

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 061**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2009 E 09251888 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2169387**

54 Título: **Metodo multiparametro de alta sensibilidad para el análisis de eventos extraños en una muestra biológica**

30 Prioridad:

**29.07.2008 US 181399**

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

**30.07.2015**

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)  
700 US Highway 202  
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**CONNELLY, MARK CARLE;  
COUMANS, FRANK;  
GROSS, STEVEN y  
KELLY, JAMES MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 542 061 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).

**Metodo multiparametro de alta sensibilidad para el análisis de eventos extraños en una muestra biológica****Descripción****5 ANTECEDENTES DEL INVENTO****Campo del Invento**

10 **[0001]** El invento está relacionado con los campos de la oncología y de las pruebas de diagnóstico. El invento es útil para exploraciones, estadificación, respuestas al tratamiento, recaídas o análogas, en enfermedades tales como el cáncer o enfermedades cardiovasculares. Más específicamente, el presente invento proporciona métodos que facilitan el análisis y la enumeración de las células circulantes raras aisladas de muestras biológicas.

**Antecedentes**

15 **[0002]** Los métodos para la caracterización no sólo de células tumorales, sino también de células raras u otros organismos biológicos de muestras biológicas han sido previamente descritos (US 6,365,362).

20 **[0003]** Este método de dos etapas requiere de un eficiente enriquecimiento para asegurar la consecución de células diana mientras es eliminada una cantidad sustancial de restos y otras sustancias que interfieren previamente al análisis, permitiendo el examen celular mediante técnicas de imagen. El método combina elementos de enriquecimiento inmunomagnético con citometría de flujo multiparamétrica, microscopía y análisis inmunocitoquímico de una manera automatizada única. El método combinado se usa para enriquecer y enumerar células epiteliales en muestras de sangre, proporcionando así una herramienta para la medición del cáncer.

25 **[0004]** El método de dos etapas tiene aplicaciones en el pronóstico del cáncer y en la supervivencia de los pacientes con cáncer metastásico (WO 04076643). Basándose en la presencia de células cancerosas morfológicamente intactas, este método es capaz de correlacionar la presencia de células cancerosas circulantes de pacientes con cáncer de mama metastásico con el tiempo de progresión de la enfermedad y la supervivencia. Más específicamente, la presencia de cinco (5) o más células tumorales circulantes por 7,5 mililitros proporciona un valor predictivo en el primer seguimiento, proporcionando así un indicador de pronóstico temprano de la supervivencia del paciente.

35 **[0005]** La especificidad del ensayo descrito anteriormente aumenta con el número de células detectadas y no es el adecuado en los casos en los cuales solo pocas (generalmente menos de 5 células tumorales circulantes) son detectadas. Una solución para este problema es proporcionar la información genética detallada sobre las células sospechosas de cáncer. Por consiguiente, un método que incorporaría el enriquecimiento de una muestra de sangre con citometría de imagen multiparamétrica y el análisis genético multiparamétrico de una célula individual sospechosa de cáncer proporcionaría un perfil completo y un mecanismo de confirmación que mejoraría significativamente los procedimientos actuales de las revisiones a los pacientes, evaluando la recaída de la enfermedad o la supervivencia general. Un ensayo confirmatorio en el análisis de células circulantes raras mediante la combinación de análisis multiparamétricos fenotípicos y genotípicos de una célula diana aislada individualmente ha sido descrito (véase la solicitud pendiente de Estados Unidos 12/067,532). La confirmación proporciona un nivel clínicamente significativo de la sensibilidad y, por lo tanto, la garantía para el facultativo de cualquier tipo de información cuantitativa obtenida. Los estados patológicos relevantes son evaluados utilizándose un número extremadamente pequeño (1, 2, 3, o 4) de células tumorales circulantes (CTC) y proporcionan una estructura para la detección temprana de la enfermedad.

50 **[0006]** No hay otras tecnologías disponibles capaces de realizar múltiples ensayos de alta sensibilidad en la misma muestra con el mismo marcador y lo hacen en casos raros. La citometría de flujo multiparamétrica se hace comúnmente, pero requiere cientos o miles de células diana o blancos para obtener una información precisa. Sin embargo, si un paciente sólo tiene 6 CTC en 7,5 mLs de sangre, no es un caso suficiente para detectarse de forma fiable, por no hablar de la ejecución del análisis multiparamétrico.

55 **[0007]** El presente invento amplía el protocolo de enriquecimiento y análisis descritos en el US 6.365.362 y utilizado en los Sistemas Celltracks® Autoprep® y Celltracks® Analyzer II System (Immunicon Corporation, Huntingdon Valley, PA), proporcionando un medio para permitir la interrogación de células circulantes raras con múltiples biomarcadores fluorescentes.

60 **[0008]** WO2007/053245 muestra métodos para el análisis genético de las células que se han identificado después de la selección inmunomagnética y del etiquetado fluorescente. EP1722230 se refiere a métodos para la detección de un patrón molecular de una enfermedad específica en una muestra de tejido de la piel de un paciente y/o una muestra del tejido de la mucosa de la piel vecina, en el que la disposición espacial de los epítomos en la muestra es extraída a través de la identificación del patrón de la combinación molecular específica de la enfermedad.

65 RESUMEN DEL INVENTO

5 **[0009]** El invento, tal y como se define en las reivindicaciones, consiste en un método que consta de cinco partes que trabajan conjuntamente para lograr el resultado final. El método consiste esencialmente en (1) Escaneado de un cartucho para identificar aquellos con células diana de interés y su ubicación en el cartucho; (2) Aspiración del fluido del cartucho para secar o fijar de forma activa las células en su posición en cubreobjetos; (3) Fotoblanqueo de las señales fluorescentes para eliminar la fluorescencia que se utilizó originalmente para identificar la célula diana; (4) Retinte de las células dentro del cartucho con uno o más anticuerpo(s) fluorescente(s) conjugado(s) con una combinación de anticuerpos y un colorante para identificar marcadores, receptores, proteínas, etc., de interés en o dentro del blanco de interés; (5) Nuevo escaneado del cartucho y retorno a los blancos de interés previamente identificados determinando si las células son positivas o negativas para los marcadores o proteínas deseadas.

15 **[0010]** Una muestra de sangre que contiene CTC, u otras células de interés, es teñida con marcadores fluorescentes de análisis de imágenes y es escaneada para identificar la presencia y la ubicación de las células diana o los elementos subcelulares en el cartucho. Se procesa a continuación una muestra que contiene las células diana deseadas o los elementos subcelulares, en parte a través del fotoblanqueo de la muestra, de manera que estos mismos blancos pueden volver a ser analizados con biomarcadores adicionales conjugados con los mismos o diferentes fluorocromos usándose los mismos criterios de imagen que se utilizaron en el análisis inicial. El presente invento se aplica a blancos como las células epiteliales circulantes, células, células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, leucocitos, subconjuntos de linfocitos, células que contienen un orgánulo o un receptor de interés, restos celulares, células rotas y sus restos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 **[0011]**

Figura 1: Panel A Confirmación de la integridad de la muestra y de la ubicación del blanco después del secado. Panel B Las células se muestran en el mismo lugar antes y después del secado.

30 Figura 2: Retinte del cartucho después del secado.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 **[0012]**

Figura 1: Panel A Confirmación de la integridad de la muestra y la ubicación del blanco después del secado. Panel B Las células se muestran en el mismo lugar antes y después del secado.

40 Figura 2: Retinte del cartucho después del secado.

Figura 3: Blanqueo de la señal fluorescente utilizando LEDs. Panel A Blanqueo de células SKBR teñidas con C11-PE seguido del retinte con C11-FITC. Panel B Blanqueo de las células teñidas con PC3-9 C11-PE seguido de retinte con C11-FITC.

45 Figura 4: Panel A presenta el escaneado inicial de las células teñidas con SKBR C11-PE. Panel B presenta la muestra después del blanqueo y retinte con solo C11-FITC. Panel C presenta la muestra reteñida con C11-FITC y pART-PE.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

50 **[0013]** Las células tumorales circulantes (CTCs) extraídas de la sangre han sido detectadas y analizadas mediante los Sistemas Cell-Tracks® Autoprep® y CellTracks® Analyzer II System (Immunicon Corporation, Huntingdon Valley, PA). En este procedimiento, se utiliza una combinación de biomarcadores fluorescentes y colorantes para identificar las células de origen epitelial y para distinguirlas de los leucocitos contaminados. La plataforma de análisis CellTracks® se limita a cuatro canales o colores para detectar estos marcadores fluorescentes. Un canal UV detecta 4'-6'Diamidino-2-fenilindol (DAPI), una mancha nuclear, que identifica procesos nucleares o celulares; un canal de alofococianina (APC) se utiliza para detectar CD45-APC, usado para identificar los leucocitos; y dos canales de marcadores, ficoeritrina (PE) y isotiocianato de fluoresceína (FITC), se utilizan para detectar biomarcadores conjugados tanto con PE como con FITC. Al usar el kit Cell-Search® estándar (Veridex LLC, Raritan, NJ), el PE es conjugado con las citoqueratinas que son usadas para identificar las células epiteliales y el canal FITC está disponible para los marcadores adicionales de interés. El Kit de Células Epiteliales (Immunicon Corporation, Huntingdon Valley, PA) utiliza la misma combinación de colores, pero la citoqueratina está conjugada con el FITC liberando el canal PE. El canal de señalización de PE más fuerte permite la detección de biomarcadores más tenues conjugados con PE.

65 **[0014]** Una vez que ya solo existen cuatro canales o colores en el Sistema CellTracks® Analyzer II y tres de esos colores están dedicados a la detección de las células epiteliales y leucocitos, sólo un canal sigue estando disponible

para análisis adicionales de biomarcadores. Sin embargo, existe una necesidad, especialmente en la industria farmacéutica, de detectar múltiples biomarcadores en un blanco extraído, y sería preferible que la detección se produjera en el mismo blanco. El presente invento permite la eliminación de las señales fluorescentes de los biomarcadores y colorantes que se adjuntan a los blancos extraídos y el retinte de los mismos objetivos con marcadores adicionales de interés. Una etapa de secado después del escaneado inicial del cartucho fija los objetivos de interés en su ubicación original dentro del cartucho de modo que cuando se volvió a teñir el cartucho, estos mismos objetivos son fácilmente encontrados y analizados en la presencia de los biomarcadores de adicionales interés.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

**[0015]** En la primera etapa del procedimiento, un cartucho de CellTracks® se procesa en los Sistemas Celltracks® Autoprep® System y Celltracks® Analyzer II, en los cuales se escanean los blancos extraídos y se identifica la presencia de los blancos deseados para la ubicación dentro del cartucho determinado. El fluido en el cartucho se elimina por aspiración y el cartucho se seca al aire durante la noche. La aspiración y el secado se hacen mientras el cartucho permanece en el MagNest® original. Este paso "fija" los blancos, generalmente células tales como CTC, en su lugar en el cartucho de manera que se quedan esencialmente inmóviles y fijados a la superficie de formación de imágenes en el lugar donde se detectaron originalmente. El método preferido de fijación de las células es el secado del cartucho, sin embargo, se pueden utilizar otros métodos de fijación y, de hecho, pueden ser necesarios para revelar algunos tipos de antígenos o lograr una reactividad óptima de ciertos anticuerpos con sus antígenos. Esta etapa de secado o fijación activa permite que el cartucho sea retirado de MagNest® y sea procesado con poco o ningún movimiento celular o pérdidas. Por lo tanto, permite que un dispositivo de imagen como, aunque no limitado a, el Sistema Celltracks® Analyzer II System obtenga nuevamente los blancos durante los análisis subsiguientes. La segunda etapa del procedimiento expone el cartucho a una luz intensa generada por, aunque no limitada a, los LEDs para blanquear la fluorescencia de los colorantes y los marcadores que fueron incorporados a los blancos durante su procesamiento inicial. El fotoblanqueo es eficaz cuando un fluorocromo es excitado a una alta velocidad. La banda de longitud de onda en la cual un colorante se excita con una alta eficiencia normalmente es estrecha (10-50nm). Los LEDs generan luz de manera eficiente en una banda de longitud de onda estrecha con alta eficiencia y están disponibles para poder emitir desde cerca de UV a IR. La eficiencia del LED aumenta mediante un disipador de calor. Se puede utilizar un homogeneizador opcional que consiste en superficies reflectantes o refractoras para mejorar la uniformidad de la distribución de luz sobre la muestra. Con el prototipo actual de blanqueador LED, el fotoblanqueo de una tinción brillante puede tardar hasta 20 minutos. Sin embargo, son suficientes de entre 10 a 15 minutos para atenuar las señales. Durante la etapa final, se vuelve a teñir la muestra en el cartucho con biomarcadores adicionales de interés conjugados con fluorocromos. Se retira la solución de tinción y se sustituye con una solución colorante de ácido nucleico, tal como CellFix que contiene DAPI, y se vuelve a analizar el cartucho en el dispositivo de formación de imágenes.

40

**[0016]** La Figura 1A confirma la integridad de la muestra después del secado. Después de que la muestra se haya secado, la distribución de ferrofluido y la ubicación de los blancos permanecen invariables a las que cuando se hizo el escaneado inicial mediante el Sistema CellTracks® Analyzer II System. La Figura 1B muestra que las células permanecen intactas y en la misma ubicación antes y después del secado.

45  
50

**[0017]** La figura 2 demuestra la capacidad de reteñido en el cartucho después del secado. Aquí, se añadieron células diana a la sangre, preparadas utilizándose el conservante CellSave (Immunicon Corporation) y han sido almacenadas durante la noche. La muestra fue entonces procesada en los Sistemas CellTracks® Autoprep® System y CellTracks® Analyzer II System usando un kit CTC que etiqueta las células con el C11-PE. En el escaneado inicial, el canal FITC permanece vacío como si no hubiera ningún marcador conjugado con FITC. Después de que los cartuchos hayan sido secados y de que la señal fluorescente haya sido blanqueada, se volvió a teñir la muestra con C11-FITC en el cartucho que se escaneó previamente en el Sistema CellTracks® Analyzer II. La muestra es ahora positiva tanto en el canal PE como FITC. Aunque las muestras se teñieron inicialmente con C11-PE, quedan sitios de unión suficientes para la subsiguiente unión C11-FITC.

55  
60

**[0018]** Las Figuras 3A y 3B demuestran la capacidad de blanqueo de las señales fluorescentes usando diodos de emisión de luz (LEDs). Las células se insertaron en la sangre, conservadas mediante el uso del conservante CellSave, y fueron almacenadas durante la noche. La muestra fue entonces procesada por el Sistema CellTracks® Autoprep® System usando un kit CTC que etiqueta las células con C11-PE. Los cartuchos fueron entonces escaneados en el Sistema Celltracks® Analyzer II System. Después de que el fluido fuera aspirado y el cartucho secado, se volvió a añadir CellFix al cartucho. El cartucho fue retirado de la Mag-Nest®, y expuesto a la luz de los LEDs durante un máximo de 20 minutos. El cartucho es colocado de nuevo en MagNest®, CellFix es aspirada y se vuelve a teñir las células con C11-FITC y después DAPI. Este retinte es necesario para que las células insertadas puedan volver a ser absorbidas y analizadas en el Sistema Celltracks® Analyzer II. El blanqueo fue observado únicamente en la tinción inicial C11-PE. Tras el escaneado de las muestras en el Sistema Celltracks® Analyzer II System, éstas fueron evaluadas en función de la intensidad del brillo de la tinción mediante el uso de un software que determina la intensidad media de fluorescencia (MFI).

65

**[0019]** La figura 3A muestra el blanqueo de las células SKBR intensamente teñidas con C11-PE. Tras 20 minutos de blanqueo, la PE MFI cae de ~4000 a cerca de 0. La Figura 3B muestra el blanqueo de las células PC3-9 con una tinción tenue de C11-PE, típico de las CTCs. La PE MFI cae de un rango de 500-2000 a 0 tras un blanqueo de 10-15

minutos.

- 5 **[0020]** El objetivo final es volver a teñir con un marcador no utilizado previamente en el Sistema CellTracks® Autoprep® System durante el procesamiento inicial de la muestra. Las imágenes en la Figura 4 demuestran la capacidad de extraer las CTCs procesadas en el Sistema CellTracks® Autoprep® usando las combinaciones de tinción de DAPI, CD45 APC, y C11-PE, blanqueando las señales y volviendo a teñir las células con DAPI, C11-FITC y p-AKT PE. AKT es una cinasa importante en la señalización celular a través de la vía PI3K. La enzima se activa por fosforilación, y es conocida por ser activada de manera constitutiva en algunos tumores.
- 10 **[0021]** La figura 4A muestra el escaneado inicial de las células SKBR extraídas de la sangre y teñidas en el Sistema CellTracks® Autoprep® System con C11-PE. Obsérvese el canal FITC negativo. La figura 4B presenta la muestra después del blanqueo y de haber sido reteñida con C11-FITC. Obsérvese la señal negativa en el canal PE. La figura 4C presenta la muestra después del blanqueo y de haber sido reteñida con C11-FITC y pAKT-PE.
- 15 **[0022]** El presente invento permite la interrogación de las CTC con múltiples biomarcadores fluorescentes de interés, que normalmente no serían posibles utilizando un único protocolo de procesamiento mediante los Sistemas CellTracks® Autoprep® System y CellTracks® Analyzer II System. Esto se logra mediante el blanqueo de la señal fluorescente de los colorantes utilizados durante la ejecución inicial y el retinte en el cartucho con biomarcadores fluorescentes adicionales que pueden ahora volver a ser escaneados utilizando los mismos canales fluorescentes.
- 20 **[0023]** El presente invento considera múltiples reblanqueos de la misma muestra con un subsiguiente retinte. El presente invento tiene en cuenta además, el proceso de blanqueo y su uso en múltiples ensayos específicos relacionados a la(s) misma(s) célula(s). Por lo tanto, el análisis multiparamétrico de las células puede ser llevado a cabo sin la necesidad de añadir canales fluorescentes; más filtros, más fuentes de luz, aumentando la complejidad del instrumento y del software de recopilación y análisis de los datos. En consecuencia, se amplía la capacidad del analizador de 4 colores de fluorescencia existente de poder analizar los parámetros 'N' sin modificaciones de sistemas complejos y costosos. También permite al usuario identificar los cartuchos de interés, secarlos o fijarlos y almacenarlos para su posterior análisis de alto valor.
- 25 **[0024]** El invento permite el uso de la misma alta sensibilidad fluorófora para dos o más analitos en la misma célula, algo que no resulta posible a través de cualquier otra tecnología en esta técnica. Por ejemplo, PE tiene una alta absorción y rendimiento cuántico de fluorescencia que hace que sea muy adecuado para la detección de marcadores de alta sensibilidad tales como IGF-1R y p-AKT. Estos marcadores están en tal baja concentración en las células diana que si el anticuerpo conjugado se acopla FITC en lugar de PE, no serían detectados. Sólo IGF-1R no es suficiente en una célula positiva para proporcionar una señal detectable utilizando FITC debido a su menor sensibilidad y rendimiento cuántico. Lo mismo vale para p-AKT, sin embargo, en el presente invento se puede identificar una CTC usando CK-PE. La señal CK-PE es blanqueada a 0, reteñida con un anti-IGF-1R-PE y el estado IGF-1R de la misma célula es determinado. La señal IGF-1R puede ser aún más blanqueada a 0 y reteñida en el cartucho usando anti-p-AKT-PE. Este proceso permite que los tres analitos sean probados en la misma célula usando el fluorocromo disponible más sensible.
- 30 **[0025]** El invento permite también la investigación adicional de alto valor añadido para recoger información clínica en las muestras, sin la necesidad de llamar a los pacientes de nuevo y recoger muestras adicionales. Si se encuentran CTC u otros blancos de interés, la muestra puede ser preparada usando el presente invento y las propiedades de estas CTC examinadas y escaneadas sin tener que someter al paciente a procedimientos invasivos adicionales. Además, si la muestra no contiene el blanco de interés, las pruebas adicionales de alto valor, los procedimientos y los reactivos no necesitarán ser empleados. Esto difiere de otros métodos a los que se debe añadir los reactivos del ensayo antes de que se sepa si la muestra contiene realmente el blanco de interés.
- 35 **[0026]** El invento permite el análisis detallado de las CTC u otros blancos de interés una vez que se encuentran, tal y como se define en las reivindicaciones. Esto puede ser usado durante el desarrollo de fármacos para identificar si una CTC individual tiene la probabilidad de ser susceptible a las terapias dirigidas. Puede ser utilizado entonces para explorar más a fondo o confirmar los estudios de mecanismos de acción de los fármacos mediante la determinación de si los marcadores intracelulares u otros están en regulación ascendente, regulación descendente o fosforilados en respuesta a terapias como se predijo a partir de estudios in vitro, proporcionados para diagnósticos de acompañamiento. El presente invento es útil para desarrollar un método mínimamente invasivo para obtener muestras para determinar la idoneidad de un paciente para ser tratado mediante medicina personalizada. Otras aplicaciones conocidas en la técnica tales como, aunque no limitadas a, la detección de estados de activación de subconjuntos de leucocitos, factor importante en los daños inflamatorios o tormentas de citocinas, tales como el shock séptico. El presente método también es útil para el uso exclusivo en investigación (RUO), y, posiblemente, en
- 40 **[0027]** Si bien algunas de las realizaciones preferidas del presente invento han sido descritas y ejemplificadas de manera específica anteriormente, no se pretende que el invento esté limitado a dichas realizaciones.
- 45 **[0027]** Si bien algunas de las realizaciones preferidas del presente invento han sido descritas y ejemplificadas de manera específica anteriormente, no se pretende que el invento esté limitado a dichas realizaciones.
- 50 **[0027]** Si bien algunas de las realizaciones preferidas del presente invento han sido descritas y ejemplificadas de manera específica anteriormente, no se pretende que el invento esté limitado a dichas realizaciones.
- 55 **[0027]** Si bien algunas de las realizaciones preferidas del presente invento han sido descritas y ejemplificadas de manera específica anteriormente, no se pretende que el invento esté limitado a dichas realizaciones.
- 60 **[0027]** Si bien algunas de las realizaciones preferidas del presente invento han sido descritas y ejemplificadas de manera específica anteriormente, no se pretende que el invento esté limitado a dichas realizaciones.
- 65 **[0027]** Si bien algunas de las realizaciones preferidas del presente invento han sido descritas y ejemplificadas de manera específica anteriormente, no se pretende que el invento esté limitado a dichas realizaciones.

**Reivindicaciones**

1. Un método para aumentar la sensibilidad en los análisis de casos raros que comprende:

- 5 a. la preparación de la muestra mediante el etiquetado fluorescente;  
b. el escaneado de la muestra para identificar los blancos, en el cual el blanco es seleccionado de un grupo que contiene células epiteliales circulantes, células, células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, leucocitos, subconjuntos de linfocitos, células que contienen un orgánulo o un receptor de interés, restos celulares, células rotas y sus restos, o combinaciones de los mismos;
- 10 c. la aspiración del fluido de la muestra para dejar los blancos en la misma ubicación;  
d. el fotoblanqueo de los blancos;  
e. el tinte del blanco con un marcador fluorescente secundario en el que dicho marcador secundario es un anticuerpo fluorescente conjugado o una combinación de un conjugado de anticuerpo fluorescente y un colorante;
- 15 f. el nuevo escaneado de los blancos; y  
g. la repetición de las etapas c a f para cada marcador fluorescente adicional.

2. El método de la reivindicación 1 en el que dicho blanco son las células tumorales circulantes.

20 3. El método de la reivindicación 1 en el que una etapa adicional consiste en la delimitación del perfil multiparamétrico genotípico de dicho blanco.

4. El método de la reivindicación 3 en el que dicha delimitación del perfil del genotipo es FISH.

25

30

35

40

45

50

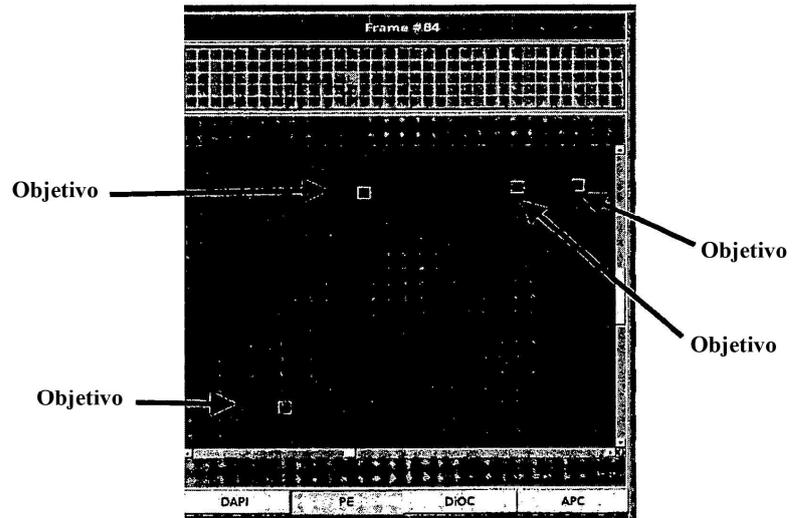
55

60

65

**Figura 1 Panel A**

Escaneado mediante Celltracks® Analyzer II ANTES del secado



Escaneado mediante Celltracks® Analyzer II DESPUES del secado

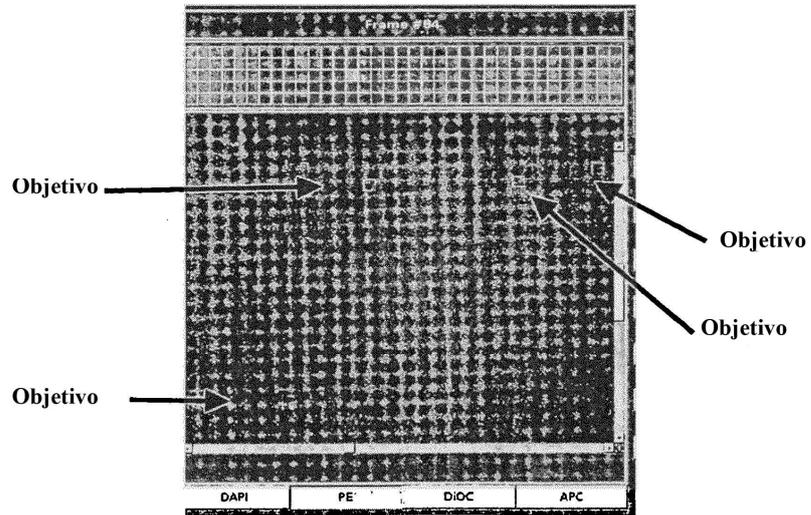


Figura 1 Panel B

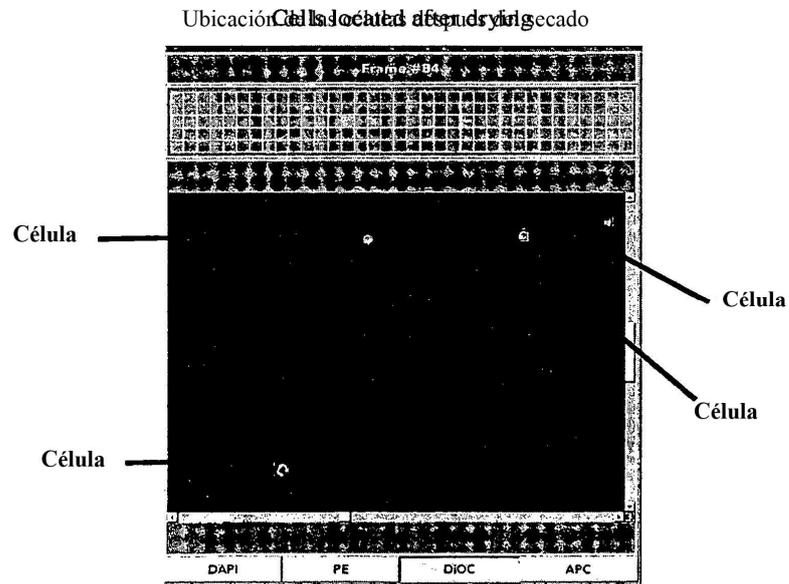
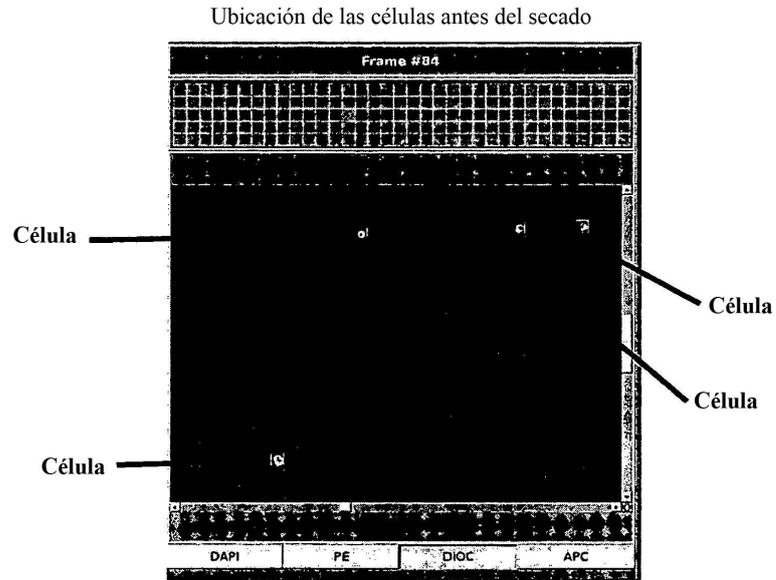
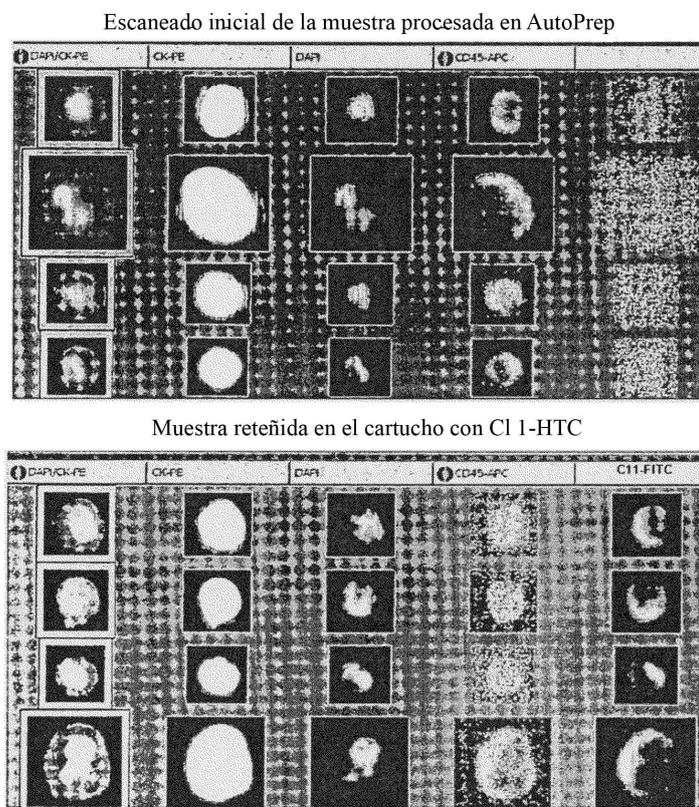
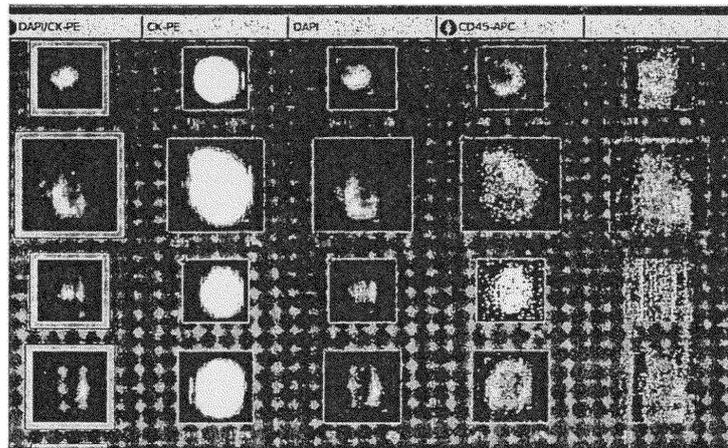


Figura 2



**Figura 3 Panel A**

Escaneado inicial de la muestra teñida con CI 1-PE en AutoPrep



Muestra blanqueada y reteñida con CI 1-FITC

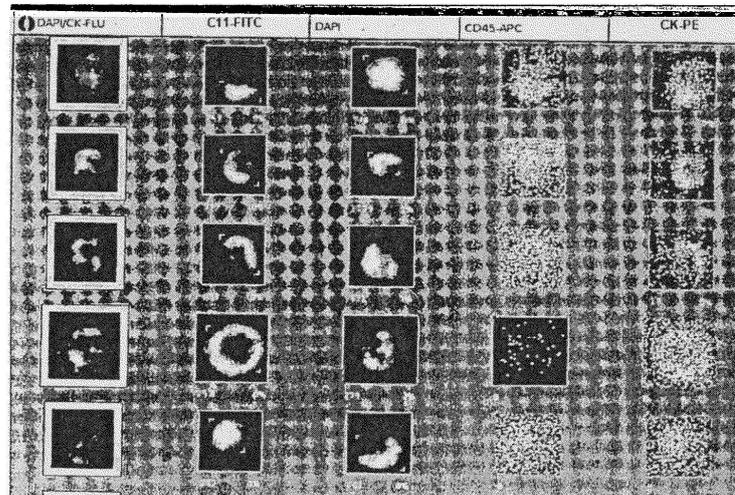
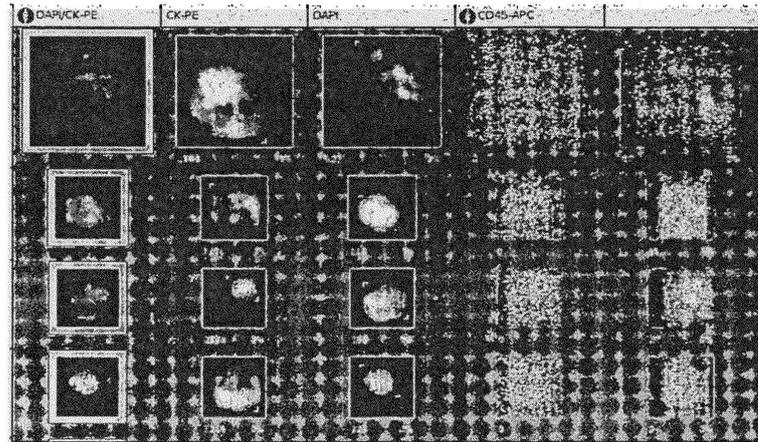
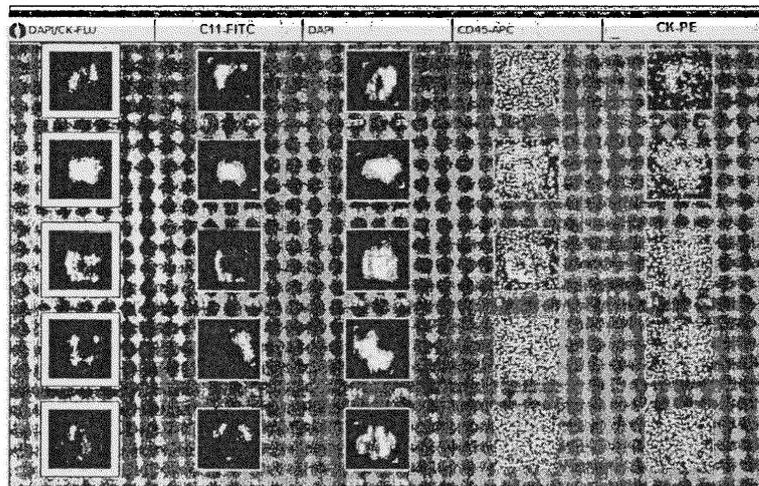


Figura 3 Panel B

Escaneado inicial de la muestra teñida con CI 1-PE en AutoPrep

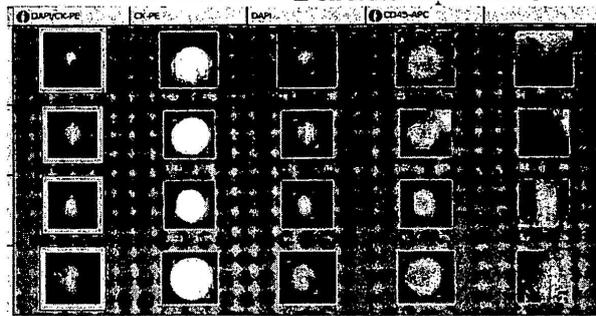


Muestra blanqueada y reteñida con CI 1-FITC



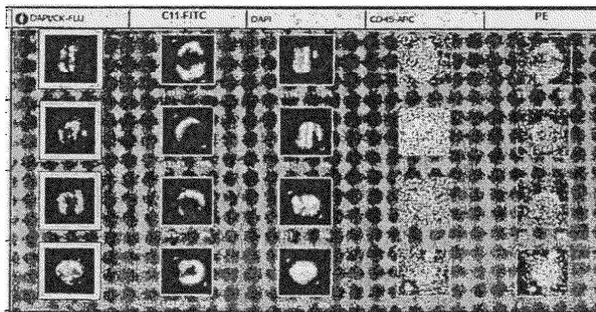
**Figura 4 Panel A**

Escaneado inicial de la muestra teñida con CII-PE en AutoPrep®



**Figura 4 Panel B**

Muestra blanqueada y reteñida con CI 1-FITC



**Figura 4 Panel C**

Muestra blanqueada y reteñida con CI 1-FITC y p-AKT PE

