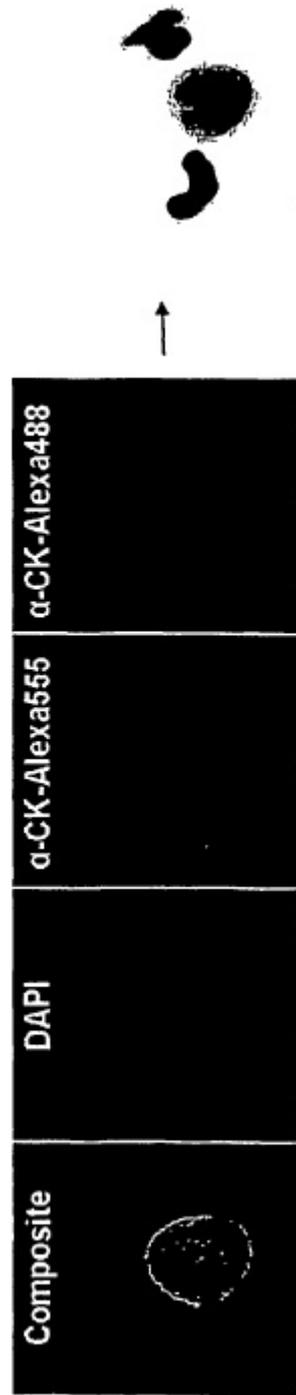


Figura 5

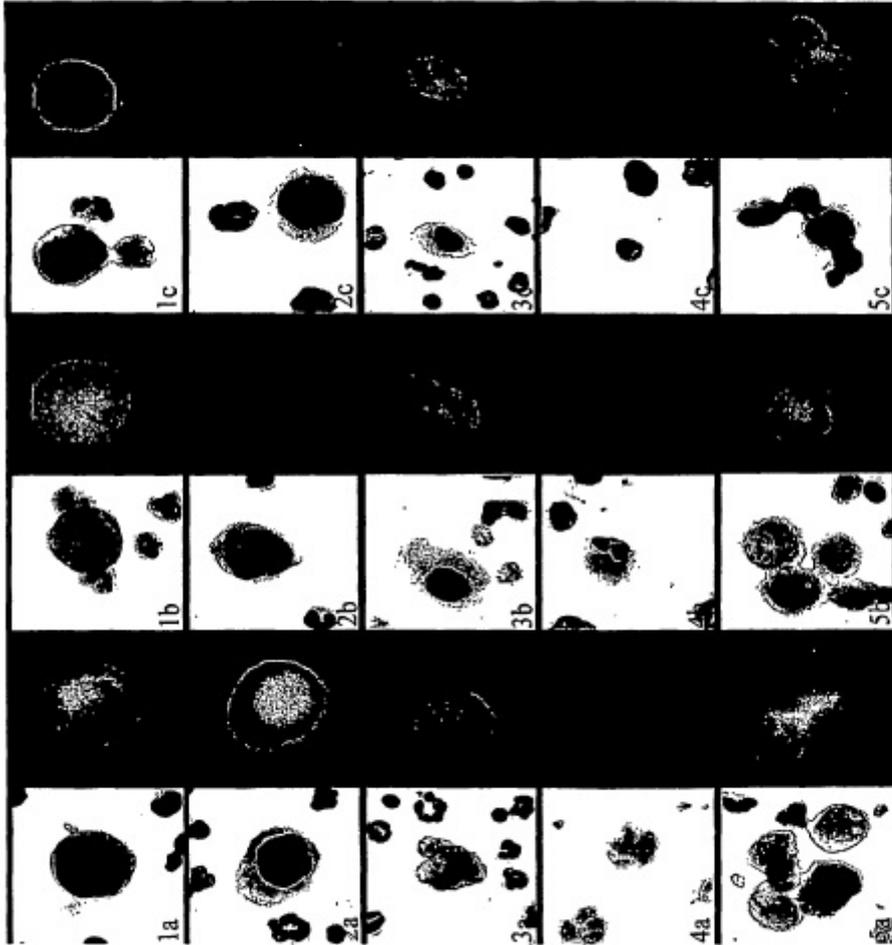


Figura 6

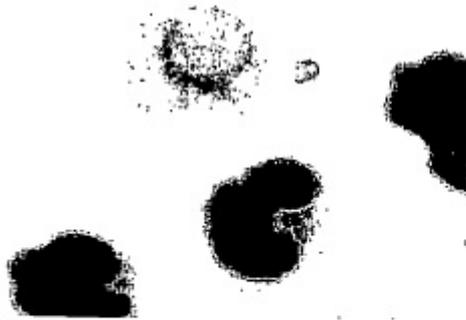
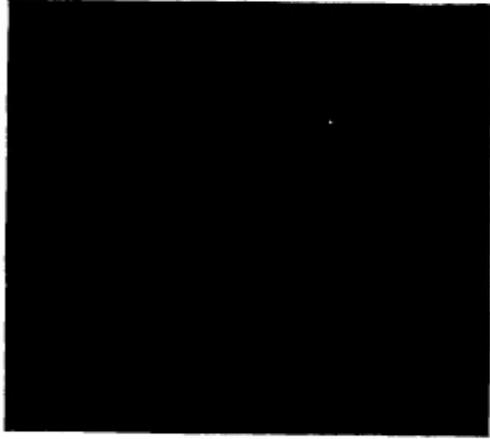


Figura 7

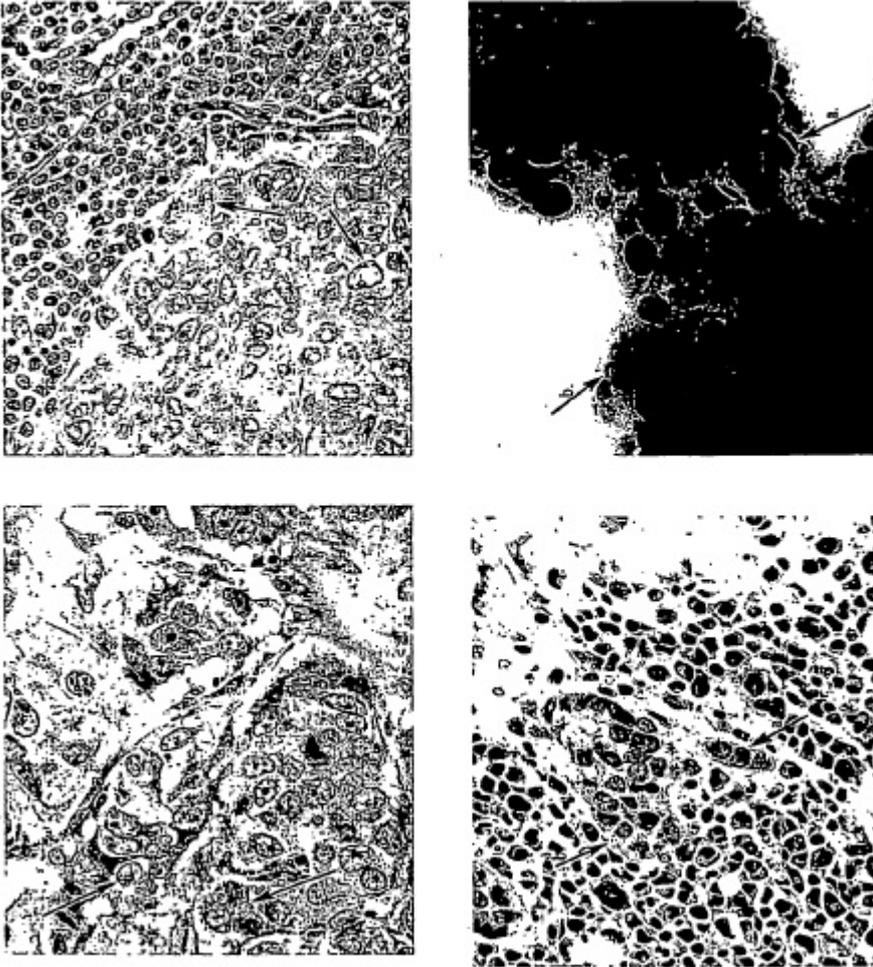


Figura 8

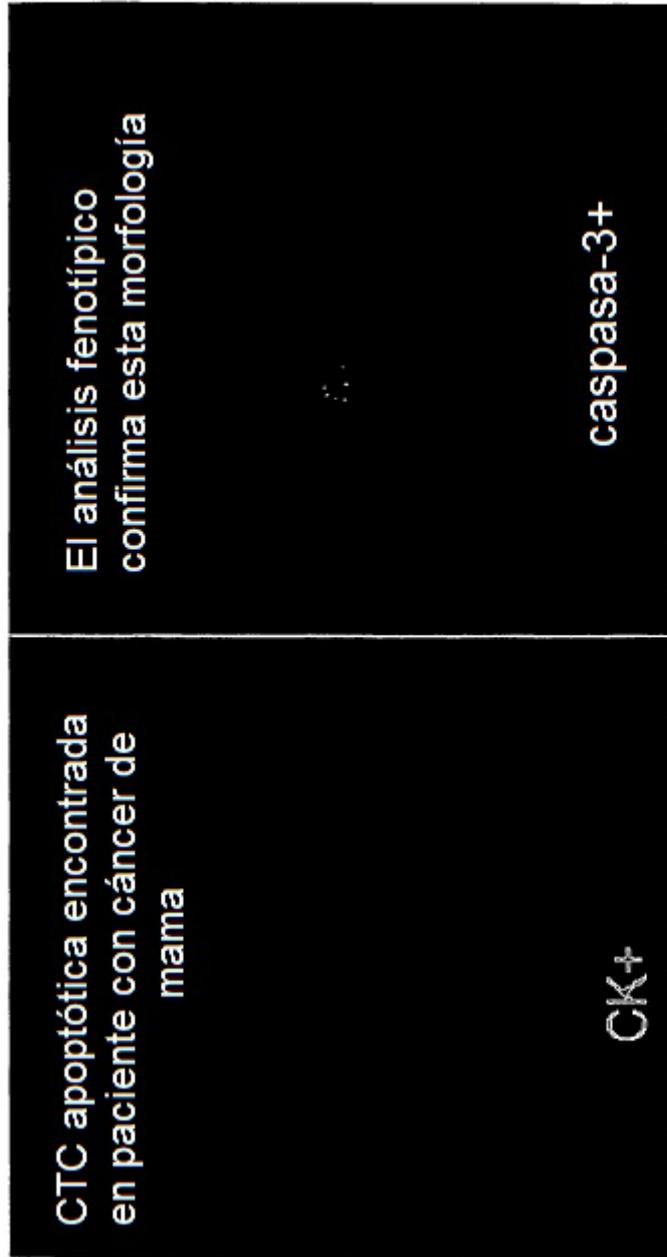


Figura 9

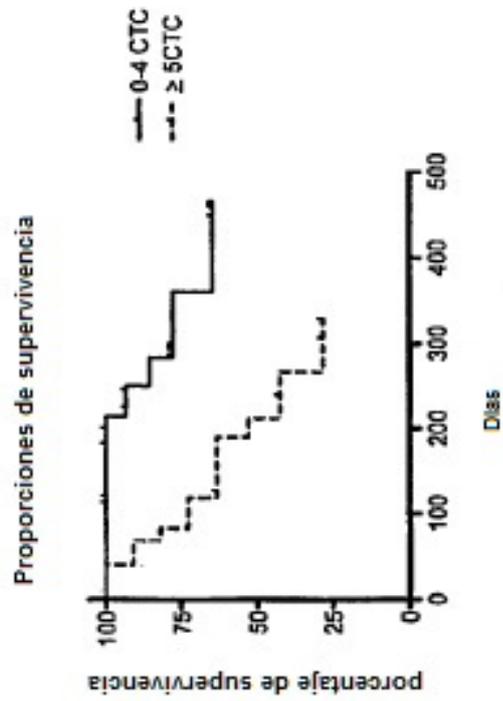


Figura 11