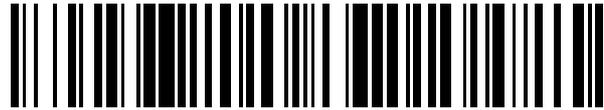


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 639**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2010 E 10825626 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2491395**

54 Título: **Método para usar células no raras para detectar células raras**

30 Prioridad:

21.10.2009 US 253787 P

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (50.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037, US y
EPIC SCIENCES, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KUHN, PETER;
KOLATKAR, ANAND;
KUNKEN, JOSHUA;
MARRINUCCI, DENA;
YANG, XING y
STUELPNAGEL, JOHN R.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 556 639 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para usar células no raras para detectar células raras

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere en líneas generales a diagnósticos médicos y más específicamente a la detección y clasificación de células tumorales en circulación de alta definición (HD-CTC).

INFORMACIÓN ANTECEDENTE

15 Existen necesidades médicas insatisfechas significativas para el control longitudinal de enfermedades en pacientes con cánceres epiteliales a nivel celular. La predicción y control de la respuesta a la terapia y la progresión de la enfermedad son particularmente importantes en pacientes con cáncer epitelial debido a la historia natural de la enfermedad y el proceso selectivo de selección en respuesta a la presión terapéutica. Aunque se han hecho progresos en la comprensión de los tumores primarios y metastásicos en sus respectivos micro-entornos, existe una barrera sustancial en la comprensión del comportamiento del carcinoma durante la fase fluida, según se propaga y ocupa el torrente sanguíneo. El componente en circulación del cáncer contiene dentro del mismo las células que dan lugar a metástasis futura, y por tanto, representa una diana atractiva para investigación.

25 La investigación para caracterizar completamente la importancia clínica de esta fase fluida de tumores sólidos se ha visto impedida por la ausencia de herramientas experimentales fácilmente accesibles y fiables para la identificación de CTC. El carácter desconocido y la frecuencia baja y desconocida de CTC en la sangre, combinada con la dificultad de distinguir entre células epiteliales cancerosas y normales, ha impedido significativamente la investigación del modo en que la fase fluida podría ser clínicamente importante. La biopsia ideal en fase fluida debe encontrar cantidades significativas de una población CTC específica en la mayoría de los pacientes con cáncer epitelial y conservar y presentar las CTC a un patólogo y/o investigador en un formato que posibilite no solo la enumeración sino también el análisis molecular, morfológico y/o fenotípico. Además, debe conservar las restantes poblaciones raras para análisis adicional.

35 Las CTC son generalmente, aunque no exclusivamente, células epiteliales que se originan a partir de un tumor sólido en concentración muy baja y entran en el torrente sanguíneo de pacientes con diversos tipos de cáncer. Las CTC también se cree que son capaces de originarse en la sangre, formando pequeñas colonias en todo el organismo. El desprendimiento de CTC por un tumor existente o metástasis a menudo provoca la formación de tumores secundarios. Los tumores secundarios típicamente permanecen indetectables y conducen al 90 % de todas las muertes por cáncer. Las células tumorales en circulación proporcionan el enlace entre los tumores primarios y metastásicos. Esto conduce al uso prometedor de la identificación y caracterización de células tumorales en circulación para la detección temprana y el control del tratamiento de neoplasias epiteliales metastásicas. Las detección de CTC en pacientes con cáncer ofrece una herramienta eficaz en el diagnóstico prematuro de crecimiento canceroso primario o secundario y la determinación del pronóstico de pacientes con cáncer que experimentan tratamiento contra el cáncer porque la cantidad y caracterización de las CTC presentes en la sangre de dichos pacientes se ha correlacionado con pronóstico y respuesta global a terapia. Por consiguiente, las CTC sirven como indicador prematuro de expansión tumoral o metástasis antes de la aparición de síntomas clínicos.

50 Aunque la detección de CTC tiene implicaciones pronósticas importantes y terapéuticas potenciales en el control y tratamiento del cáncer, a causa de su naturaleza oculta en el torrente sanguíneo, estas células raras no se detectan fácilmente. Las CTC se describieron por primera vez en la década de 1800, sin embargo, solamente los avances técnicos recientes han permitido su detección fiable. El desafío en la detección de células tumorales en circulación es que están presentes en frecuencia relativamente baja en comparación con otras células nucleadas, habitualmente menos de 1:100.000. Para compensar este desafío, los enfoques más convencionales para detectar células tumorales en circulación dependen de métodos experimentales de enriquecimiento, por los cuales las CTC se separan preferentemente de los otros componentes celulares (por ejemplo, no CTC), de forma más importante otras células nucleadas que son las más similares a las CTC.

60 Actualmente, los métodos más utilizados de enriquecimiento positivo para enumeración/caracterización de CTC son métodos inmunomagnéticos de enriquecimiento que abordan la proteína superficial EpCAM y el "chip-CTC". La metodología más ampliamente usada para detectar CTC, la tecnología Veridex de J&J, utiliza enriquecimiento inmunomagnético. La tecnología depende del enriquecimiento inmunomagnético de poblaciones de células tumorales usando ferrofluidos magnéticos ligados a un anticuerpo que se une a la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), expresada solamente en células derivadas de epitelio. Esta metodología requiere 7,5 ml de sangre para el análisis y encuentra más de 2 CTC en solamente algunos pacientes con cáncer metastásico.

65 La tecnología microfluídica o "chip-CTC", es otro método de enriquecimiento positivo para enumeración/caracterización de CTC. Los métodos utilizan 1-3 ml de sangre en que la sangre completa fluye más

5 allá de 78.000 micropostes recubiertos con EpCAM. Las células EpCAM+ se adhieren a los postes y posteriormente se tiñen con citoqueratina, CD45, y DAPL. Con esta metodología, se encuentran CTC en casi todos los pacientes con cáncer metastásico a una pureza relativamente alta y no en controles sanos. Además, la tecnología de chip-CTC identifica CTC en todos los pacientes y en cantidades mayores que otras tecnologías por un factor de aproximadamente 10 a 100 veces como se informa en dos publicaciones recientes.

10 La única tecnología usada de forma rutinaria para la detección de CTC se basa en enriquecimiento inmunomagnético. Esta "regla de oro" actual y ensayo aprobado por la FDA se llama CellSearch® y emplea una etapa de enriquecimiento inmunomagnético para aislar células que expresan la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). Además, para identificarse como CTC, la célula debe contener un núcleo, expresar citoqueratina citoplasmática, y tener un diámetro mayor de cinco micrómetros. Este sistema ha puesto al descubierto la utilidad pronóstica de enumerar y controlar los recuentos de CTC en pacientes cánceres metastásicos de mama, próstata, y colorrectal; sin embargo, la sensibilidad de este sistema es baja, encontrando ninguna o pocas CTC en la mayoría de los pacientes. La mayoría de las tecnologías de seguimiento de CTC han presentado sensibilidad mayor y están persiguiendo variaciones de la estrategia de enriquecimiento, sin embargo, esto desvía directamente los eventos detectables hacia aquellos que tienen suficiente expresión de la proteína seleccionada para la etapa inicial de enriquecimiento.

20 También se ha utilizado previamente un enfoque basado en microscopia normalizada para identificar y caracterizar morfológicamente y CTC credenciales en estudios de casos de pacientes con cáncer de mama, colorrectal, y pulmonar.

25 Kraeft *et al.*, 2004, identificaron células tumorales ocultas usando un sistema de imágenes de eventos raros en sangre periférica.

30 Aunque muchos enfoques de detección de CTC están actualmente en uso, se han identificados limitaciones significativas con los enfoques actuales. Por ejemplo, una limitación significativa de los métodos de selección positiva para enumerar/caracterizar las CTC es que la selección física positiva conduce invariablemente a pérdida de CTC y es menos de un 100 % eficaz. Por tanto, la cantidad de CTC detectadas por muestra usando métodos actuales a menudo es demasiado baja para proporcionar una robusta interpretación o un contenido clínicamente significativo de una muestra particular. Limitaciones adicionales de los métodos actuales incluyen baja detección de CTC debido a la heterogeneidad de las CTC. Por ejemplo, las diferencias en las características individuales de CTC dentro de la población de CTC de interés obstaculiza adicionalmente la cantidad de CTC detectadas usando metodologías actuales. Dichas diferencias pueden incluir variaciones de tamaño entre CTC individuales, y expresión variable o regulada negativamente entre CTC individuales de los marcadores de superficie celular usados para detectar CTC. Una limitación adicional de las metodologías existentes incluye limitaciones en los niveles de pureza y pureza variable. Cualquier enriquecimiento tendrá una cierta cantidad de falsos positivos, por ejemplo otras células sanguíneas nucleadas que se adhieren al enriquecimiento. Por ejemplo, el imán Veridex tiene típicamente de 5.000 a 10.000 falsos positivos sobre los 5 a 10 positivos.

40 Sumario de la invención

45 El asunto para el cual se busca protección es como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un método para detectar con alta definición una célula tumoral en circulación como se define en la reivindicación 1.

La presente invención se base en parte en el descubrimiento de métodos innovadores para analizar muestras para detectar, enumerar y caracterizar células raras, tales como CTC.

50 Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para una detección y caracterización mejorada permitiendo un análisis clínicamente significativo de muestras para su uso en entornos clínicos, de investigación y desarrollo.

55 Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para la detección y caracterización mejorada de HD-CTC en una muestra utilizando datos de no CTC (células presentes a una concentración de 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1.000, 5.000, 10.000 veces o más en comparación con la célula rara) en la muestra. Por tanto, el método de la invención utiliza medidas de similitud para evaluar la no similitud de células, que requiere tanto la exclusión de la distancia más grande, por ejemplo, eventos que están claramente relacionados con no CTC así como la fina distinción de un punto de corte basado en similitudes de no CTC adyacentes.

60 El método incluye proporcionar una muestra sospechosa de tener al menos una CTC y al menos una no CTC que está presente a una concentración que es al menos 10 veces la de la CTC; poner en contacto la muestra con más de un agente detectable donde los agentes detectables se unen a un marcador celular y son un marcador positivo y un marcador negativo donde el marcador positivo es citoqueratina o EpCAM y/o el marcador negativo es CD45 y opcionalmente un marcador nuclear y/o marcador de contenido; realizar imágenes celulares sobre la muestra para generar una imagen; y detectar las HD-CTC en comparación con otras células en la muestra analizando la célula de

la imagen, detectando de ese modo la HD-CTC en la muestra. En diversas realizaciones de la invención, el método incluye adicionalmente sembrar en placa la CTC sospechosa y al menos una no CTC en un soporte sólido, tal como un portaobjetos, para facilitar el contacto de las células con el agente detectable y la formación de imágenes celulares. En diversas realizaciones de la invención, el agente detectable es cualquier agente usado para teñir las células, tal como un portaobjetos, para facilitar el contacto de las células con el agente detectable y la formación de imágenes celulares. En diversas realizaciones de la invención, el agente detectable es cualquier agente usado para teñir las células, tal como un agente que se une a un marcador celular incluyendo, aunque sin limitación, un marcador positivo, un marcador negativo, un marcador nuclear, un marcador de contenido, o cualquier combinación de los mismos.

En diversas realizaciones de la invención, los métodos descritos en este documento se realizan en un aparato para imágenes para formar imágenes de forma eficaz de un portaobjetos que contiene una señal detectable, tal como una señal fluorescente. El aparato puede incluir típicamente un ordenador que tiene al menos un procesador de sistema con capacidad de procesamiento de imágenes, un monitor de ordenador, un dispositivo de entrada, un suministro de energía y un subsistema de microscopio. Por tanto, el aparato incluye un ordenador que tiene un código ejecutable para realizar los diversos análisis requeridos para poner en práctica la invención. El subsistema de microscopía incluye una serie de detección óptica para adquirir imágenes. Una plataforma de movimiento bidimensional para el movimiento de muestras y para el ajuste del enfoque, y mecanismos de entrada y salida para múltiples análisis de muestra y almacenamiento. El aparato también puede incluir una fuente de luz transmitida así como una fuente de luz de iluminación/excitación fluorescente para muestras con fluorescencia.

En una realización de la invención, el método incluye establecer lo límites óptimos de exposición para realizar las imágenes celulares que facilitan la detección de HD-CTC presentes. En una realización, el límite de exposición para el agente detectable se determina usando una señal procedente de al menos una no CTC. En diversos aspectos, los marcadores detectables de la invención son un marcador positivo y un marcador negativo, opcionalmente un marcador nuclear y/o marcador de contenido. En una realización relacionada, los límites de exposición pueden establecerse usando datos respecto a las células y/o HD-CTC sospechosas reunidos a partir de una primera imagen, para volver a realizar imágenes del portaobjetos.

En otra realización, el método incluye minimizar los ajustes de exposición para minimizar el tiempo de recogida de datos y maximizar el rendimiento para facilitar la detección de HD-CTC.

En otra realización, el método incluye utilizar datos asociados con no CTC para generar un parámetro de control de calidad que facilite la detección de HD-CTC. En diversas realizaciones, el parámetro de control de calidad es la distribución de al menos una no CTC en el portaobjetos, la alineación de múltiples imágenes celulares mediante alineación de marcadores no CTC, la calidad de la tinción celular, la distribución de un marcador positivo en todas las células no CTC, o la pérdida de células a partir del procesamiento repetido.

En otra realización, el método incluye determinar límites de corte de intensidad para minimizar los falsos negativos, así como los falsos positivos y para facilitar la detección de HD-CTC. En una realización, el agente detectable es un marcador positivo y los límites de intensidad se determinan usando la media, desviación típica, coeficiente de variación, otros parámetros estadísticos o cualquier combinación de los mismos, para una señal de fondo del marcador positivo. En otra realización, el agente detectable es un marcador positivo y los límites de intensidad se determinan dentro de una única imagen, o partes de esa imagen, identificando el evento de señal más alta a partir de un marcador positivo y comprando la señal más alta con la media y desviación típica calculadas a partir de las señales de todos, o un subconjunto de eventos. En otra realización más, el agente detectable es un marcador negativo y el límite de intensidad para el marcador negativo se determina usando la media y desviación típica de señales de los marcadores negativos de no CTC (todas las no CTC o un subconjunto específico).

En otra realización, se utilizan características citológicas de las no CTC tales como tamaño celular y nuclear (absoluto y relativo; global y aparente) y distribución, para facilitar la detección de no CTC.

En otra realización, el método incluye utilizar datos asociados con no CTC para enumerar las CTC, facilitando de este modo su detección. En diversas realizaciones, los datos pueden incluir, aunque sin limitación, la intensidad total, la intensidad media, la intensidad segmentada, circunferencia fija, circunferencia variable, o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, el método incluye la determinación del nivel de expresión de un marcador de contenido en células raras y no CTC para facilitar la detección de CTC.

Por tanto, en otra realización, la invención proporciona un método para diagnosticar o pronosticar el cáncer en un sujeto. El método incluye realizar el método de detección y caracterización mejorada de HD-CTC como se describe en este documento y analizar las CTC detectadas y proporcionar un diagnóstico o pronóstico basado en el análisis de las CTC, diagnosticando o pronosticando de ese modo el cáncer en un sujeto.

En otra realización, la invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un régimen terapéutico. El método incluye realizar el método de detección y caracterización mejorada de HC-CTC como se describe en este documento y analizar las CTC, determinando de ese modo la sensibilidad del sujeto a un régimen terapéutico.

5 En otra realización, la invención proporciona un método para determinar un sujeto candidato para un ensayo clínico. El método incluye realizar el método de detección y caracterización mejorada de HD-CTC como se describe en este documento y analizar las CTC, determinando de ese modo a un sujeto candidato para un ensayo clínico.

10 Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es una representación gráfica de la media de las SKBR3 observadas representada frente a las SKBR3 esperadas. Se realizaron adiciones en cuatro alícuotas de sangre de control normal con cantidades variables de células SKBR2 para producir 4 portaobjetos con aproximadamente 10, 30, 100, y 300 células cancerosas por portaobjetos. La media cada cuadruplicado se presenta así como las barras de error que indican la desviación típica.

20 La Figura 2 es una representación pictórica de una galería de una subpoblación representativa de CTC encontradas en pacientes con cáncer. Cada CTC de la subpoblación es positiva a citoqueratina, negativa a CD45, contiene un núcleo DAPI, y es morfológicamente distinta de los glóbulos blancos adyacentes que son de forma circular.

25 La Figura 3 es una representación gráfica que compara los recuentos de CTC entre dos procesadores diferentes sobre 9 diferentes muestras de pacientes con cáncer. Los recuentos de CTC/ml variaron de 0 a 203.

30 La Figura 4 es una representación gráfica que incluye cuatro gráficos que representan los niveles de CTC y PSA de extracciones de sangre en serie de cuatro pacientes diferentes con cáncer de próstata durante un periodo de tiempo de tres meses. Dos pacientes tenían niveles crecientes de CTC y PSA y dos pacientes tenían niveles decrecientes/estables de CTC y PSA. Los niveles de PSA aumentaron en pacientes que tenían recuentos crecientes de CTC y disminuidos en pacientes que tenían recuentos decrecientes/estables de CTC.

35 La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la tasa de incidencia de una supuesta población de células raras entre pacientes respecto a una subpoblación de CTC (HD-CTC).

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método que omite los métodos físicos para enriquecimiento positivo de células raras, tales como CTC, a partir de una población mixta, minimizando de ese modo la pérdida de células raras. Esta metodología permite adicionalmente la captura/identificación de subconjuntos de poblaciones celulares, tales como subpoblaciones de CTC u otras poblaciones raras mediante la detección de los mismos diferentes marcadores usando diferentes parámetros, tales como valores de punto de corte, que permiten distinguir entre eventos y no eventos. Por ejemplo, como se analiza en detalle en este documento, pueden utilizarse diferentes puntos de corte para caracterizar diferentes subpoblaciones celulares.

45 Aunque la descripción pone de relieve las CTC y las subpoblaciones de las mismas, pueden usarse las mismas metodologías para encontrar cualquier otro tipo de célula rara en un fondo de células no raras. Como se usa en este documento, una "célula rara" pretende incluir una célula que es 1) de un tipo celular que es menos de aproximadamente el 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 %, o 0,001 % de la población total de células nucleadas en una muestra de fluido, o 2) de un tipo celular que está presente a menos de un millón de células por mililitro de muestra de fluido. Las células raras ejemplares incluyen, aunque sin limitación, CTC, células endoteliales en circulación (CEC), glóbulos blancos en émbolos, células madre cancerosas, células activadas o infectadas, tales como células sanguíneas activadas o infectadas, y células fetales.

50 Por consiguiente, un experto en la técnica entenderá que referencia a CTC en toda la memoria descriptiva incluyen referencias a células raras y viceversa.

55 El presente método permite la identificación de HD-CTC a partir del fondo de otras células sanguíneas usando microscopía, citometría, automatización, y computación. La presente invención utiliza estos componentes, de forma individual o colectiva, para identificar HD-CTC. Los beneficios incluyen la capacidad de encontrar más células raras, de presentarlas en un modo que posibilite análisis posteriores para marcadores de contenido, y hacerlo de un modo eficaz en cuanto a tiempo y recursos.

60 Además, la presente descripción se basa en parte en un ensayo de siguiente generación capaz de identificar subpoblaciones de CTC en pacientes con cáncer. Una subpoblación particular identificada fue a partir de una pequeña cohorte de pacientes con cáncer. Además de usar parámetros específicos que definen subpoblaciones de CTC, tales como una mencionada en este documento como la subpoblación CTC de alta definición (HD-CTC), el

ensayo produce mayor sensibilidad con un volumen más pequeño de sangre que los esfuerzos previos. Los aspectos innovadores clave de este ensayo están dirigidos por la necesidad de simplicidad y procesamiento mínimo de la muestra de sangre así como la necesidad de posibilitar interpretación profesional con imágenes de gran calidad diagnóstica.

5 El enfoque usado para identificar una población de células raras, tales como CTC, o subpoblación de la misma, es distinta porque no depende de ninguna estrategia de enriquecimiento de proteínas individuales. Se forman imágenes de todas las células sanguíneas nucleadas en múltiples colores para localizar y evaluar morfológicamente los eventos raros. Esta estrategia sin enriquecimiento produce un ensayo con capacidad de "especificidad/sensibilidad ajustable" que permite alta sensibilidad y alta especificidad posibilitando aún al mismo tiempo el estudio de una población de células raras que sabe que es heterogénea. Una ventaja clave y diferencia para el enriquecimiento físico es que se puede "ajustar" el resultado, mientras que el enriquecimiento físico es "si" o "no". Otra ventaja clave de este enfoque es que pueden perseguirse uno o múltiples parámetros de análisis para identificar y caracterizar poblaciones específicas de interés.

15 Antes de describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que esta invención no está limitada a composiciones, métodos y condiciones experimentales particulares descritas, ya que dichas composiciones, métodos, y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es con fines descriptivos de realizaciones particulares solamente, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente en las reivindicaciones adjuntas.

20 Como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en este documento que llegarán a ser evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de esta descripción y similares.

25 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

30 En general, referencias a "una célula tumoral en circulación" pretenden hacer referencia a una única célula, aunque referencias a "células tumorales en circulación" o "grupo de células tumorales en circulación" pretenden hacer referencia a más de una célula. Sin embargo, un experto en la materia entendería que referencias a "células tumorales en circulación" pretenden incluir una población de células tumorales en circulación que incluye una o más células tumorales en circulación.

35 La expresión "célula tumoral en circulación" (CTC) o "grupo" de CTC pretende indicar cualquier célula cancerosa o grupo de células cancerosas que se encuentre en una muestra del sujeto. Típicamente las CTC se han exfoliado de un tumor sólido. Por tanto, las CTC a menudo son células epiteliales desprendidas de tumores sólidos encontradas en concentraciones muy bajas en la circulación de pacientes con cánceres avanzados. Las CTC también son mesoteliales de sarcomas y melanocitos procedentes de melanomas. Las CTC también pueden ser células originadas a partir de un tumor primario, secundario, o terciario. Las CTC también pueden ser células madre cancerosas en circulación. Aunque la expresión "célula tumoral en circulación" (CTC) o "grupo" de CTC incluye células cancerosas, también pretende incluir células no tumorales que no se encuentran habitualmente en la circulación, por ejemplo, células epiteliales o endoteliales en circulación. Por consiguiente, las células tumorales y células epiteliales no tumorales están abarcadas dentro de la definición de CTC.

40 El término "cáncer" como se usa en este documento, incluye una diversidad de tipos de cáncer que son bien conocidos en la técnica, incluyendo aunque sin limitación, displasias, hiperplasias, tumores sólidos y cánceres hematopoyéticos. Muchos tipos de cánceres son conocidos por metastatizar y desprender células tumorales en circulación o ser metastáticos, por ejemplo, un cáncer secundario resultante de un cáncer primario que a metastatizado. Los cánceres adicionales pueden incluir, aunque sin limitación, los siguientes órganos o sistemas: cerebro, corazón, pulmón, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, hígado, hueso, sistema nervioso, ginecológico, hematológico, piel, mama, y glándulas suprarrenales. Los tipos adicionales de células cancerosas incluyen gliomas (Schwannoma, glioblastoma, astrocitoma), neuroblastoma, feocromocitoma, paraganglioma, meningioma, carcinoma adrenocortical, meduloblastoma, rabdomyosarcoma, cáncer renal, cáncer vascular de diversos tipos, osteocarcinoma osteoblástico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, leiomiomas uterinos, cáncer de glándula salival, carcinoma del plexo coroide, cáncer mamario, cáncer pancreático, cáncer de colon, y leucemia megacarioblástica; y cánceres de piel incluyendo melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, lunares de nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, sarcomas tales como fibrosarcoma o hemangiosarcoma, y melanoma.

50 Usando los métodos descritos en este documento, pueden detectarse HD-CTC y caracterizarse a partir de cualquier tipo de muestra. Como se usa en este documento, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra adecuada para los métodos proporcionados por la presente invención. La muestra puede ser cualquier muestra que incluya

células raras adecuadas para detección. Las fuentes de muestras incluyen sangre completa, médula ósea, fluido pleural, fluido peritoneal, fluido cefalorraquídeo central, orina, saliva y lavados bronquiales. La muestra puede ser una muestra de sangre, incluyendo, por ejemplo, sangre completa o cualquier fracción o componente de la misma. Una muestra de sangre, adecuada para su uso con la presente invención puede extraerse de cualquier fuente conocida que incluya células sanguíneas o componentes de las mismas, tales como venosa, arterial, periférica, tisular, de cordón umbilical, y similares. Por ejemplo, una muestra puede obtenerse y procesarse usando métodos clínicos bien conocidos y rutinarios (por ejemplo, procedimientos para extraer y procesar sangre completa). Una muestra ejemplar puede ser sangre periférica extraída de un sujeto con cáncer.

La expresión "componente sanguíneo" pretende incluir cualquier componente de sangre completa, incluyendo glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, células endoteliales, células mesoteliales o células epiteliales. Los componentes sanguíneos también pueden incluir los componentes del plasma, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, o cualquier otra célula que pueda estar presente en la sangre, debido a embarazo, trasplante de órganos, infección, lesión, o enfermedad.

Como se usa en este documento, un "glóbulo blanco" es un leucocito, o una célula del linaje hematopoyético que no es un reticulocito o plaqueta. Los leucocitos pueden incluir células citolíticas naturales ("células AK") y linfocitos, tales como linfocitos B ("células B") o linfocitos T ("células T"). Los leucocitos también pueden incluir células fagocíticas, tales como monocitos, macrófagos, y granulocitos, incluyendo basófilos, eosinófilos y neutrófilos. Los leucocitos también pueden comprender mastocitos.

Como se usa en este documento, un "glóbulo rojo" o "RBC" es un eritrocito. Salvo que se denomine un "glóbulo rojo nucleado" ("nRBC") o "glóbulo rojo nucleado fetal", como se usa en este documento, "glóbulo rojo" se usa para indicar un glóbulo rojo no nucleado.

La presente invención proporciona un método por el cual puede ensayarse o examinarse una muestra biológica de muchos modos diferentes para detectar y caracterizar HD-CTC. Una muestra puede teñirse o marcarse con uno o más marcadores detectables y examinarse por microscopia fluorescente y/o microscopia óptica. A diferencia de los esquemas convencionales de enriquecimiento cuyo objetivo es eliminar las células no raras o no CTC de la evaluación, la presente invención depende de las no CTC presentes en la muestra para ayudar a la identificación y caracterización de las CTC. En el método actualmente descrito de no enriquecimiento, la muestra (por ejemplo, sangre u otro fluido corporal, incluyendo orina, fluido peritoneal, pleural, saliva, cefalorraquídeo, y similares) se procesa mínimamente, y las células raras, tales como CTC no se separan de otras células nucleadas (por ejemplo, no raras o no CTC).

Como se usa en este documento, las expresiones "célula no rara" y "células no raras", se refieren en líneas generales a cualquier célula que no sea una célula rara como se define en este documento. Asimismo, como se usa en este documento, las expresiones "célula no CTC" y "células no CTC", se refieren en líneas generales a cualquier célula que no sea una CTC como se define en este documento. Las células no raras y no CTC pueden incluir células nucleadas o enucleadas, tales como, en el caso de sangre, glóbulos blancos (también llamados leucocitos) incluyendo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, y monocitos; glóbulos rojos (también conocidos como eritrocitos); y plaquetas.

En el caso de sangre, aunque las CTC pueden no separarse de otras células nucleadas, los glóbulos rojos, que son típicamente los únicos nucleados encontrados en la sangre de recién nacidos, se retiran de la muestra antes de sembrar en placa. Esto se realiza habitualmente lisando los glóbulos rojos, aunque varios enfoques alternativos son bien conocidos en la bibliografía y pueden utilizarse con los presentes métodos, por ejemplo, eliminación de las células por filtración o centrifugación en gradiente de densidad. Después de retirar los glóbulos rojos, las células restantes pueden procesarse por centrifugación, resuspensión, y siembra en placa de las células en un soporte sólido que puede usarse en la formación de imágenes celulares.

Son bien conocidos en la técnica una diversidad de soportes sólidos e incluyen portaobjetos que pueden tratarse para promover la adhesión celular a la superficie del portaobjetos. El portaobjetos puede estar construido a partir de una diversidad de materiales suficientes para proporcionar un soporte para realizar un ensayo biológico. En un aspecto ejemplar, el soporte está compuesto de un material que puede recubrirse con un compuesto que promueve la interacción electrostática de material biológico con el soporte. Son bien conocidos en la técnica una diversidad de materiales de sustrato y son adecuados para su uso con la presente invención. Dichos materiales pueden incluir uno o más de vidrio; organoplásticos tales como policarbonato y polimetilmetacrilato, poliolefinas; poliamidas; poliésteres; siliconas; poliuretanos; epoxis; acrílicos; poliacrilatos; poliésteres; polisulfonas; polimetacrilatos; policarbonato; PEEK; poliimida; poliestireno; y fluoropolímeros. En un aspecto ejemplar, el portaobjetos se fabrica a partir de vidrio o plástico e incluye uno o más recubrimientos de interacción biológica.

Los portaobjetos pueden incluir una o más áreas activas definidas sobre la superficie de los mismos. Un campo activo, como se usa en este documento, pretende incluir áreas en que el portaobjetos se ha tratado química o eléctricamente, tal como con un recubrimiento de interacción biológica, por ejemplo para promover la adhesión de las células al portaobjetos. Por ejemplo, el portaobjetos puede tratarse de modo que la superficie esté positivamente

cargada lo que permite que las células se anclen a la superficie a través de la adhesión electrostática de una célula cargada negativamente. El portaobjetos puede incluir de 1 a cualquier cantidad de áreas activas dependiendo del tamaño del portaobjetos y la aplicación pretendida. En diversos aspectos, el portaobjetos incluye una única área activa.

5 La cantidad total de células raras o CTC que se adhieren a un portaobjetos dado depende, en parte, del volumen inicial de la muestra. En diversos aspectos, puede usarse un amplio intervalo de volúmenes iniciales de muestra para poner en práctica el presente método y proporcionar resultados clínicamente significativos. Por tanto, el volumen inicial de muestra puede ser menor de aproximadamente 1 μ l, 2 μ l, 2.5 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 7.5 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 12.5 μ l, 15 μ l, 17.5 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 125 μ l, 150 μ l, 175 μ l, 200 μ l, 225 μ l, 250 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 750 μ l, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml o más de aproximadamente 10 ml. En un aspecto ejemplar, el volumen inicial de muestra está entre aproximadamente 200 y 500 μ l, 200 y 1000 μ l, de 1000 a 2000 μ l, de 1000 a 3000 μ l o de 1000 a 5000 μ l. En otro aspecto ejemplar, una muestra procesada como se describe en este documento incluye más de aproximadamente 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o incluso 1000 células raras o CTC.

Después de adherir las células mínimamente procesadas a un soporte sólido, por ejemplo por siembra de las células en un portaobjetos, las células se ponen en contacto con uno o más marcadores detectables para facilitar la formación de imágenes celulares mediante el examen de las células por microscopia fluorescente y/o microscopia óptica. En general, los marcadores detectables incluyen una diversidad de agentes útiles para detectar y caracterizar el fenómeno celular. Por ejemplo, los marcadores detectables pueden incluir agentes tales como polinucleótidos, polipéptidos, moléculas pequeñas, y/o anticuerpos que se unen específicamente a un marcador presente en una muestra y que están marcados de modo que el agente sea detectable cuando se une o hibrida con su marcador o ligando diana. Por ejemplo, los marcadores detectables pueden incluir marcadores enzimáticos, fluorescentes, o radionúclidos. También son conocidos en la técnica medios indicadores y marcadores adicionales.

Un marcador puede ser cualquier componente celular presente en una muestra que sea identificable por técnicas microscópicas, histológicas, o de biología molecular conocidas. Los marcadores pueden usarse, por ejemplo, para detectar y caracterizar células raras, incluyendo CTC, y distinguir células raras de células no raras o no CTC. En general un marcador puede ser, por ejemplo, una molécula presente sobre una superficie celular, una proteína diana sobreexpresada, una mutación de ácido nucleico o una característica morfológica de una célula presente en una muestra. Por tanto, los marcadores pueden incluir cualquier componente celular que pueda detectarse dentro o sobre la superficie de una célula, o una macromolécula unida o agregada a la superficie de la célula. Por tanto, los marcadores no están limitados a marcadores físicamente sobre la superficie de una célula. Por ejemplo, los marcadores pueden incluir, aunque sin limitación, antígenos de superficie, receptores o co-receptores transmembrana, macromoléculas unidas a la superficie, tales como proteínas o carbohidratos unidos o agregados, componentes celulares internos, tales como componentes citoplasmáticos o nucleares, y similares. Un marcador también puede incluir un componente sanguíneo que se une preferentemente a tipos celulares específicos, tales como plaquetas o fibrina.

En un aspecto, un marcador detectable puede ser un anticuerpo marcado de forma detectable. Los anticuerpos útiles en los métodos de la invención incluyen anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, así como cualquier fragmento de los mismos, tales como Fab y F(ab')₂, así como combinaciones de dichos anticuerpos o fragmentos. Los métodos para generar anticuerpos marcados de forma fluorescente son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, pueden unirse moléculas fluorescentes a una inmunoglobulina de forma directa o indirecta usando un grupo funcional intermedio. En aspectos relacionados, un marcador detectable puede ser una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido o polinucleótido). Por ejemplo, las técnicas de hibridación *in situ* de ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica y pueden usarse para identificar un marcador de ARN o ADN presente en una muestra o submuestra (por ejemplo, célula individual).

En diversos aspectos de la invención, los marcadores detectables usados para teñir las células incluyen uno o más marcadores detectables que son específicos de tejido y por tanto se usan como marcador positivo para un tipo específico de célula y/o tejido. Como se usa en este documento, un "marcador positivo" es un marcador detectable que se une específicamente a una célula rara tal como una CTC, pero no a una célula no rara o no CTC. El marcador positivo es marcador de citoqueratina y/o EpCAM que se une específicamente a células epiteliales.

Como se usa en este documento un "marcador positivo" también puede ser un marcador detectable que se une específicamente a subpoblaciones de células raras o CTC, pero no todas las células raras o CTC de una población. Por ejemplo, un "marcador positivo" puede unirse específicamente a HD-CTC, pero no todas las CTC.

En diversos aspectos de la invención, los marcadores detectables usados para teñir las células incluyen uno o más marcadores detectables que se unen específicamente a células no raras o no CTC y pueden usarse como selector negativo. Como se usa en este documento un "marcador negativo" es un marcador detectable que se une específicamente a células no raras o no CTC y es un selector negativo. El marcador negativo es CD45, que se une preferentemente a WBC. Existen otros marcadores detectables o combinaciones de marcadores detectables que se unen a las diversas subpoblaciones de WBC. Éstos pueden usarse en diversas combinaciones, incluyendo en

combinación con CD45. Como se usa en este documento un "marcador negativo" también puede ser un marcador detectable que se une específicamente a subpoblaciones de células no raras o no CTC y es un selector negativo.

5 Además de marcadores detectables positivos y negativos para identificar CTC, pueden usarse marcadores detectables adicionales para teñir células, que se unen específicamente al núcleo de la célula, permitiendo la diferenciación de células de material no celular. Como se usa en este documento, un "marcador nuclear" es un marcador detectable que se une a un componente nuclear de una célula y permite la diferenciación de células de material no celular. El marcador nuclear más común para su uso en la presente invención es DAPI.

10 En diversos aspectos de la invención, los marcadores detectables usados para teñir las células incluyen uno o más marcadores detectables mencionados en este documento como "marcadores de contenido". Los marcadores de contenido típicamente pueden incluir sondas oligonucleotídicas marcadas de forma detectable, tales como sondas FISH o sondas de inmunohistoquímica. En una realización, los marcadores de contenido se aplican al portaobjetos al mismo tiempo que los marcadores positivos y negativos, o se aplican al portaobjetos después de los marcadores positivos y negativos y después de la identificación de las células raras mediante imágenes. Los marcadores de contenido incluyen marcadores detectables dirigidos a EGFR, HER2, ERCC1, CXCR4, EpCAM, E-cadherina, mucina-1, Citoqueratina, PSA, PSMA, RRM1, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, IGF1, cMET, EML4, o receptor asociado a leucocitos (LAR). En algunos casos, un marcador de contenido también puede ser un marcador positivo.

20 La intensidad de señal a partir de un marcador positivo, o cualquier marcador, es detectable en una escala de intensidades, que basada en la metodología de la descripción, es muy cuantificable. La escala de intensidad permite una cuantificación enormemente mejorada y la clasificación de eventos detectables que posibilita una categorización adicional. Por ejemplo, una CTC que emite una señal de baja intensidad para citoqueratina puede ser una célula madre cancerosa; o el cambio en la cantidad de células de alta/baja intensidad de citoqueratina podría ser predictivo de respuesta o una lectura de respuesta (o curso de resistencia). Lo mismo es cierto para marcadores positivos, negativos y de contenido.

30 La presente invención utiliza marcadores detectables para facilitar la formación de imágenes celulares mediante el examen de las células por microscopía fluorescente y/o microscopía óptica. En una descripción las células mínimamente procesadas se tiñen con varios marcadores fluorescentes, y después se extraen imágenes usando un microscopio rápido automatizado. Típicamente, un portaobjetos preparado puede cargarse en un sistema automatizado o puede colocarse en un soporte de portaobjetos que aloja cualquier cantidad de portaobjetos adicionales. Los soportes de portaobjetos se cargan en un almacén de entrada del sistema automatizado. Un operario puede después introducir datos que identifican el tamaño, forma, y localización de un área de escaneo en cada portaobjetos o el sistema puede localizar automáticamente un área de escaneo para cada portaobjetos durante el procesamiento. Los parámetros de procesamiento del portaobjetos pueden identificarse por un código de barras presente en el portaobjetos o soporte de portaobjetos. En la activación del sistema, un soporte de portaobjetos está posicionado en una fase X - Y, el portaobjetos completo, o parte del mismo, se escanea rápidamente. Esto puede hacerse a aumento bajo o alto y puede repetirse a diversos niveles de aumento y/o para diversas regiones del portaobjetos. Las imágenes pueden almacenarse en un medio de apropiado de almacenamiento y analizarse usando un código ejecutable que es bien conocido en la técnica para realizar los diversos análisis analizados en este documento. Como se analiza en este documento, diversos parámetros pueden ajustarse durante todo el proceso de formación de imágenes para facilitar la detección de células raras, por ejemplo CTC, usando datos respecto a células no raras o no CTC, tales como límites de exposición y ajustes de intensidad.

50 Como se usa en este documento, los términos "imagen" e "imagen de la muestra" se refieren en líneas generales a una imagen, digital o de otro modo, de una muestra mínimamente procesada que incluye diversas células, tales como células raras y CTC. Típicamente, una imagen de la muestra es una imagen de todo o una parte de un portaobjetos de muestra que tiene células adheridas a su superficie y opcionalmente teñidas con uno o más marcadores detectables.

Una ventaja de la presente invención, que permite especificidad/sensibilidad ajustable y se centra la reducción y el análisis de datos en lugar del enriquecimiento, es que se espera procesamiento mínimo para minimizar el sesgo. En técnicas alternativas que requieren enriquecimiento, las células raras se pierden invariablemente en el proceso. Específicamente, en el uso de inmunocaptura o filtración por tamaño para distinguir entre WBC y CTC, una variación en la expresión del antígeno abordado en el caso de inmunocaptura o una variación en el tamaño diferencial entre las WBC y CTC causa que algunas CTC se pierdan durante la fase de enriquecimiento. Esto puede conducir a (i) recuentos imprecisos de CTC; (ii) demasiado pocas CTC para caracterización corriente abajo o análisis de contenido; y (iii) la creación de un sesgo de selección ya que algunos tipos de CTC se pierden preferentemente en base a tu tipo de variación.

65 El desafío con el enfoque de procesamiento mínimo es que es difícil encontrar las células raras de baja frecuencia o CTC en el fondo de las células no raras o no CTC. La frecuencia baja puede ser 1 célula rara o CTC:1.000 células no raras o no CTC, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000, e incluso 1:10.000.000, o cualquier sitio entre esas proporciones. Lo que complica la capacidad de encontrar y caracterizar las células raras es que los marcadores

positivos y negativos, aunque muy selectivos, no son perfectos y producen falsos positivos o falsos negativos. En otras palabras, es común obtener alguna tinción de fondo de los marcadores negativos en las células raras y/o alguna tinción de fondo de los marcadores positivos en las células no raras. Aunque se usa optimización del ensayo para minimizar esta tinción de fondo, es complicado eliminar completamente el fenómeno con optimización del ensayo.

Como se ha mencionado previamente, la mayoría de los demás enfoques para encontrar células raras intentan retirar las células no raras. La presente invención usa las no CTC para ayudar a encontrar y caracterizar las HD-CTC. Los numerosos modos en que las células no raras y no CTC pueden analizarse se analizan a través de la descripción. En toda esta descripción, las células no raras o no CTC típicamente se mencionan como un único grupo y pueden analizarse usando los métodos descritos en este documento tal cual. Sin embargo, la invención también reconoce que las células no raras pueden contener diversos subgrupos concretos. Por ejemplo, en el caso de CTC, los diversos subgrupos concretos pueden incluir neutrófilos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y basófilos, y células en estados variables tales como diversos estados de apoptosis o división celular, que pueden distinguirse usando los métodos descritos en este documento por tamaño, forma, características nucleares, y patrón de tinción. En algunas realizaciones de la invención, puede ser útil usar uno de estos subgrupos para ayudar a encontrar HD-CTC, en lugar de usar el grupo completo. El uso de células no raras o no CTC en la presente invención no pretende limitar la invención a usar solamente el grupo completo cuando puede ser apropiado en algunas de las realizaciones usar únicamente uno o más de los subgrupos.

Un aspecto propicio de esta invención es que la frecuencia baja de las células raras o CTC respecto a células no raras o no CTC permite tratar la mayoría de las células como células no raras o no CTC incluso si no se han identificado definitivamente como tales. La frecuencia baja de las células raras y CTC permite ignorar dichas células y asumir que las células son células no raras o no CTC para derivar la métrica de control de calidad, punto de corte, normalización, y calibración. Como las células raras están en baja abundancia, si estas métricas tienen que afinarse teniendo en consideración la población de células raras, pueden utilizarse técnicas atípicas de eliminación. Las técnicas atípicas de eliminación aseguran matemáticamente que la población de células raras no factorice en las métricas.

Como se analiza en este documento, la metodología descrita permite la detección, enumeración y caracterización de poblaciones de HD-CTC. La tecnología utiliza datos de células no raras en la muestra para identificar y caracterizar células raras aplicando parámetros definidos que pertenecen a límites de exposición, ajustes de exposición, control de calidad, límites de punto de corte de intensidad, calibración de tamaño y forma de célula, enumeración de células y evaluación del contenido, cada uno de los cuales se analiza adicionalmente a su vez. En diversos aspectos, el ensayo permite la revisión citomorfológica simultánea de imágenes fluorescentes con imágenes de canales individuales, mejorada con la anotación célula por célula con datos auxiliares semicuantitativos respecto al tamaño e intensidad fluorescente de objetos tanto absolutos como relativos a las células no raras o candidatos a células no raras, por ejemplo, no CTC o candidatos a no CTC, procedentes del experimento completo o el entorno local.

40 Establecimiento de los límites de exposición

Aunque debe minimizarse la variación a través de optimización del ensayo y normalización de los instrumentos, es común la variación en la tinción de los marcadores, de un portaobjetos a otro, de un lote a otro, de un operario a otro, y de un día a otro. Por tanto la selección de la exposición correcta para un portaobjetos particular no es trivial, ya que un ajuste demasiado bajo o demasiado alto causará que se pierda información. Aunque los enfoques convencionales funcionan para aquellos marcadores que son habituales en la mayoría de los eventos en el portaobjetos, es complicado para aquellos que son específicos para células raras o CTC. Dentro del intervalo dinámico del sistema de imágenes, la señal en las células raras o CTC y el fondo en células no raras o no CTC es proporcional al tiempo de exposición. Pero el ruido que es variación aleatoria tanto en la señal como en el fondo causado por la electrónica en el sistema de imágenes disminuye cuando aumenta la exposición. De forma ideal, la exposición de ajustarse para maximizar la señal sin saturar el sistema de imágenes. Pero esto es inviable debido al impacto sobre el tiempo de recogida de datos. Como una célula rara o CTC está presente en una frecuencia muy baja, es improbable que una célula rara o CTC se encuentre en una cantidad pequeña de imágenes de la muestra, lo que evita el uso de las imágenes de la muestra para ajustar la exposición para el marcador positivo. Para complicar esto más, existe una variación natural en la expresión de y tinción de marcadores tanto positivos como negativos para sus células diana. Una pequeña cantidad de imágenes de la muestra para ajustar la exposición puede no capturar esta variación natural en las células raras o CTC diana.

En una realización de esta invención, la señal procedente de las no CTC se utiliza para ajustar el límite de exposición para el marcador positivo. Esto es algo contradictorio ya que la célula no rara o no CTC no es la diana de elección para el marcador positivo. Sin embargo, en esta realización, la exposición se ajusta de modo que se observe una señal visible pero baja a partir de la no CTC en las imágenes de la muestra que se originan a partir de fuentes fluorescentes tales como tinción no específica, autofluorescencia y propiedades del sistema óptico. En imágenes de campo claro, el marcador nuclear y el marcador negativo pueden usarse para identificar la no CTC en las imágenes de la muestra. La señal baja es una señal celular distinguible en la no CTC en comparación con las áreas no celulares en las imágenes de la muestra. Este proceso proporciona un método para ajustar la exposición

para el marcador positivo cuando la diana de esos marcadores está en baja frecuencia y también ayuda a maximizar la señal/fondo del marcador positivo, que son dos cosas que ayudan a encontrar las CTC minimizando aún al mismo tiempo el tiempo total requerido para recoger los datos. Este fenómeno es especialmente cierto cuando la señal es baja o tenue. Una vez que el fondo celular está por encima de forma estadísticamente significativa del fondo no celular, el tiempo de exposición para este marcador particular se optimiza para acelerar la recogida de datos. Toda la optimización posterior puede realizarse *in silico*. Una vez ajustada la exposición, el portaobjetos completo está listo para realizarle imágenes en ese ajuste.

Aunque la realización anterior facilita el ajuste de la exposición para el marcador positivo, las células no raras o no CTC también pueden usarse para ajustar la exposición para los marcadores negativos, marcadores nucleares y marcadores de contenido de un modo que es relevante para la interpretación clínica de células raras o CTC. En una realización, el marcador nuclear en la no CTC en las imágenes de la muestra se ajusta a un nivel que permite la evaluación del contenido nuclear de una célula, y en particular si la célula se clasifica como viva o muerta, lo que facilita los cálculos de relaciones viva:muerta para células por tipo celular. Estos niveles de exposición para el marcador nuclear para la no CTC serán satisfactorios para la misma evaluación del marcador nuclear para las CTC, en particular para distinguir la forma nuclear en células normales frente a malignas.

En otra realización, la exposición para el marcador negativo se ajusta a partir de las imágenes de la muestra observando la distribución de la señal desde ese marcador en la no CTC donde la exposición se elige para maximizar la proporción señal/fondo, especialmente en el límite bajo crítico del intervalo dinámico donde puede existir una señal débil para un marcador negativo en una CTC.

En otra realización, la exposición se ajusta a partir de la no CTC para el marcador de contenido. El ajuste de la señal para el marcador de contenido usando la no CTC en imágenes de la muestra dependerá del marcador de contenido específico. Por ejemplo, algunos marcadores de contenido pueden tener expresión relativamente elevada en las no CTC en comparación con las CTC, en cuyo caso se usaría la información procedente de las no CTC en las imágenes de la muestra para justar el límite superior para el marcador de contenido. Por el contrario, el marcador de contenido puede tener expresión relativamente baja en las no CTC en comparación con las CTC, en cuyo caso se usaría la información procedente de las células no raras o no CTC en las imágenes de la muestra para ajustar el límite inferior para el marcador de contenido.

Aunque las realizaciones anteriores usan las no CTC para ajustar los límites de exposición a partir de imágenes de la muestra para diversos marcadores antes de realizar las imágenes del portaobjetos para encontrar células raras o CTC, en otra realización se usa información de las no CTC y/o CTC de las imágenes tomadas durante el primer evento de toma de imágenes del portaobjetos completo para ajustar los límites de exposición cuando se vuelven a realizar imágenes de las áreas seleccionadas del portaobjetos. Se vuelven a tomar imágenes de las áreas seleccionadas por una diversidad de razones, incluyendo recogida de imágenes que están en enfoque óptimo o que están a un aumento mayor. En esta realización, la distribución de las señales para los diversos marcadores en las no CTC y las CTC por todo el portaobjetos completo puede usarse para calcular una mejor exposición que maximice la señal deseada o el intervalo dinámico deseado.

Minimización del ajuste de exposición para minimizar el tiempo de recogida de datos y maximizar el rendimiento

Como se ha descrito anteriormente, los ajustes de exposición pueden adaptarse para optimizar los parámetros de señal o señal:fondo. Sin embargo, en otra realización, los ajustes de exposición se adaptan con el objetivo de minimizar el tiempo de recogida de datos y maximizar el rendimiento. Por ejemplo, puede determinarse que se tardan 5 segundos de tiempo de exposición en utilizar completamente el intervalo dinámico de la cámara CCD pero solamente 500 milisegundos en obtener el fondo celular por encima del fondo no celular, ahorrando por tanto 10x de tiempo de recogida de datos. Por tanto los tiempos de exposición pueden optimizarse para una señal máxima (o señal:fondo) o para un tiempo mínimo.

Control de calidad

En otra realización, el uso de no CTC para ayudar en la identificación de HD-CTC también incluye su uso como parámetros de control de calidad. Como las no CTC están representadas en frecuencia mucho mayor y distribuidas por todo el portaobjetos, proporcionan un recurso disponible para evaluar la calidad del procesamiento y la formación de imágenes del portaobjetos, tanto respecto a un portaobjetos particular así como en todos los portaobjetos y todos los conjuntos de datos.

En una realización, la invención proporciona la observación de la distribución de las no CTC usando los marcadores nucleares para identificar las no CTC. En esta realización, el objetivo es encontrar células, no necesariamente para distinguir entre no CTC y CTC, y por tanto los marcadores positivos o negativos pueden no utilizarse para distinguir entre estas categorías; sin embargo, como la inmensa mayoría de las células son no CTC, la mayoría de las células utilizadas para determinar la distribución de las células en el portaobjetos son no CTC. La distribución de las células es importante desde un punto de vista de control de la calidad ya que la distribución deseada es una distribución uniforme de células con superposición mínima entre las células. Si existe una desviación sustancial a partir de esa

distribución ideal, puede elegirse rechazar el portaobjetos de procesamiento adicional. Aunque se usa un marcador nuclear en este ejemplo, sería suficiente cualquier método para identificar las células, incluyendo imágenes de campo claro y tinción convencional tal como Wright Giemsa.

5 En otra realización, la co-localización del marcador nuclear y el marcador negativo se usa como método de control de calidad para evaluar si la alineación de diferentes imágenes es satisfactoria. En esta realización, el marcador nuclear y el marcador negativo deben tener superposición significativa.

10 En otra realización, la proporción entre eventos de marcador negativo y los eventos de marcador nuclear es una medida de la eficacia de la tinción del marcador negativo, donde es deseable que la proporción sea mayor sin exceder de 12. Un marcador negativo deseable puede tener una proporción de 0,8, 0,9, 1,0 o 1,1. En otra realización, la distribución, incluyendo la media, desviación típica y coeficiente de variación (CV) del marcador negativo sobre la población de las células no raras o no CTC se usa como parámetro de control de calidad, donde la distribución del marcador negativo es coherente con los patrones esperados de distribución de experimentos pasados y/o coherente con la distribución de los patrones de expresión normal de WBC.

15 En otra realización, la distribución, incluyendo la media, desviación típica y CV del marcador positivo sobre la población de las no CTC se usa como un parámetro de control de calidad, donde la distribución del marcador positivo es coherente con los patrones esperados de distribución de experimentos pasados.

20 Aunque los métodos de control de calidad descritos anteriormente describen métodos para evaluar la calidad global del portaobjetos, pueden usarse los mismos métodos para evaluar una imagen o un grupo de imágenes. En algunos casos, los parámetros derivados de una imagen o un grupo de imágenes en una región pueden compararse con los mismos parámetros calculados sobre el portaobjetos completo. En otro caso, los parámetros de control de calidad descritos anteriormente pueden compararse a través de diferentes portaobjetos.

25 En otra realización, la pérdida de células puede calcularse a partir del portaobjetos durante el procesamiento comparando la proporción de los eventos de marcador nuclear o los eventos de marcador negativo a la cantidad conocida de no CTC colocada en el portaobjetos, donde la cantidad conocida de no CTC se deriva del recuento de WBC y el volumen usado en el experimento.

Ajuste de los límites de corte de intensidad para la detección de CTC (minimización de falsos negativos)

35 Como se ha mencionado anteriormente, los desafíos en este enfoque para la detección de células raras y CTC son 1) que la frecuencia relativa de células raras, tales como CTC, a células no raras o no CTC es baja; y 2) la tinción imperfecta de los marcadores positivos y negativos para CTC y no CTC respectivamente. Sin embargo, el presente método acepta esos desafíos y los convierte en ventajas. En una realización, la señal de fondo procedente de los marcadores positivos en las no CTC muy abundantes se usa para calcular la media, desviación típica y CV. Esas métricas se usan posteriormente para determinar los puntos de corte de detección para separar células raras, tales como CTC de no CTC. En un aspecto, el factor de 10 multiplicado por la desviación típica y añadido a la media para la señal del marcador positivo de no CTC, se usa como punto de corte para distinguir las CTC, donde se determina que las supuestas células raras o CTC tienen una señal de marcador positivo mayor que ese punto de corte. En otros aspectos, la métrica usa un factor de 5, 7,5, 12,5, 15, 7,5, 20 o más, o cualquier número entre esos números. El cálculo de la métrica puede ajustarse en una base de portaobjetos global. Como alternativa, puede ajustarse en una base de imagen o una base regional.

45 En otra realización, el punto de corte puede determinarse de forma dinámica dentro de cada imagen localizando una señal de los eventos superiores de marcador positivo, comparando después la señal con la desviación típica entre eventos adicionales de señal. En un aspecto ejemplar, el punto de corte puede determinarse de forma dinámica dentro de cada imagen localizando señales de los cinco eventos superiores de marcador positivo, comparando después esa señal con la desviación típica entre los siguientes cincuenta eventos de señal positiva. Los eventos de marcador positivo también pueden incluir múltiples marcadores positivos o la inclusión de marcadores positivos y la exclusión de eventos de marcador negativo. La cantidad 'cinco' podría variarse de 1 a 10 por campo de visión suponiendo un aumento 10x (es decir, suponiendo no más de 5 células raras o CTC por campo de visión o una concentración relativa de no más de 1 en 500). Este enfoque tiene la ventaja de ser completamente numérico y no estar basado en el análisis de forma. Se espera que reduzca de forma robusta y sustancial la cantidad de posibles eventos con riesgo mínimo de pérdida de eventos.

50 En otra realización, el punto de corte para la señal de marcador negativo se ajusta usando la media y desviación típica de las no CTC. En este caso, el punto de corte se deriva de un factor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 multiplicado por la desviación típica de la señal de marcador negativo para las no CTC y se resta de la señal media de marcador negativo. Las supuestas CTC tendrán una señal de marcador negativo por debajo de ese punto de corte. Como se ha descrito anteriormente, este punto de corte puede generarse de forma global usando la señal de todas las no CTC en el portaobjetos o en la imagen o a nivel regional usando la señal procedente solamente de las no CTC en esa imagen o esa región.

65

Calibración del tamaño y la forma

5 En otra realización de la invención, el tamaño celular y la distribución de los tamaños celulares para las no CTC medidos en el portaobjetos se comparan con los tamaños y distribuciones publicados para las WBC en la bibliografía. Además, la distribución puede corregirse para diferencian individuales del paciente usando recuento diferencial de los subgrupos de los WBC obtenidos de un contador automatizado de células. La proporción ratio entre el tamaño publicado y el tamaño calculado de las no CTC puede usarse después como un factor de corrección para determinar un tamaño preciso para las CTC multiplicando esa proporción por el tamaño de la CTC medido en el portaobjetos. La calibración permite la normalización y comparaciones entre portaobjetos y entre tubos de sangre y entre pacientes y entre indicaciones.

15 En otra realización, se compara uno o más del tamaño nuclear, la distribución del tamaño nuclear, y los patrones de contorno para las no CTC medidos en una imagen o portaobjetos con el tamaño nuclear y patrón de contorno de una supuesta CTC y se aplican los valores de punto de corte para clasificar esa supuesta CTC como una HD-CTC válida.

Enumeración

20 La información de células no raras o no CTC puede usarse para calcular de forma precisa la concentración de células raras o CTC en un fluido corporal. En un ejemplo de esta realización, se determina la proporción de CTC a CTC + no CTC totales (todos los eventos de marcador nuclear) y después se divide eso por el volumen del fluido corporal original usado para ese experimento, y finalmente se multiplica eso por la concentración original de las células en el fluido corporal. La última medición puede obtenerse a través del uso de un contador automatizado convencional de células (o citómetro).

25 Evaluación del contenido

30 Como se ha mencionado anteriormente, puede evaluarse el nivel de expresión de la célula rara o CTC de un marcador de contenido. Sin embargo, a causa de la variabilidad del portaobjetos causada por la variación de procesamiento y formación de imágenes, es difícil proporcionar parámetros universales para determinar el nivel de expresión. Para mitigar este desafío, se determina primero el nivel de expresión del marcador de contenido y su distribución en células no raras o no CTC en una población de pacientes. Después, para el paciente individual con cáncer, se determina el nivel de expresión del marcador de contenido en células raras o CTC y en células no raras o no CTC. La proporción del nivel de expresión entre células raras o CTC y células no raras o no CTC se convierte en una medida relativa que normaliza la variación de un portaobjetos a otro. Además, multiplicando esa proporción por la media del nivel de expresión de células no raras o no CTC a partir de la población de control se proporciona un valor absoluto para la expresión de la célula rara o CTC corregido para la variación de un portaobjetos a otro.

40 La forma y tamaño nuclear es una potencial fuente rica de información. Se espera que dé información detallada acerca del tipo de célula en el caso de una célula sanguínea y acerca del estado de la célula en el caso de una célula rara o CTC. Por ejemplo, la forma nuclear podría dar una idea de la naturaleza maligna de la célula, podría dar una idea del estado de viabilidad celular y/o ciclo celular. Por ejemplo, un paciente que está experimentando una quimioterapia satisfactoria podría observar un repunte en las CTC pero la interpretación nuclear podría mostrar que estas CTC son no viables/apoptóticas.

45 Otra oportunidad potencial para usar el tamaño y forma nuclear sería similar a los análisis FACS usando la dispersión directa y la dispersión lateral como modos para caracterizar las células. Puede ser posible reunir suficiente información detallada acerca del núcleo y otros componentes celulares para recapitular la información de dispersión directa y lateral a partir de FACS.

50 En diversas realizaciones de la invención, puede utilizarse un único parámetro o combinación de parámetros para realizar el ensayo dependiendo, en parte, de los datos a determinar y la población de células raras que se está investigando. Además, pueden identificarse subpoblaciones de poblaciones específicas de células raras usando la metodología descrita. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 1, pueden identificarse subpoblaciones de CTC y diferenciarse definiendo adicionalmente parámetros específicos de ensayo. El Ejemplo describe la identificación y clasificación de una subpoblación de CDC mencionada como HD-CTC.

60 En la invención, mediante la definición adicional de parámetros del ensayo descrito, se estableció una clasificación estricta de las HD-CTC. Si el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que la subpoblación HD-CTC clasificada en este documento, incluye CTC que muestran el potencial mayor de convertirse en una célula tumoral intacta. Todas las demás CTC cumplen parcialmente los parámetros definidos pero carecen de uno o más de los estrictos criterios de inclusión. Las no HD-CTC son CTC que pueden ser menos fiables en la evaluación realizada en metodologías corriente abajo adicionales.

65 Una HD-CTC es una célula que comprende a) un marcador positivo; b) tiene un núcleo intacto; y c) es morfológicamente distinta de WBC normales, donde la célula es no positiva para un marcador negativo. Como se

analiza en este documento, el marcador positivo es citoqueratina y/o EpCAM. Además, como se analiza en este documento, el marcador negativo es CD45 que se une preferentemente a WBC. La determinación de un núcleo intacto se determina típicamente por imágenes DAPI, pero también se conocen en la técnica otros marcadores nucleares adecuados. En una realización ejemplar, una HD-CTC es una célula que es a) positiva a citoqueratina; b) negativa a CD45; c) tiene un núcleo intacto; y d) es morfológicamente distinta de WBC normales.

En diversas realizaciones, el marcador positivo puede tener una intensidad que es mayor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces la de la intensidad de citoqueratina de glóbulos blancos nucleados. En diversas realizaciones, la intensidad del marcador negativo está en el mínimo del 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o menor de todos los eventos celulares.

En diversas realizaciones, el núcleo de una HD-CTC está intacto y es no apoptótico. Están aceptados cambios apoptóticos leves en el citoplasma, siempre que el núcleo no parezca apoptótico.

En diversas realizaciones las HD-CTC son morfológicamente distintas de WBC normales. Por ejemplo, las HD-CTC pueden tener una morfología que es coherente con una célula epitelial maligna por los criterios usados en citopatología diagnóstica convencional, predominantemente encarnada como de tamaño agrandado, pero que también puede incluir características citomorfológicas, tales como organización arquitectónica de núcleo y citoplasma, forma citoplasmática, y forma nuclear. Se presenta una galería de HD-CTC representativas en la Figura 2.

Aunque los métodos descritos en esta invención son útiles para detectar las HD-CTC usando datos derivados del análisis de no CTC, como se analiza minuciosamente, los métodos también son útiles en la caracterización de células raras. En particular, el uso de las diversas combinaciones de marcadores detectables y métodos computacionales para realizar imágenes y análisis de células permite la caracterización significativa útil en la evaluación de pronóstico de cáncer y en el control de la eficacia terapéutica para detección prematura de fallo del tratamiento que pueda conducir a recidiva de la enfermedad. Además, el análisis de las CTC de acuerdo con la invención posibilita la detección de recidiva prematura en pacientes presintomáticos que han completado un curso de terapia. Esto es posible porque la presencia de CTC se ha asociado y/o correlacionado con progresión y propagación tumoral, mala respuesta a terapia, recidiva de la enfermedad, y/o supervivencia disminuida sobre un periodo de tiempo. Por tanto, la enumeración y caracterización de CTC manifestadas proporciona métodos para estratificar pacientes por características basales que predicen el riesgo inicial y riesgo posterior en base a la respuesta a terapia.

El término "sujeto" como se usa en este documento se refiere a cualquier individuo o paciente en el que se realizan los presentes métodos. Generalmente el sujeto es humano, aunque como apreciarán los expertos en la materia, el sujeto puede ser un animal. Por tanto se incluyen otros animales, incluyendo mamíferos tales como roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsteres y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja incluyendo vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc., y primates (incluyendo monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) dentro de la definición de sujeto.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para diagnosticar o pronosticar cáncer en un sujeto. El método incluye detectar las CTC como se describe en este documento. Las CTC después se analizan para diagnosticar o pronostica cáncer en el sujeto. Por tanto, los métodos de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, para evaluar a los pacientes con cáncer y aquellos en riesgo de cáncer. En cualquiera de los métodos de diagnóstico o pronóstico descritos en este documento, la presencia o ausencia de uno o más indicadores de cáncer, tal como una célula cancerosa, o de cualquier otro trastorno, puede usarse para generar un diagnóstico o pronóstico.

En un aspecto, se extrae una muestra de sangre del paciente y se procesa para detectar las CTC como se describe en este documento. Usando el método de la invención, se determina la cantidad de CTC en la muestra de sangre y se caracterizan las CTC mediante análisis de los marcadores detectables y otros datos reunidos a partir de las imágenes de las células. Por ejemplo, puede realizarse análisis para determinar la cantidad y caracterización de las CTC en la muestra, y a partir de esta medición, puede determinarse la cantidad de CTC presentes en la muestra inicial de sangre.

En diversos aspectos, el análisis de la cantidad y caracterización de las CTC de un sujeto puede hacerse sobre un curso de tiempo particular en diversos intervalos para evaluar la progresión y patología del sujeto. Por ejemplo, puede realizarse análisis a intervalos regulares tales como un día, dos días, tres días, una semana, dos semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses, o un año, para rastrear el nivel y caracterización de células epiteliales en circulación como una función del tiempo. En el caso de pacientes con cáncer existente, esto proporciona una indicación útil de la progresión de la enfermedad y ayuda a los profesionales médicos a tomar las elecciones terapéuticas apropiadas en base al aumento, disminución, o ausencia de cambio en las células epiteliales en circulación, tal como la presencia de CTC en el torrente sanguíneo del paciente. Cualquier aumento, sea de 2 veces, 5 veces, 10 veces o mayor, en la cantidad de CTC en el tiempo disminuye el pronóstico del paciente y es un indicador prematuro de que el paciente debe cambiar de terapia. Asimismo, cualquier aumento, sea de 2 veces, 5 veces, 10 veces o mayor, indica que un paciente debe experimentar ensayo adicional tal como imágenes para

evaluar adicionalmente el pronóstico y respuesta a terapia. Cualquier disminución, sea de 2 veces, 5 veces, 10 veces o mayor, en la cantidad de CTC en el tiempo muestra estabilización de la enfermedad y respuesta de un paciente a terapia, y es un indicador para no cambiar de terapia. Para aquellos en riesgo de cáncer, un repentino aumento en la cantidad de CTC detectadas puede proporcionar una advertencia prematura de que el paciente ha desarrollado un tumor proporcionando por tanto un diagnóstico prematuro. La detección de las CTC mostradas puede aumentar la estadificación del cáncer.

En cualquiera de los métodos proporcionados en este documento, también puede realizarse análisis adicional para caracterizar las CTC, para proporcionar evaluación clínica adicional. Por ejemplo, además del análisis de imágenes, pueden emplearse técnicas de análisis de expresión génica y PCR, tales como análisis de chip génico y combinación con cebadores específicos para marcadores particulares de cáncer para obtener información tal como el tipo de tumor, del cual se han originado las CTC, estado metastásico, y grado de malignidad. Además, puede realizarse análisis del tamaño celular, análisis de ADN o ARN, análisis del proteoma, o análisis del metaboloma como medio para evaluar información adicional respecto a la caracterización del cáncer del paciente. El análisis puede incluir anticuerpos dirigidos contra, o PCR combinada usando cebadores específicos para, uno o más de los siguientes marcadores: EGFR, HER2, ERCC1, CXCR4, EpCAM, E-cadherina, mucina-1, citoqueratina, PSA, PSMA, RRM1, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, IGF1, cMET, EML4, o receptor asociado a leucocitos (LAR).

Por ejemplo, el análisis adicional puede proporcionar datos suficientes para hacer determinaciones de la sensibilidad de un sujeto a un régimen terapéutico particular, o para determinar la eficacia de un agente candidato en el tratamiento del cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un régimen terapéutico particular o determinar la eficacia de un agente candidato en el tratamiento del cáncer detectando las HD-CTC del sujeto como se describe en este documento y analizando las CTC detectadas. Por ejemplo, una vez administrado un tratamiento con fármaco a un paciente, es posible determinar la eficacia del tratamiento con fármaco usando los métodos de la invención. Por ejemplo, puede procesarse una muestra tomada del paciente antes del tratamiento con fármaco, así como una o más muestras celulares tomadas del paciente de forma concurrente con o posterior al tratamiento con fármaco, usando los métodos de la invención. Comparando los resultados del análisis de cada muestra procesada, se puede determinar la eficacia del tratamiento con fármaco o la sensibilidad del paciente al agente. De este modo, puede hacerse la identificación prematura de compuestos fallidos o puede hacerse la validación prematura de compuestos prometedores.

Cuatro importantes indicadores que proporcionan una idea de la actividad clínica de compuestos candidatos incluyen HER2, EGFR, CXCR4, y EphB4 RTK. HER2 proporciona un indicador de malignidad de una célula determinando la estabilidad del ARNm y la localización subcelular de transcritos de HER2. La resistencia a EGFR a adquirir mutaciones, y/o las mutaciones adquiridas proporciona importantes indicadores de la actividad de un compuesto candidato además de posibles compuestos alternativos que pueden usarse en combinación con el compuesto candidato. Una evaluación del nivel de interferencia de reparación del ADN inducido con platino proporciona una idea del estado del marcador CXCR4 y el estado metastásico. Además, la evaluación del estado del receptor tirosina quinasa EphB4 proporciona una idea del potencial metastásico de la célula. Por consiguiente, usando los métodos de la presente invención, pueden controlarse los pacientes que toman dichos fármacos candidatos tomando frecuentes muestras de sangre y determinando la cantidad de células epiteliales en circulación, por ejemplo CTC, en cada muestra como una función del tiempo. Un análisis adicional de los indicadores Her2, EGFR, CXCR4, y EphB4 RTK proporciona información en cuanto a la patología del cáncer y la eficacia del fármaco candidato. Asimismo, ERCC1, citoqueratina, PSA, PSMA, RRM1, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, receptor de progesterona, IGF1, cMET, EML4 y otros proporcionan una idea de la actividad clínica de los compuestos candidatos. El análisis de estos indicadores de actividad clínica puede ser a través del análisis de marcadores detectables como se analiza en este documento (por ejemplo, inmunohistoquímica e hibridación in situ fluorescente (FISH)) o análisis adicional mediante técnicas tales como secuenciación, genotipado, expresión génica u otra técnica analítica molecular.

El análisis de las CTC proporciona un método para determinar sujetos candidatos para un ensayo clínico particular. Por ejemplo, las HD-CTC detectadas de un candidato pueden analizarse para determinar si existen marcadores específicos para determinar si el régimen terapéutico particular del ensayo clínico puede ser potencialmente satisfactorio. Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona un método para determinar un sujeto candidato para un ensayo clínico. El método incluye detectar las HD-CTC del sujeto como se describe en este documento. Las HD-CTC después pueden analizarse para determinar si el sujeto candidato es adecuado para el ensayo clínico particular.

El análisis de las CTC durante un ensayo clínico proporcionará información sobre si el paciente está respondiendo o no está respondiendo al fármaco experimental, donde ausencia de cambio sustancial o una disminución en las CTC mostradas indica respuesta y un aumento en las CTC mostradas indica mala respuesta. El aumento o disminución puede ser de 2 veces, 10 veces o mayor. Esta información es un indicador prematuro de la eficacia del fármaco y puede usarse por los investigadores como un criterio de valoración secundario en el ensayo clínico.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la invención.

Ejemplo 1

5 ENSAYO DE CTC E IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIÓN DE CTC

Los datos aquí presentados demuestran la metodología de la presente invención aplicada a CTC y subpoblaciones de CTC, tales como HD-CTC como se define en este documento. El ensayo se realiza mediante un protocolo prospectivo controlado para abordar la fiabilidad y robustez del ensayo así como una comparación de muestras divididas con el Cellsearch®. Después de esta validación técnica, se usó el ensayo para investigar la incidencia y prevalencia de las CTC y subpoblaciones específicas de CTC en pacientes con cánceres metastásicos de mama, próstata, y pancreáticos así como controles normales. La subpoblación específica de CTC abordada por el ensayo requiere que la célula o células tengan un núcleo intacto, expresen citoqueratina y no CD45, sean morfológicamente distintas de los glóbulos blancos (WBC) adyacentes y tengan características citológicas coherentes con las células epiteliales malignas intactas adecuadas para análisis corriente abajo.

Se utilizaron los siguientes métodos y protocolos.

La recogida de muestras de pacientes y sangre se realizó del siguiente modo. Se recogieron muestras de pacientes con cáncer metastásico en tubos de sangre anti-coagulada en Scripps Clinic, Universidad de California, San Diego, Billings Clinic, y Universidad de California, San Francisco según los protocolos aprobados por el IRB. Las muestras de sitios no locales (UCSF, Billings Clinic) se transportaron durante una noche de modo que la muestra se recibiera y procesara en 24 horas. Las muestras de sitios locales (Scripps Clinic y UCSD) se mantuvieron a temperatura ambiente durante 16-24 horas para imitar las muestras que provenían de sitios no locales. También se extrajeron muestras de sangre de controles normales del TSRI Normal Blood Donor Service.

El procesamiento de muestras de sangre para la detección de HD-CTC se realizó del siguiente modo. Se balancearon las muestras de sangre durante 5 minutos antes de medir un recuento de glóbulos blancos (WBC) usando el sistema de glóbulos blancos Hemocue™ (HemoCue, Suecia). En base al recuento de WBC, un volumen de sangre se sometió a lisis de eritrocitos (solución de cloruro de amonio). Después de centrifugación, las células nucleadas se volvieron a suspender en PBS y se adhirieron como una monocapa en portaobjetos de vidrio fabricados por encargo (Marienfeld, Alemania). Los portaobjetos de vidrio son del mismo tamaño que los portaobjetos convencionales de microscopio pero tienen un recubrimiento exclusivo que permite la retención máxima de células vivas. Cada portaobjetos puede alojar aproximadamente 3 millones de células nucleadas, por tanto la cantidad de células sembradas por portaobjetos dependía del recuento de WBC de los pacientes. Se lisó suficiente sangre para producir 15 portaobjetos y las células se secaron posteriormente sobre los portaobjetos después de añadir un conservante celular. Los 15 portaobjetos se almacenaron a -80°C durante al menos 24 horas.

Para la detección de HD-CTC en pacientes con cáncer para esta investigación, se usaron 4 portaobjetos como ensayo. Los portaobjetos restantes creados para cada paciente se almacenaron a -80°C para futuros experimentos. Se descongelaron cuatro portaobjetos de cada paciente, después se fijaron las células con paraformaldehído al 2 %, se permeabilizaron con metanol frío, y se bloquearon los sitios de unión no específica con suero de cabra. Los portaobjetos se incubaron posteriormente con anticuerpo monoclonal anti-pancitoqueratina (Sigma) y CD45-Alexa 647 (Serotec). Después de lavados con PBS, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo de cabra anti-ratón Alexa Fluor 555 (Invitrogen). Las células se tiñeron con contraste con DAPI y se montaron con un medio acuoso de montaje.

El análisis de imágenes y técnico se realizó del siguiente modo. Los cuatro portaobjetos de cada paciente se escanearon usando un microscopio de barrido fluorescente fabricado por encargo que se ha desarrollado y optimizado para un escaneo rápido y fiable. Se usó un instrumento de barrido para todas las muestras de los pacientes en este informe para normalizar los resultados. Además, la fuente de luz se calibró semanalmente y se desarrolló un algoritmo para normalizar las exposiciones de cada fluoróforo en cada portaobjetos de paciente durante el escaneo. Cada portaobjetos se escaneó completamente a aumento 10X en 3 colores y produjo más de 6900 imágenes. Las imágenes resultantes se introdujeron en un algoritmo de análisis que identifica probables HD-CTC candidatas en base a numerosas medidas, incluyendo intensidad de citoqueratina, intensidad de CD45, así como forma y tamaño nuclear y citoplasmático. Un técnico entonces repasa los candidatos probables generados por el algoritmo y elimina los aciertos que son obviamente no células, tales como agregados de colorante.

El análisis e interpretación profesional se realizó del siguiente modo. Todas las probables CTC candidatas se presentan a un hematopatólogo para el análisis e interpretación a través de un informe basado en la red donde el patólogo es capaz de incluir o excluir cada célula candidata como HD-CTC. Las células se clasifican como HD-CTC si son positivas a citoqueratina, negativas a CD45, contienen un núcleo DAPI intacto sin cambios apoptóticos identificables (formación de vesículas, aspecto degenerado) o un aspecto alterado, y son morfológicamente distintas de los glóbulos blancos adyacentes (habitualmente una característica basada en forma, aunque ocasionalmente basada puramente en el tamaño). Deben tener citoplasma que sea claramente circunferencial y dentro del cual esté contenido en núcleo entero. El citoplasma puede mostrar cambios apoptóticos tales como formación de vesículas y

densidad irregular o alteración leve en el límite citoplasmático periférico, pero no debe estar tan alterado que su asociación con el núcleo esté en duda. Las imágenes se presentan como una imagen digital, con capacidad de visualización del canal fluorescente individual así como una imagen compuesta. Cada imagen de célula se anota con datos estadísticos auxiliares respecto al tamaño nuclear relativo, las intensidades fluorescentes, y las intensidades fluorescentes comparativas. Cada HD-CTC candidata se presenta en un campo de visión con suficientes WBC adyacentes para permitir la comparación contextual entre características citomorfológicas de la célula en cuestión frente a los glóbulos blancos de fondo.

Se realizaron experimentos de línea celular del siguiente modo. Se hicieron adiciones en cuatro alícuotas del donante (2 ml cada una) con cantidades variables de células SKBR-3 para producir 4 portaobjetos con aproximadamente 300, 100, 30 y 10 células cancerosas por portaobjetos. Los 16 portaobjetos después se procesaron y analizaron por un único operario de acuerdo con el protocolo de preparación de muestras de HD-CTC. Se usó un único instrumento para hacer imágenes de los 16 portaobjetos.

Clasificación de HD-CTC: Las HD-CTC se definieron como células que son a) positivas a citoqueratina (intensidad >6 veces la intensidad de citoqueratina de glóbulos blancos nucleados); b) negativas a CD45 (intensidad en el 2 % menor de todos los eventos celulares); c) incluyen un núcleo de aspecto no apoptótico intacto por imágenes con DAPI; y d) son morfológicamente distintas de los WBC normales.

Los requisitos de inclusión para la evaluación morfológica de HD-CTC incluyen 1) un tamaño nuclear un 30 % mayor que los núcleos promedio de WBC adyacentes, y 2) citoplasma circunferencial positivo a citoqueratina con una intensidad promedio un 600 % mayor que los WBC nucleados adyacentes. De forma común, aunque no necesaria, las características de las HD-CTC incluyen núcleos bastante grandes hasta cinco veces el tamaño promedio de los núcleos de los WBC adyacentes, contornos nucleares distintos de los núcleos de los WBC adyacentes incluyendo elongación, dominio citoplasmático grande con una distribución frecuentemente excéntrica y/o forma citoplasmática poligonal o alargada, y dobletes y grupos de 3 o más HD-CTC. Otros objetos tipo celular que son positivos a citoqueratina, negativos a CD45, y contienen un núcleo pero no cumplen los criterios de inclusión, por ejemplo, son del mismo tamaño que los WBC o tienen un citoplasma que no es circunferencial, no se cuentan como HD-CTC pero se rastrean mediante el ensayo. El propósito de este enfoque es tener criterios estrictos de inclusión para un fenotipo específico de CTC, reteniendo al mismo tiempo los datos acerca de los eventos que cumplen solamente algunos de los requisitos, pero que aún podrían ser clínicamente significativos, tales como células tumorales apoptóticas o fragmentos de células tumorales o células que experimentan transición epitelial a mesenquimática.

Resultados

Linealidad y sensibilidad del ensayo usando experimentos con adiciones: Para ensayarla linealidad y sensibilidad del ensayo, se hicieron adiciones de diluciones específicas que variaban de 10 a 300 SKBR3 de la línea celular de cáncer de mama en sangre de control normal. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y se procesaron y analizaron de acuerdo con el ensayo de HD-CTC explicado en la sección de métodos. La media de SKBR3 observadas se representan frente a las SKBR3 esperadas y presenta un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9997 (Figura 1).

Robustez del ensayo de recuentos de HD-CTC en pacientes con carcinomas: La robustez de ensayo del ensayo de HD-CTC se ensayó frente a múltiples procesadores y muestras divididas. Se realizaron ensayos duplicados por dos procesadores diferentes sobre 9 muestras diferentes de pacientes. Una comparación de recuentos de HD-CTC/ml entre dos procesadores usando muestras divididas tiene un coeficiente de correlación (R^2) de 0,979 (Figura 3). Todos los datos se analizaron por un único operario ajeno al experimento.

Especificidad del ensayo en muestras de controles normales: Se evaluaron quince donantes sanos de una reserva institucional de donantes sanos como población de control que consistía en 8 mujeres y 7 hombres con un intervalo de edades de 24 a 62 años. En todos los controles sanos salvo uno, la cantidad de dichos eventos corregida para el volumen fue 1 HD-CTC/ml o menos. El atípico fue una mujer donante sana con un recuento de HD-CTC de 4/ml. Tras la revisión explícita de sus células, aproximadamente un tercio de ellas cumplían sólidamente todos los criterios de inclusión, mientras que los dos tercios restantes cumplían todos los criterios pero estaban cerca del límite inferior de inclusión por uno o más criterios. Otros cuatro donantes sanos tenían 1 HD-CTC/ml. La revisión explícita de estas células reveló un patrón similar, ya que aproximadamente un tercio cumplía sólidamente todos los criterios, mientras que los dos tercios restantes de las células cumplían los criterios, pero estaban cerca del límite inferior para la inclusión por uno o más criterios. Ejemplos de eventos incluidos que están cerca del límite inferior para la inclusión son células que miden un 30 % más grandes que los WBC adyacentes pero no parecen significativamente más grandes por evaluación morfológica, y células que están ligeramente fuera de enfoque y podrían tener cambios nucleares apoptóticos que no son detectables a ojo, y finalmente, células ocasionales que tienen mediciones objetivas de intensidad de citoqueratina por encima del punto de corte pero que subjetivamente no parecen significativamente más brillantes que los WBC adyacentes mediante revisión fluorescente de un único canal.

Tabla 1: Comparación del ensayo de HD-CTC a CellSearch®

Tipo de cáncer	HD-CTC/ml	CellSearch/ml
Mama n.º 1	49,3	0,1
Mama n.º 2	87,0	0,0
Mama n.º 3	33,4	0,1
Mama n.º 4	199,3	0,1
Mama n.º 5	5,0	3,1
Próstata n.º 1	2,3	0,0
Próstata n.º 2	8,4	0,4
Próstata n.º 3	107,3	2,8
Próstata n.º 4	1,3	0,0
Próstata n.º 5	150,5	0,1
Próstata n.º 6	0,0	0,0
Próstata n.º 7	1,4	0,5
Próstata n.º 8	1,5	0,1
Próstata n.º 9	145,3	0,8
Próstata n.º 10	57,6	0,0
(Extrapolado a CTC/ml)		

- 5 Comparación del ensayo de HD-CTC a CellSearch®: Se evaluó un total de 15 pacientes, 5 con cáncer metastásico de mama y 10 con cáncer metastásico de próstata, para las CTC con los ensayos tanto Cellsearch® como de HD-CTC. Se recogieron dos tubos de sangre de cada paciente. Se recogió un tubo de 7,5 ml de sangre en tubos CellSave™ (Veridex, Raritan NJ) y se enviaron a Quest Diagnostics (San Juan Capistrano, CA) para la enumeración de las CTC usando el ensayo Cellsearch®. Se recogió un segundo tubo de sangre de cada paciente y se procesó de acuerdo con el protocolo de HD-CTC 24 horas después de la extracción de sangre, coherente con el proceso
- 10 convencional de HD-CTC para imitar la cronología en que se procesaron las muestras en Quest Diagnostics. El ensayo CellSearch® detectó 2 o más CTC per 7,5 ml de sangre en 5/15 pacientes ensayados. Por el contrario, el ensayo de HD-CTC detectó cantidades significativamente mayores de CTC en significativamente más pacientes (se identificaron HD-CTC en 14/15 pacientes ensayados, Tabla 1).
- 15 Incidencia de HD-CTC en pacientes con cáncer metastásico: También se enumeraron las HD-CTC en una cohorte adicional de 30 pacientes con cáncer metastásico de mama, 20 pacientes con cáncer metastásico de próstata, 18 pacientes con cáncer pancreático metastásico, y 15 controles normales. Usando este enfoque, se encontraron ≥5 HD-CTC/ml en el 80 % de los pacientes con cáncer de próstata (media = 92,2), el 70 % de los pacientes con cáncer de mama (media = 56,8), el 50 % de los pacientes con cáncer pancreático (media = 15,8), y el 0 % de los controles
- 20 normales (media = 0,6) (Tabla 2).

Tabla 2: Porcentaje de pacientes con HD-CTC/ml de sangre obtenida de la cohorte

	N	≥2	≥5	≥10	≥50
Próstata	20	90 %	80 %	65 %	40 %
Mama	30	80 %	70 %	60 %	27 %
Pancreático	18	61 %	44 %	44 %	11 %
Normal	15	7 %	0 %	0 %	0 %

- 25 Morfología de las HD-CTC: Se observó una población heterogénea de CTC dentro y entre los pacientes. Las CTC tenían diversas formas, tamaños, e intensidades de citoqueratina. En algunos casos, características citológicas distintivas tales como el tamaño grande o la forma citoplasmática poligonal, fueron bastante distintivas y monótonas dentro de la muestra del paciente. En otros casos, hubo variabilidad citomorfológica entre las HD-CTC dentro de una única muestra. También varió el tamaño celular; muchas muestras de pacientes tenían HD-CTC con núcleos

uniformemente tres o cuatro veces el tamaño de los núcleos de los WBC adyacentes, aunque otros pacientes tenían células con núcleos solamente 1,3 veces el tamaño de los núcleos de los WBC adyacentes. Algunos pacientes tenían un intervalo de tamaños. Se seleccionó un límite inferior para el tamaño nuclear de las HD-CTC de 1,3 veces el núcleo promedio de WBC en base a la evaluación del tamaño nuclear más grande de las células identificadas como WBC que mostraban tinción no específica falsa con citoqueratina, por ejemplo, positivas para CD45 y positivas para citoqueratina.

De forma interesante, usando esta plataforma que permite la evaluación morfológica detallada, se identificaron grupos de HD-CTC en la mayoría de los pacientes con cáncer (88 %) en esta cohorte, que varían de grupos de 2 HD-CTC a más de 30 HD-CTC (datos no mostrados). Cada HD-CTC era positiva a citoqueratina, negativa a CD45, contenía un núcleo DAPI, y era morfológicamente distinta de las células nucleadas adyacentes.

Además de contar las HD-CTC, se rastrearon varias categorías diferentes de células incluyendo células que tenían núcleos que presentaban apoptosis, células que no tenían citoqueratina circunferencial, otras células que eran del mismo tamaño o más pequeñas que los WBC adyacentes, y células que eran tenues para citoqueratina o negativas (imágenes no mostradas). Específicamente, algunas CTC se excluyeron porque carecían de diversos criterios morfológicos o morfométricos de inclusión: incluyendo uno o más de: a) intensidad de citoqueratina demasiado tenue; b) tamaño nuclear demasiado pequeño; c) citoqueratina insuficientemente circunferencial (rodea menos de 2/3 del núcleo); d) citoqueratina demasiado tenue, aunque parece ser un grupo de dos células muy grandes; e) el núcleo muestra cambios de desintegración apoptótica; f) núcleo demasiado pequeño y citoplasma insuficientemente circunferencial; parece ser una célula en apoptosis tardía; g) núcleo demasiado pequeño (mismo tamaño que los núcleos de los WBC adyacentes); h) citoqueratina presente, pero no circunferencial; y i) citoplasma insuficientemente circunferencial, núcleo demasiado pequeño.

Aunque muchos de estos eventos pueden de hecho representar células epiteliales malignas en circulación en diversas fases de anoikis o alteración secundaria para incluso el procesamiento mínimo utilizado en la plataforma, el objetivo es identificar una población 'pura' de células con una probabilidad muy alta de representar células epiteliales funcionales en circulación intactas potencialmente malignas en metástasis que son adecuadas para análisis corriente abajo por metodologías secundarias. Las células de carcinoma fragmentadas, alteradas, picnóticas o dañadas de otro modo no se consideran evaluables en patología diagnóstica convencional, y por tanto se excluyen en esta plataforma de biopsia en fase fluida también. Se enumeran y rastrean, ya que se reconoce que su presencia probablemente se correlaciona globalmente con la biología tumoral en el paciente, reflejando la carga tumoral global o reflejando alguna ecuación completa hasta ahora mal comprendida que implica carga tumoral y vascularidad tumoral y eficacia de la vigilancia inmune intravascular; sin embargo, no son útiles para análisis secundario, y por tanto no se designan como HD-CTC.

Muchos pacientes, además de tener HD-CTC, tenían una cantidad sustancial de células que tenían núcleos que eran morfológicamente distintivos de los WBC adyacentes, que se parecían a los núcleos de las HD-CTC dentro de esa muestra, y eran negativas a CD45, pero también eran tenues para citoqueratina o negativas (datos no mostrados). Los tipos representativos de CTC encontrados en un único paciente de cáncer de próstata incluían CTC que eran negativas para citoqueratina y CD45, pero mostraban un núcleo grande similar a otras CTC encontradas en este paciente, CTC típicas que eran positivas a citoqueratina, negativas a CD45, y que tenían un núcleo DAPI, y grupos de CTC de 4 células.

A la luz del actual debate extensivo acerca de la posible existencia de células de carcinoma que experimentan transición epitelial a mesenquimática, el aspecto y el patrón de expresión de proteínas de estas células las identifica como posibles candidatos para dicho tipo celular.

Discusión.

La robustez de la plataforma de HD-CTC se evaluó tanto con líneas celulares como con muestras de pacientes. A pesar de la poca automatización, y el procesamiento completamente manual en el laboratorio húmedo, del actual ensayo de HD-CTC usado para esta cohorte, la reproducibilidad del ensayo es impresionante con una CV promedio de menos del 9 % para 9 muestras diferentes procesadas por dos técnicos independientes.

Los criterios usados para definir una CTC son diferentes entre diferentes tecnologías. Los actualmente descritos identificaron una subpoblación que tiene la mayor probabilidad de ser células tumorales *bona fide*. Incluso con criterios estrictos, la incidencia de CTC usando nuestro ensayo es mucho mayor que muchas tecnologías y en el mismo intervalo que el presentado por el chip-CTC. Además, por delante en comparación con CellSearch® mostró significativamente más CTC en una proporción mayor de pacientes. Aunque otras tecnologías han observado dobletes y grupos ocasionales de CTC, se observaron grupos de CTC en la mayoría de los pacientes.

Cabe señalar que en la pequeña cohorte ensayada, la frecuencia de detección, y la concentración relativa, de las CTC entre diferentes tipos de tumor usando las metodologías de la invención (próstata > mama > pancreático) son paralelos a los hallazgos observados usando otros métodos tales como CellSearch®.

5 Aparentemente, las CTC se rastrean sobre el curso clínico de un pequeño conjunto de pacientes con cáncer de próstata en que se realizaron extracciones en serie (Figura 4). La detección en serie de HD-CTC puede incluirse en ensayos terapéuticos. Se espera que esto permita el estudio de pacientes con características clínicas uniformes que se tratan de forma similar y en los que se realizará seguimiento clínico a largo plazo. Además de correlacionar estas células con los resultados de los pacientes para determinar su valor pronóstico y de control, se espera que estas HD-CTC sirvan como herramienta farmacodinámica para evaluar los efectos sobre la diana a un nivel molecular de fármacos de interés.

10 En resumen, el presente ejemplo proporciona datos de que el ensayo de HD-CTC (i) encuentra cantidades significativas de CTC en la mayoría de los pacientes con cáncer metastásico, (ii) tiene sensibilidad mejorada sobre el sistema Cellsearch®, (iii) proporciona HD-CTC en un formato ideal para caracterización corriente abajo, (iii) posibilita la recogida prospectiva de muestras que pueden almacenarse congeladas durante periodos largos de tiempo, y después analizarse retrospectivamente cuando lleguen a estar disponibles nuevos ensayos o marcadores.

15 Ejemplo 2

Ensayo de CTC e identificación de poblaciones de células raras

20 Los datos aquí presentados demuestran la identificación de supuestas poblaciones de células raras. Usando la metodología descrita en este documento, se identificó una supuesta población de células raras. El procesamiento y las imágenes de las muestras se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Además, se identificaron HD-CTC y se definieron como en el Ejemplo 1,

25 En la realización del ensayo, se supuso que las no CTC eran positivas a citoqueratina. Se identificó una supuesta población de células raras que tenían las siguientes características: a) citoqueratina tenue o negativa; b) negativas a CD45; y c) núcleo intacto de aspecto no apoptótico por imágenes con DAPI. La Figura 5 presenta la tasa de incidencia de la supuesta población de células raras entre pacientes respecto a las HD-CTC identificadas.

30 Aunque se ha descrito la invención, se entenderá que están incluidas modificaciones y variaciones dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, la invención está limitada solamente por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar una célula tumoral en circulación de alta definición (HD-CTC) en una muestra procedente de un sujeto, que comprende:
- 10 a) proporcionar una muestra sospechosa de tener al menos una CTC y al menos una no CTC que está presente a una concentración que es al menos 10 veces la de la CTC,
- 10 b) poner en contacto la muestra con más de un agente detectable, en el que los agentes detectables se unen a un marcador celular y son un marcador positivo y un marcador negativo, en el que el marcador positivo es citoqueratina o EpCAM y/o el marcador negativo es CD45, y opcionalmente un marcador nuclear y/o marcador de contenido;
- 15 c) realizar toma de imágenes celulares en la muestra de (b) para generar una imagen celular; y
- d) detectar las HD-CTC en la muestra analizando la imagen de (c), en el que las HD-CTC expresan el marcador positivo, tienen un núcleo intacto, son morfológicamente distintas de glóbulos blancos normales (WBC) y no son positivas para el marcador negativo.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que la al menos una CTC y al menos una no CTC están fijadas a un portaobjetos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que (d) se realiza en un ordenador que comprende un código ejecutable para realizar el análisis.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente (e) presentar los resultados de (d) en una interfaz gráfica de usuario.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la toma de imágenes celulares de (c) comprende adicionalmente optimizar un límite de exposición para el más de un agente detectable.
- 30 6. El método de la reivindicación 5, en el que el límite de exposición para el más de un agente detectable se determina usando una señal de la al menos una no CTC, en el que el límite de exposición se optimiza antes o después de generar la imagen, y/o que comprende adicionalmente (c') volver a tomar imágenes de la muestra antes de realizar (d).
- 35 7. El método de la reivindicación 1, en el que la toma de imágenes de (c) comprende adicionalmente optimizar el tiempo de exposición para disminuir el tiempo de recogida de datos.
8. El método de la reivindicación 1, en el que una señal de la al menos una célula se usa para determinar un parámetro de control de calidad.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en el que el parámetro de control de calidad es
- 45 i) distribución de la al menos una no CTC en el portaobjetos,
- ii) alineación de múltiples imágenes celulares o
- iii) calidad de la tinción celular.
- 50 10. El método de la reivindicación 9, en el que el parámetro de control de calidad es alineación de múltiples imágenes celulares y en el que la alineación se determina alineando una señal procedente del marcador nuclear con una señal procedente del marcador negativo, cada uno presente en diferentes imágenes.
- 55 11. El método de la reivindicación 9, en el que el parámetro de control de calidad es la calidad de la tinción celular y en el que la calidad de la tinción celular se determina calculando una proporción de señales procedentes del marcador negativo a señales procedentes de los marcadores nucleares.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la proporción es menos de 1,2.
- 60 13. El método de la reivindicación 8, en el que el parámetro de control de calidad es la distribución del marcador negativo por todas las no CTC.
14. El método de la reivindicación 8, en el que el parámetro de control de calidad es la distribución del marcador positivo por todas las no CTC.
15. El método de la reivindicación 13 o reivindicación 14, en el que la distribución se calcula usando la media, desviación típica, coeficiente de variación, o cualquier combinación de los mismos.
- 65 16. El método de la reivindicación 8, en el que el parámetro de control de calidad es pérdida de células.

17. El método de la reivindicación 16, en el que la pérdida de células se determina calculando una proporción de señales procedentes de los marcadores nucleares o señales procedentes de los marcadores negativos a la cantidad de no CTC en el portaobjetos.
- 5 18. El método de la reivindicación 1, en el que la toma de imágenes celulares de (c) comprende adicionalmente optimizar límites de intensidad para distinguir CTC de otras células.
- 10 19. El método de la reivindicación 18, en el que los límites de intensidad se determinan usando la media, desviación típica, coeficiente de variación, o cualquier combinación de los mismos, para una señal de fondo del marcador positivo.
- 15 20. El método de la reivindicación 19, en el que la media, desviación típica, o coeficiente de variación se determinan en una base de portaobjetos global, una base de portaobjetos individual, región de un portaobjetos individual, o cualquier combinación de los mismos.
- 20 21. El método de la reivindicación 18, en el que los límites de intensidad se determinan dentro de una única imagen identificando la señal máxima del marcador positivo y comparando la señal máxima con una desviación típica calculada a partir de señales de marcador positivo adicional.
- 25 22. El método de la reivindicación 21, en el que el límite de intensidad es igual a un factor entre 5 y 20, de 12,5, o de 15, multiplicado por la desviación típica y sumado a la media y/o el límite de intensidad se calcula para cada imagen de la muestra.
- 30 23. El método de la reivindicación 18, en el que el límite de intensidad para el marcador negativo se determina usando la media y desviación típica de señales procedentes de marcadores negativos de no CTC, opcionalmente en el que la media y desviación típica se determinan en una base de portaobjetos global, base de portaobjetos individual, región de un portaobjetos individual, o cualquier combinación de los mismos.
- 35 24. El método de la reivindicación 1, en el que (d) comprende adicionalmente medir tamaños celulares para la al menos una célula, la distribución de tamaños celulares para la al menos una célula, o combinación de los mismos, y comparar los tamaños celulares o distribución de tamaños celulares para la al menos una célula, con tamaños y distribuciones celulares conocidos.
- 40 25. El método de la reivindicación 1, en el que el análisis de (d) comprende adicionalmente
 (i) medir los tamaños nucleares para la al menos una no CTC, la distribución de tamaños nucleares para la al menos una no CTC, los patrones de contorno para la al menos una no CTC, o combinación de los mismos, y comparar los tamaños nucleares, distribución de tamaños nucleares o patrones de contorno con una supuesta CTC para identificar la CTC sospechosa como CTC,
 (ii) determinar la concentración de CTC en un fluido del sujeto a partir del cual se tomó la muestra, o
 (iii) determinar un nivel de expresión del marcador de contenido.
- 45 26. El método de la reivindicación 25 (iii), en el que el nivel de expresión del marcador de contenido se determina en la al menos una CTC y en la al menos una no CTC y se compara con el nivel de expresión del marcador de contenido en una población de pacientes.
- 50 27. El método de la reivindicación 1, en el que las HD-CTC comprenden
 (i) intensidad de citoqueratina >6 veces la de glóbulos blancos nucleados;
 (ii) intensidad de CD45 en el 2 % menor de todos los eventos celulares;
 (iii) un núcleo intacto de aspecto no apoptótico definido por imágenes DAPI; y
 (iv) una morfología distinta de glóbulos blancos normales.
- 55 28. El método de la reivindicación 27, en el que la morfología de las HD-CTC comprende adicionalmente
 (i) un tamaño nuclear aproximadamente un 30 % mayor que los núcleos promedio de los glóbulos blancos adyacentes;
 (ii) citoplasma circunferencial positivo a citoqueratina con una intensidad promedio un 600 % mayor que los glóbulos blancos nucleados adyacentes.
- 60 29. El método de la reivindicación 1, en el que i) se sabe que el sujeto tiene cáncer y está sometiéndose a terapia contra el cáncer.
- 65 30. El método de la reivindicación 29, en el que la terapia contra el cáncer es quimioterapia.

31. El método de la reivindicación 30, en el que se usa un marcador de contenido para determinar un agente quimioterapéutico.
- 5 32. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente proporcionar un diagnóstico o pronóstico al sujeto.
33. El método de la reivindicación 32, que comprende adicionalmente determinar la sensibilidad del sujeto a la terapia contra el cáncer.
- 10 34. Un método para diagnosticar o pronosticar cáncer en un sujeto, que comprende:
- a) realizar el método de la reivindicación 1; y
 - b) analizar la HD-CTC detectada para proporcionar un diagnóstico o pronóstico, diagnosticando o pronosticando de este modo cáncer en un sujeto.
- 15 35. Un método para determinar la sensibilidad de un sujeto a un régimen terapéutico, que comprende:
- a) realizar el método de la reivindicación 1; y
 - b) analizar la HD-CTC detectada, determinando de ese modo la sensibilidad del sujeto a un régimen terapéutico.
- 20 36. Un método para determinar un sujeto candidato para un ensayo clínico, que comprende:
- a) realizar el método de la reivindicación 1; y
 - b) analizar la HD-CTC detectada, determinando de ese modo un sujeto candidato para un ensayo clínico.
- 25

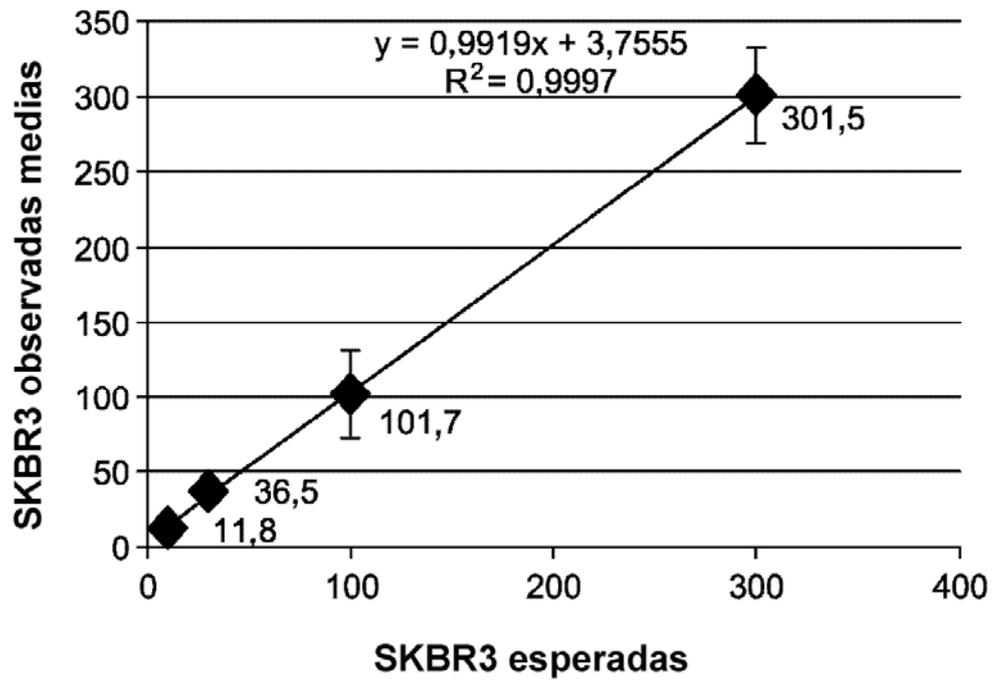


FIG. 1

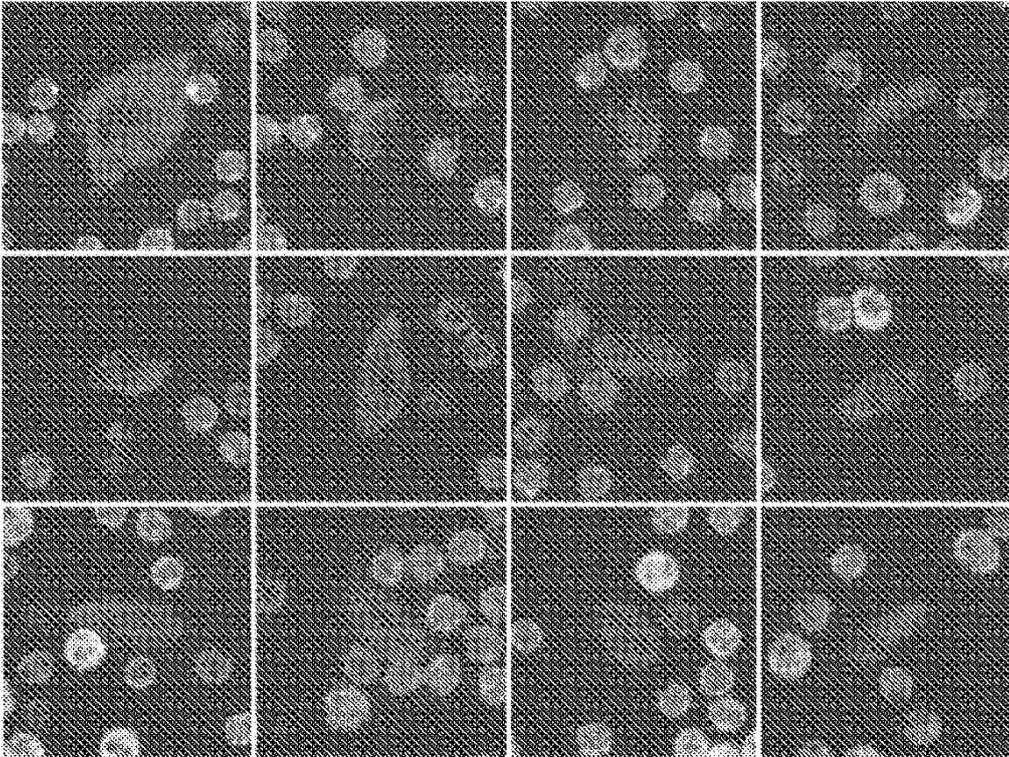


FIG. 2

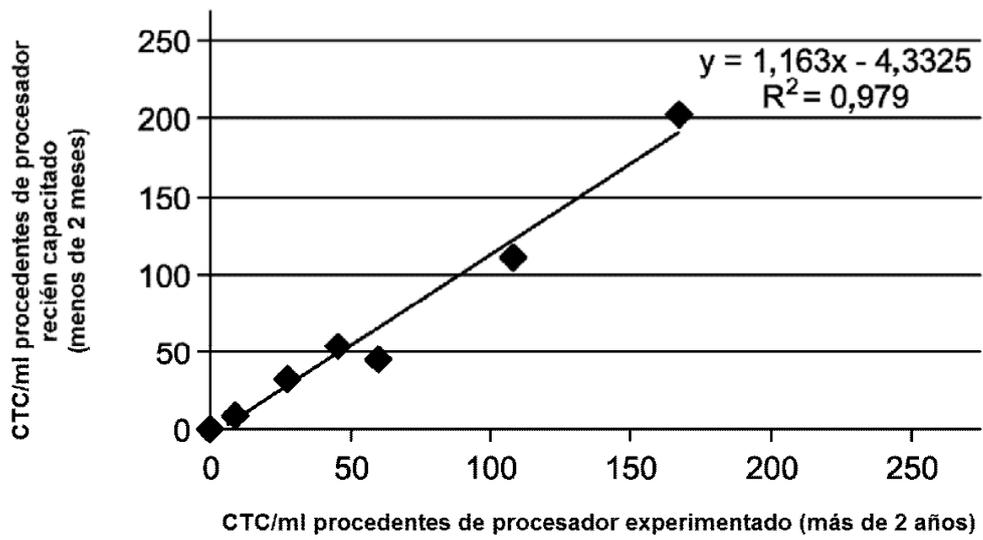


FIG. 3

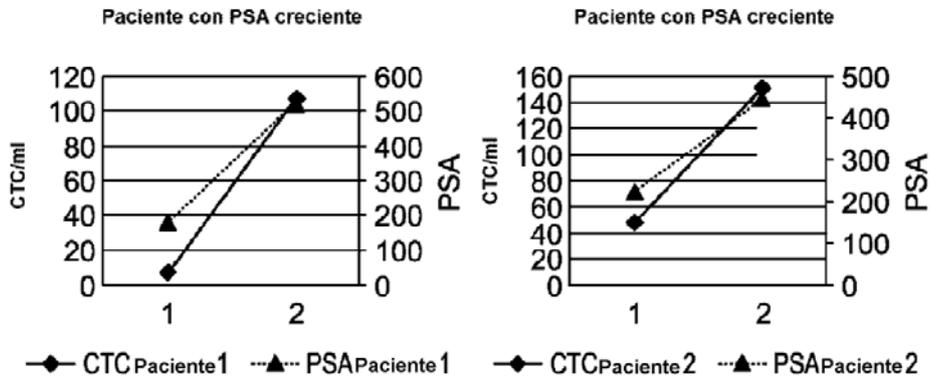


FIG. 4A

FIG. 4B

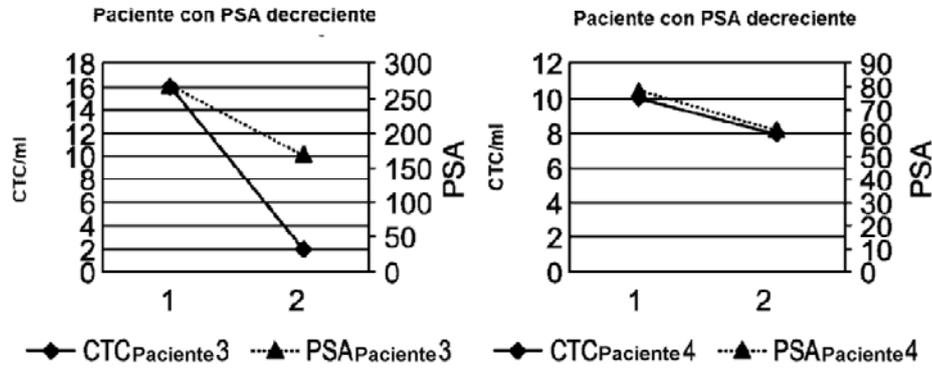


FIG. 4C

FIG. 4D

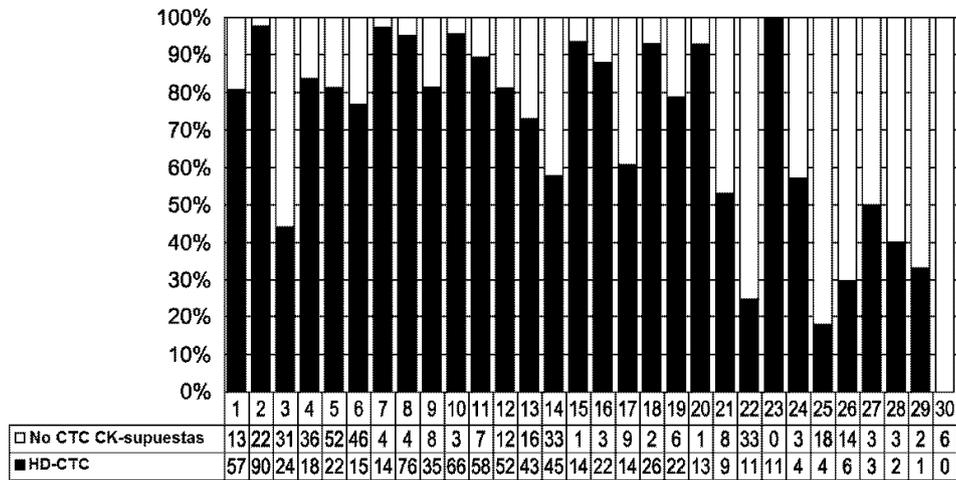


FIG. 5