

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 945**

51 Int. Cl.:

G06T 7/00 (2006.01)

G06T 7/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2009** **E 09792559 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016** **EP 2335221**

54 Título: **Cuantificación reproducible de expresión de biomarcadores**

30 Prioridad:

16.09.2008 US 97415 P

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

13.06.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CHRISTIANSEN, JASON;
PINARD, ROBERT;
GUSTAVSON, MARK;
BOURKE, BRIAN;
TEDESCHI, GREGORY R.;
REILLY, DYLAN M.;
ZERKOWSKI, MACIEJ P.;
WILLIAMS, CHRISTINE y
WANG, DONGXIAO**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 573 945 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

Cuantificación reproducible de expresión de biomarcadores

5 Antecedentes de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo del análisis de la expresión de biomarcadores automatizada en muestras de tejido utilizando algoritmos para mejorar el análisis independiente del operador y la reproducibilidad de resultados de ensayo para un valor predictivo superior en ensayos de diagnóstico.

10

[0002] Hasta la fecha, la evaluación de biomarcadores en las secciones de tejido se basa en técnicas citoquímicas e inmunohistoquímicas (IHC) tradicionales que se desarrollaron en gran medida antes de que existieran los ensayos a gran escala y de alto rendimiento. Un inconveniente significativo para los métodos tradicionales es la naturaleza subjetiva de la prueba y la falta de estandarización. Aunque las pruebas IHC han mostrado utilidad clínica (por ejemplo, el Her2/HercepTest), el valor de estas pruebas se ha demostrado recientemente que se ve comprometido por el sitio en el que se realiza la prueba. Dos estudios recientes que examinan la reproducibilidad de las pruebas Her2 han demostrado que puede haber hasta un 20% de error entre una prueba de laboratorio local y central (Perez *et al.* J. Clin. Onc. (2006) 24:3032-8; Paik S *et al.* Benefit from adjuvant trastuzumab may not be confined to patients with IHC 3+ and/or FISH positive tumors: Central testing results from NSABP B-31(2007) 25:511-22).

20

[0003] La tecnología de microarray tisular ofrece la oportunidad de un análisis de alto rendimiento de muestras de tejido (Konen, J. *et al.*, Nat. Med. 4:844-7 (1998); Kallioniemi, O. P. *et al.*, Hum. Mol. Genet. 10:657-62 (2001); Rimm, D. L. *et al.*, Cancer J. 7:24-31 (2001)). Por ejemplo, la capacidad de realizar rápidamente estudios a gran escala usando microarrays tisulares puede proporcionar información crítica para identificar y validar dianas farmacológicas y marcadores de pronóstico (por ejemplo, receptor de estrógeno (ER) y HER2/neu), al igual que productos terapéuticos candidatos.

25

[0004] El artículo "Automated localization and quantification of protein multiplexes via multispectral fluorescence imaging" de Teverovskiy M *et al.*, en el 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From nano to macro, 14 de mayo de 2008, en las páginas 300-303, divulga la segmentación automática de marcadores biológicos en imágenes microscópicas.

30

[0005] La presente invención proporciona por primera vez una estandarización completamente automatizada de la cuantificación de biomarcadores *in situ* que minimiza las variaciones de coloración de laboratorio a laboratorio, máquina a máquina, operador a operador y día a día.

35

Resumen de la invención

[0006] La presente invención se refiere a la cuantificación reproducible de expresión de biomarcadores a partir de muestras de tejido, secciones de tejido enteras (WTS) al igual que microarrays tisulares (TMAs), para reducir la variabilidad entre rondas o lotes debido a diferencias en operadores, equipamiento, instalaciones y otros factores. Los sistemas y procesos descritos aquí proporcionan la localización automatizada y la cuantificación de marcadores biológicos con normalización de puntuaciones para reproducibilidad superior entre rondas, independientemente de la ubicación, el operador o la variabilidad de instrumento.

40

45

[0007] Una forma de realización de la invención se refiere a un método de cuantificación de expresión de biomarcadores reproductivamente en una muestra de tejido montada en diapositiva tal y como se define en la reivindicación 1.

[0008] En una forma de realización, el sistema óptico estandarizado incluye una fuente de luz cuya intensidad y variabilidad de trayectoria óptica se han normalizado. En otra forma de realización, el sistema óptico estandarizado permite el ajuste automático del tiempo de exposición para proporcionar una gama dinámica optimizada de datos capturados en los píxeles de la imagen.

50

[0009] En una forma de realización, cada paso de análisis automático se realiza de manera no supervisada.

55

[0010] En una forma de realización, la señal de datos atribuible a dos o más compartimentos celulares es diferenciada.

[0011] En una forma de realización, la cantidad de biomarcadores expresados en cada uno de dos o más compartimentos celulares es cuantificada.

60

[0012] En una forma de realización, la señal de datos atribuible a dos o más compartimentos celulares se diferencia con un intervalo de confianza de aproximadamente 95%.

[0013] En una forma de realización, el método comprende además la evaluación de la calidad de una o más muestras de tejido montadas en diapositiva o una o más imágenes formadas por píxel o una o más partes agrandadas de las mismas.

65

[0014] En una forma de realización, el método proporciona una determinación de punto de corte reproducible.

5 [0015] En una forma de realización, el método proporciona más del 85% de concordancia para clasificación de muestras de una ronda a otra para cada muestra. En otra forma de realización, el método proporciona más del 90% de concordancia para clasificación de muestras de una ronda a otra para cada muestra.

10 [0016] En una forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tienen un nivel de reproducibilidad por encima del 80 por ciento. En otra forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tiene un nivel de reproducibilidad por encima del 90 por ciento. En otra forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de proteína de biomarcadores que tiene un nivel de reproducibilidad por encima del 95 por ciento.

15 [0017] En una forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tiene un nivel de reproducibilidad en el rango de aproximadamente 90 a aproximadamente 97 por ciento.

20 [0018] En una forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo del 20 por ciento. En otra forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo del 10 por ciento. En otra forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo del 5 por ciento. En otra forma de realización, el método proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcadores que tiene un coeficiente de variación (%CV) en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 por ciento.

25 [0019] En una forma de realización, la muestra de tejido montado en diapositiva ha sido manchado con una dilución óptima de uno o más reactivos. En otra forma de realización, dicha dilución óptima produce una o más imágenes formadas por píxeles que tienen una métrica de gama dinámica óptima.

30 [0020] En una forma de realización, el método de la presente invención se implementa mediante un ordenador. En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un medio legible por ordenador que comprende las instrucciones legibles por ordenador almacenadas en el mismo para ejecutar mediante un procesador el método descrito aquí. La invención también se dirige a un medio legible por ordenador que tiene instrucciones legibles por ordenador tal y como se define en la reivindicación 6. Otra forma de realización de la invención es un sistema para cuantificar reproductivamente la expresión de biomarcadores en una muestra de tejido montada en diapositiva tal y como se define en la reivindicación 8.

35 [0021] Otras características, objetos y ventajas de la invención serán aparentes a partir de las siguientes figuras, la descripción detallada y las reivindicaciones.

40 Breve descripción de los dibujos

[0022]

45 La figura 1 muestra una forma de realización de un proceso para cuantificar reproductivamente una cantidad de un biomarcador expresado en cada uno o más de los componentes celulares de una muestra biológica montada en diapositiva que contiene células, tal como una muestra de tejido de un paciente.

La figura 2 muestra una forma de realización de un proceso para etapas de tratamiento de imagen para cuantificar reproductivamente una cantidad de un biomarcador expresado en cada uno o más de los componentes celulares de una muestra biológica montada en diapositiva que contiene células.

50 La figura 3 es un gráfico de caja de resultados HER2 AQUA® Log2-transformados (eje y) categorizado por la puntuación tradicional IHC (eje x) para 543 casos con información de puntuación tanto AQUA® como IHC. El análisis ANOVA unidireccional para comparación de medios a través de todas las categorías fue significativo ($P < 0,001$). El análisis post-hoc utilizando la estadística de Tamhane T2 para múltiples comparaciones muestras diferencias significativas entre cada categoría (todos los P-valores $< 0,05$).

55 Las figuras 4A-C muestran diagramas de cajas que comparan resultados de normalizados Log2-transformados HER2 AQUA® a través de instrumentos (A), operadores (B), y rondas de coloración (C) para 583 casos con promedio indicado de %CV indicado para todos casos.

60 Las figuras 5A-C muestran parcelas de análisis de supervivencia específica de enfermedad de 5 años Kaplan-Meier para (A) un punto de corte determinado de X-tile para los resultados del instrumento 1 HER2 AQUA® que dividen la población en HER2 bajo (84,5%) y HER2 alto (15,5%) mostrando una reducción significativa de 17,8% [Monte Carlo $P < 0,001$; aprendizaje/validación $P = 0,002$] en la supervivencia acumulativa de 75,7 - 57,9%. Este punto de corte fue aplicado al instrumento 2 (B) y al instrumento 3 (C) con relevancia ($P < 0,001$ y $P = 0,004$ respectivamente) y la forma de curva y composición equivalentes para el instrumento 2 [HER2 bajo (83,6%) HER2 alto (16,4%); 15,4% reducción en la supervivencia acumulativa de 75,5 - 60,1%] e instrumento 3 [HER2 bajo (84,9%) HER2 alto (14,1%); 13,5% de reducción en la supervivencia acumulativa de 74,9 - 61,4%].

Las figuras 6A-F muestran tablas de contingencia 2x2 que comparan segregación de población positiva (pos) versus negativa (neg) basada en puntos de corte X-tile generados para la referencia (por ejemplo, instrumento 1) para cada conjunto de instrumentos indicado (A, B), conjunto operador (C, D) y conjunto de ronda (E, F). También se muestran una concordancia general, índices de acuerdo positivo y de acuerdo negativo con 95% de intervalos de confianza.

Las figuras 7A-C son distribuciones de frecuencia separadas en casos de acuerdo negativo, acuerdo positivo y casos sin acuerdo para (A) instrumento 2 (puntuaciones de AQUA®) a instrumento 1 (punto de corte); (B) operador 2 (puntuaciones de AQUA®) a operador 1 (punto de corte); y (C) ronda 2 (puntuaciones de AQUA®) a ronda 1 (punto de corte) para demostrar dónde se produce el desacuerdo en la población de casos de cáncer de mama. Los casos cuyo desacuerdo reside en y alrededor de los puntos de corte indicados y no abarcan toda la distribución.

Las figuras 8A-D ilustran el rendimiento analítico del análisis AQUA® y el ensayo EGFR. (A) gráfico de caja de puntuaciones log(2) transformadas de AQUA® de HER2 para los 748 a lo largo de 3 días de coloración (D), máquinas (M) y operadores (O) con %CV indicado. (B). Análisis de regresión lineal para puntuaciones de EGFR AQUA® generado en la matriz de ensayo de tumor de mama, controles de línea celular y normales (n=152) a lo largo de 3 diapositivas y 3 días de coloración con valores R medios indicados e inclinaciones. (C) Gráfico de caja de puntuaciones log2 transformadas AQUA® de EGFR para 40 tumores de (B) con %CV indicado. (D) Gráfico de caja de puntuaciones log2 transformadas AQUA® de EGFR para 35 líneas celulares (2X redundante) de (B) con %CV indicado.

Las figuras 9A-D muestran los resultados del ejemplo 4, por debajo. Las figuras 9A-C son parcelas de caja de la puntuación Allred de tres patólogos en comparación con la puntuación de AQUA® generada para las mismas muestras. La fig. 9D es una tabla que muestra la correlación entre las puntuaciones Allred y AQUA® para cada patólogo.

Las figuras 10A-B muestran el (A) agrupamiento de pacientes basado en puntuaciones de AQUA® y (B) supervivencia de los grupos reagrupados, como se describe en el ejemplo 4.

Las figuras 11A-B comparan la supervivencia específica de enfermedad de cinco años utilizando la puntuación de Allred (A) y la puntuación de AQUA® (B).

Las figuras 12A-B ilustran la comparación de puntuaciones de expresión de ER determinadas por 3 patólogos que leen la misma diapositiva TMA utilizando el método de puntuación Allred (A) y la comparación de las puntuaciones AQUA de expresión ER determinadas por los instrumentos 3 PM-2000 que leen la misma diapositiva TMA (B).

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

[0023] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí generalmente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un técnico en la materia a la que pertenece esta invención. Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares. Generalmente, la nomenclatura que aquí se usa y los procedimientos de laboratorio de la biología celular, inmunohistoquímica y formación de imágenes (por ejemplo, células y tejido) descritas abajo son aquellas bien conocidas y empleadas de forma común en la técnica.

[0024] Se debe apreciar que las aplicaciones particulares mostradas y descritas aquí son ejemplos de la presente invención y no están destinadas a limitar de otro modo el alcance de la presente invención de manera alguna. Además, las técnicas son adecuadas para aplicaciones en teleconferencia, visión robótica, vehículos no tripulados o cualquier otra aplicación similar.

[0025] Técnicas adecuadas para su uso en la presente invención también pueden encontrarse en la aplicación de EE.UU. n°: 12/153,171, solicitada el 14 de mayo de 2008; la aplicación de EE.UU. n° 12/139,370, solicitada el 13 de junio de 2008; la aplicación de EE.UU. n° 12/186,294, solicitada el 5 de agosto de 2008; la aplicación de EE.UU. n° 12/188,133, solicitada el 7 de agosto de 2008; y la aplicación de EE.UU. n° 12/201,753, solicitada el 29 de agosto de 2008.

[0026] La figura 1 muestra un proceso para cuantificar reproductivamente una cantidad de un biomarcador expresado en cada uno o varios componentes celulares de una muestra biológica montada en la diapositiva que contiene células, tal como una muestra de tejido de un paciente. El proceso 100 se inicia por obtención de una muestra biológica montada en la diapositiva manchada que contiene células 105, donde la mancha se ha aplicado en cierto modo para permitir localizar al menos un compartimento celular y al menos un biomarcador. Dicho al menos un compartimento celular incluye, pero no está limitado a, un citoplasma, un núcleo y una pared celular. Al menos un biomarcador puede incluir un biomarcador marcado o detectado vía una señal fluorescente CY5, usada para detectar una célula tumoral. Ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, HER2, ER, PR, EGFR, ERCC1, TS y similares.

[0027] El proceso 100 continúa por obtención de una imagen o conjunto de imágenes formadas por píxeles de la muestra de tejido manchada 110. La imagen o conjunto de imágenes formadas por píxeles pueden tomarse utilizando un sistema óptico estandarizado, tal como un sistema de microscopio óptico, que incluye una fuente luminosa. La imagen formada por píxeles se puede obtener a través del sistema óptico estandarizado utilizando un sensor de imagen digital, tal como una cámara digital. En algunas formas de realización, la imagen digital puede tomarse por una cámara

fotográfica analógica, por lo cual la imagen análoga resultante o película se digitaliza por un escáner digital o medios equivalentes. En al menos algunas formas de realización, la cámara fotográfica se puede montar directa o indirectamente en un microscopio para obtener una imagen formada por píxeles en forma de una micrografía. Alternativamente o además de, la cámara fotográfica puede depender de una conexión directa a una línea de salida de vídeo en un sistema de formación de imágenes existente. En algunas formas de realización, la fuente luminosa incluye luz con longitudes de onda en uno o más de los espectros visibles, el espectro infrarrojo (IR), y el espectro ultravioleta (UV). La cámara fotográfica puede ser una videocámara o una secuencia fotográfica con lapso de tiempo, que proporcione imágenes en tiempo real y en tiempo transcurrido que contengan actividad celular dinámica.

[0028] La imagen formada por píxeles obtenida por el proceso 100 se analiza luego para derivar uno o más conjuntos de datos desde los píxeles de imagen para diferenciar una señal de datos del ruido 115. Este análisis se puede realizar automáticamente, por ejemplo, utilizando un procesador. El procesador puede incluir uno o varios procesadores informáticos, controlables según un conjunto de instrucciones preprogramadas. En algunas formas de realización, diferenciar una señal de datos del ruido incluye un análisis estadístico de la señal, por ejemplo un análisis de agrupación no supervisada dando como resultado segregación de píxeles con señal de los píxeles que tienen señal atribuible al ruido. En algunas formas de realización, diferenciar una señal de datos del ruido puede incluir la sustracción de una imagen focalizada de la muestra de tejido montada en la diapositiva a partir de una imagen desenfocada de la muestra de tejido montada en la diapositiva. En algunas formas de realización, la imagen desenfocada puede incluir una imagen focalizada justo por debajo de la muestra de tejido montada en la diapositiva. En general, desenfocar una imagen actúa como un filtro de paso bajo espacial, permitiendo una medición de fondo a la que la señal de datos se puede comparar.

[0029] Después, la imagen formada por píxeles obtenida por el proceso 100 se analiza para derivar uno o varios conjuntos de datos de los píxeles de la imagen para diferenciar señales de datos atribuibles a cada uno del al menos un compartimento celular 120. Este análisis puede también realizarse automáticamente, por ejemplo, utilizando un ordenador preprogramado o un procesador dedicado a un fin especial. En algunas formas de realización, la diferenciación puede depender de una fluorescencia atribuible a un marcador o mancha aplicada a la muestra montada en la diapositiva. En algunas formas de realización, la fluorescencia de las manchas dirigida a al menos un compartimento celular varía en la longitud de onda. En algunas formas de realización, una fluorescencia azul puede estar asociada a un receptor de núcleo (DAPI), una fluorescencia verde puede estar asociada a un receptor de citoplasma celular (citoqueratina), y una fluorescencia roja puede estar asociada a un receptor de membrana celular (alfa-catenina).

[0030] Preferiblemente, la mancha se aplica de manera que permita la localización de al menos un compartimento celular y al menos un biomarcador. En algunas formas de realización, al menos un biomarcador, previamente descrito en 105, se utiliza para detectar una célula tumoral o una proteína objetivo o un antígeno objetivo y puede ser una indicación de una célula tumoral en la muestra de tejido montada en la diapositiva. El proceso 100 incluye un paso para asociar o de otro modo correlacionar las señales de datos previamente diferenciadas atribuibles a cada uno de los al menos un compartimento celular 120 con la célula tumoral detectada o máscara tumoral. Al hacer esto, uno o más conjuntos de datos derivados de los píxeles de la imagen se analizan automáticamente para diferenciar una señal de datos atribuible a al menos un biomarcador para cada uno de los al menos un compartimento celular 125. El proceso 100 cuantifica reproductivamente la cantidad de biomarcador expresada en al menos uno de los al menos un compartimento celular para la muestra de tejido montada en la diapositiva 130.

[0031] La figura 2 muestra un proceso detallado 200 para los pasos del tratamiento de imágenes para cuantificar reproductivamente una cantidad de un biomarcador expresado en cada uno de uno o más componentes celulares de una muestra montada en la diapositiva. El proceso 200 se inicia por obteniendo una imagen digital de una muestra de tejido manchada 205. La imagen digital se obtiene de una manera similar a la descrita en los pasos 105, 110 en el método 100. Después, el proceso 200 dirige la calidad de la imagen que se va a evaluar para integridad de señal 210, integridad de muestra 215 e integridad de imagen 220. Si una o más pruebas de calidad de imagen de integridad de señal 210, integridad de muestra 215 e integridad de imagen 220 fallan, la imagen digital se puede retirar del análisis o se puede marcar para una revisión manual de la imagen digital por el operador 225 para bien aceptar la imagen digital para análisis o bien eliminar el imagen digital del análisis 226.

[0032] Pasar pruebas de calidad de imagen para integridad de señal 210, integridad de muestra 215 e integridad de imagen 220 o pasar una revisión manual de la imagen digital 225 identifica la imagen digital como un candidato para más procesamiento de imagen en el proceso 200. No pasar las pruebas de calidad de imagen para una o más de la integridad de señal 210, integridad de muestra 215 e integridad de imagen 220 y no pasar una revisión manual de la imagen digital 225 identifica la imagen digital como de baja calidad, y la imagen digital es rechazada. En resumen, la integridad de señal incluye una compartimentación celular, una intensidad de fluorescencia y una evaluación del porcentaje de píxel saturado. La saturación se puede evaluar determinando que un número predeterminado de píxeles en la imagen formada por píxeles está representado por datos y estructuras de datos que incluyen un valor máximo o cerca del máximo. La integridad de muestra incluye una determinación de que una muestra suficiente de interés (por ejemplo, tejido tumoral) esté presente para análisis. La integridad de imagen incluye, por ejemplo, una detección de cualquier imagen desenfocada, y en el caso de TMAs, análisis y detección de cualquier imagen dividida.

[0033] Mientras la invención ha sido descrita con relación a las formas de realización específicas de la misma, se entiende que es capaz de más modificación. Además, esta aplicación se destina a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención, incluyendo tales desviaciones desde la presente divulgación que estén dentro de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que la invención pertenece, y que estén dentro del campo de las reivindicaciones anexas.

[0034] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan aquí por referencia como si cada publicación, patente o solicitud de patente individual fuera específicamente e individualmente incorporada por referencia.

Muestras

[0035] Cualquier muestra que contenga células se puede analizar por los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la muestra se puede preparar a partir de tejidos recogidos de pacientes. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra biológica que contiene células tal como una muestra de sangre, muestra de médula ósea o una línea celular. Las muestras pueden ser de tejido entero o secciones de TMA en diapositivas de microscopio. Particularmente cuando se usan microarrays de tejido (TMAs), las muestras pueden estar dispuestas como "puntos" o "histopuntos" en una diapositiva, con cada histopunto correspondiente a una muestra particular. Tales métodos para preparar muestras de tejido montadas en diapositiva se conocen bien en la técnica y son adecuados para su uso en la presente invención.

Marcadores biológicos

[0036] Como se utiliza en este caso, un biomarcador es una molécula que se puede medir en una muestra biológica como un indicador de tipo de tejido, normal o patógeno, o una respuesta a una intervención terapéutica. En una forma de realización particular, el biomarcador es seleccionado del grupo que consiste en: una proteína, un péptido, un ácido nucleico, un lípido y un carbohidrato. Más particularmente, el biomarcador puede ser una proteína. Ciertos marcadores son característicos de células particulares, mientras que otros marcadores han sido identificados como asociados a una enfermedad o condición particular. Ejemplos de marcadores pronósticos conocidos incluyen marcadores enzimáticos tales como, por ejemplo, galactosil transferasa II, enolasa específica de neurona, protón ATPasa-2 y fosfatasa ácida. Marcadores de hormona o de receptor de hormonas incluyen gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona adrenocorticotrópica, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de la próstata (PSA), receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de andrógeno, receptor de complemento gC1q-R/p33, receptor IL-2, receptor de neurotrofina p75, receptor de PTH, receptor de la hormona tiroidea y receptor de insulina.

[0037] Marcadores linfoides incluyen alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, marcador de célula B, bcl-2, bcl-6, antígeno de linfocito B 36 kD, BM1 (marcador mielóide), BM2 (marcador mielóide), galectina-3, granzima B, antígeno de HLA de clase I, antígeno de HLA de clase II (DP), antígeno de HLA de clase II (DQ), antígeno de HLA de clase II (DR), defensinas neutrofílicas humanas, inmunoglobulina A, inmunoglobulina D, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M, cadena ligera kappa, cadena ligera kappa, cadena ligera lambda, antígeno de linfocito/histocito, marcador macrófago, muramidasa (lisozima), quinasa de linfoma anaplásico p80, marcador de células plasmáticas, inhibidor de proteasa de leucocito secretor, receptor de antígeno de célula T (JOVI 1), receptor de antígeno de célula T (JOVI 3), desoxinucleotidil transferasa terminal, marcador de célula B no agrupado.

[0038] Marcadores tumorales incluyen alfa fetoproteína, apolipoproteína D, BAG-1 (RAP46 proteína), CA19-9 (sialil lewisa), CA50 (antígeno de mucina asociado al carcinoma), CA125 (antígeno de cáncer ovárico), CA242 (antígeno de mucina asociada a tumor), cromogranina A, clusterina (apolipoproteína J), antígeno de membrana epitelial, antígeno relacionado con el epitelio, antígeno específico del epitelio, receptor de factor de crecimiento epidérmico, receptor de estrógeno (ER), proteina-15 del fluido de la enfermedad quística gruesa, antígeno específico de hepatocito, HER2, heregulina, mucina gástrica humana, glóbulo de grasa de leche humana, MAGE-1, metaloproteinasas matriciales, melan A, marcador de melanoma (HMB45), mesotelina, metalotioneína, factor de transcripción de microphthalmia (MITF), glicoproteína de núcleo Muc-1, glicoproteína Muc-1, glicoproteína Muc-2, glicoproteína Muc-5AC, glicoproteína Muc-6, mieloperoxidasa, Myf-3 (marcador de rhabdomyosarcoma), Myf-4 (marcador de rhabdomyosarcoma), MyoD1 (marcador de rhabdomyosarcoma), mioglobina, proteína nm23, fosfatasa alcalina de placenta, prealbúmina, receptor de progesterona, antígeno específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática, péptido de inhibina prostática, PTEN, marcador de carcinoma de célula renal, antígeno mucinoso del intestino delgado, tetranectina, factor-1 de transcripción de tiroides, inhibidor de tejido de loproteinasa 1 de metal de matriz, inhibidor de tejido de metaloproteinasas 2 de matriz, tirosinasa, proteína-1 relacionada con la tirosinasa, vilina, factor de von Willebrand, CD34, CD34, clase II, CD51 Ab-1, CD63, CD69, Chk1, Chk2, claspina C-met, COX6C, CREB, ciclina D1, citoqueratina, citoqueratina 8, DAPI, desmina, DHP (1-6 difeñil-1,3,5-hexatrieno), E-cadherina, EEA1, EGFR, EGFRvIII, EMA (antígeno de membrana epitelial), ER, ERB3, ERCC1, ERK, E-selectina, FAK fibronectina, FDXP3, gamma-H2AX, GB3, GFAP, giantina, GM130, golgina 97, GRB2, GRP78BiP, GSK3 Beta, HER-2, histona 3, histona 3_K14-Ace [anti-acetil-histona H3 (Lys 14)], histona 3_K18-Ace [histona H3-acetil Lys 18], histona 3_K27-TriMe, [histona H3 (trimetil K27)], histona 3_K4-diMe [anti-dimetil-histona H3 (Lys 4)], histona 3_K9-Ace [acetil-histona H3 (Lys 9)], histona 3_K9-triMe [histona 3-trimetil Lys 9], histona 3_S10-Phos [anti-fosfo histona H3 (Ser 10), marcador de Mitosis], histona 4, histona H2A.X_S139-Phos [fosfo histona H2A.X (Ser139)anticuerpo], histona, h2B histona H3_DiMetil K4, histona H4_TriMetil K20-Chip grad, HSP70, uroquinasa, VEGF R1, ICAM-1, IGF-1, IGF-1R, IGF-1 beta Receptor, IGF-II IGF-IIR, IKB-alfa IKKE, IL6, IL8, integrina alfa V beta 3,

integrina alfa V beta 6, integrina alfa V / CD51, integrina B5, integrina B6, integrina B8, integrina Beta 1 (CD 29), integrina beta 3, integrina beta 5 integrinaB6, IRS-1, Jagged 1, quinasa antiproteína C Beta2, LAMP-1, cadena ligera Ab-4 (cóctel), cadena ligera lambda, cadena ligera kappa, M6P Mach 2, MAPKAPK-2, MEK 1, MEK 1/2 (Ps222), MEK 2, MEK1/2 (47E6), MEK1/2 péptido bloqueante, MET/HGFR, MGMT, antígeno mitocondrial, Mitotracker Green FM, MMP-2, MMP9, E-cadherina, mTOR, ATPasa, N-cadherina, nefrina, NFkB, NFkB p105/p50, NF-KB P65, Notch 1, Notch 2, Notch 3, OxPhos complejo IV, , p130Cas, p38 MAPK, p44/42 MAPK anticuerpo, P504S, P53, P70, P70 S6K, pan cadherina, paxilina, p-cadherina, PDI, pEGFR, fosfo AKT, fosfo CREB, receptor de fosfo EGF, fosfo GSK3 Beta, fosfo H3, fosfo HSP-70, fosfo MAPKAPK-2, fosfo MEK/2, fosfo p38 MAP quinasa, fosfo p44/42 MAPK, fosfo p53, fosfo PKC, fosfo S6 proteína ribosómica, fosfo Src, fosfo-Akt, fosfo-Bad fosfo-IkB-a, fosfo-mTOR, fosfo-NF-kappaB p65, fosfo-p38, Phospho-p44/42 MAPK, fosfo-p70 S6 quinasa, fosfo-Rb, fosfo-Smad2, PIM1, PIM2, PKCβ podocalixina, PR, PTEN, R1, Rb 4H1, R-cadherina, ribonucleótido reductasa, RRM1, RRM11, SLC7A5, NDRG, HTF9C, HTF9C, CEACAM, p33, S6 proteína ribosómica, Src, survivina, sinapopodina, sindecan 4, talina, tensina, timidilato sintasa, tubulina, VCAM-1, VEGF, vimentina, Aglutinina, YES, ZAP-70 y ZEB.

[0039] Marcadores asociados de ciclo celular incluyen factor activador de proteasa apoptótica 1, bcl-w bcl-x, bromodesoxiuridina, CAK (quinasa de cdk-activación), proteína de susceptibilidad a apoptosis celular (CAS), caspasa 2, caspasa 8; CPP32 (caspasa -3), CPP32 (caspasa -3), quinasas dependientes de ciclina, ciclina un, ciclina B1, ciclina D1, ciclina D2, ciclina D3, ciclina e, ciclina G, (N-término) de factor de fragmentación de ADN, Fas (CD95), proteína de dominio de muerte asociada a Fas, ligando Fas, Fen-1; IPO-38, Mcl-1, proteínas de mantenimiento de minicromosoma, proteína de reparación de desajuste (MSH2), poli (ADP-Ribosa) polimerasa, antígeno nuclear de proliferación celular, p16 proteína, p27 proteína, p34cdc2; p57 proteína (Kip2), p105 proteína, alfa de estadística 1, topoisomerasa I, topoisomerasa II alfa, topoisomerasa III alfa, topoisomerasa II beta.

[0040] Tejido neuronal y marcadores de tumor incluyen alfa B cristalina, alfa-internexina, alfa-sinucleína, proteína amiloide precursora, beta-amiloide, calbindina, colina acetiltransferasa, transportador de ácido de aminoácido excitatorio 1; GAP43, proteína ácida fibrilar glial, receptor de glutamato 2, proteína básica de la mielina, receptor de factor de crecimiento de nervio (gp75), marcador de neuroblastoma, neurofilamento 68 kD, neurofilamento 160 kD, neurofilamento 200 kD, enolasa específica de neurona, receptor de acetilcolina nicotínica alpha4, receptor de acetilcolina nicotínica beta2, periferina, producto génico de proteína 9; S-100 proteína, Serotonina, SNAP-25, sinapsina I, sinaptofisina, tau, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, ubiquitina.

[0041] Marcadores de diferenciación de agrupación incluyen CD1a, CD1b, CD1 c, CD1d, CD1e, CD2, CD3delta, CD3epsilon, CD3gamma, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8alpha, CD8beta, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CDw17, CD 18, CD 19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CDw93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CD109, CD114, CD115, CD116, CD117, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CDw125, CD126, CD127, CDw128a, CDw128b, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CDw150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 y TCR-zeta.

[0042] Otros marcadores celulares incluyen proteína-F centrómero (CENP-F), giantina, involucrina, lamina A&C [XB 10], LAP-70, mucina, proteínas de complejo de poro nuclear, proteína del cuerpo lamelar p180, ran, r, catepsina D, proteína Ps2, Her2-neu, P53, S100, antígeno de marcador epitelial (EMA), TdT, MB2, MB3, PCNA y Ki67.

50 Coloración de tejido

[0043] Muestras que contienen células se pueden manchar utilizando cualquier reactivo o etiqueta biomarcadora, tal como colorantes o manchas, histoquímicos o inmunohistoquímicos que directamente reaccionan con los marcadores biológicos específicos o con varios tipos de células o compartimentos celulares. No todas las manchas/reactivos son compatibles. Por lo tanto el tipo de manchas empleado y su secuencia de aplicación deberían ser bien considerados, pero pueden ser fácilmente determinados por un experto en la materia. Tales histoquímicos pueden ser cromóforos detectables por microscopía de transmisión o fluoróforos detectables por microscopía de fluorescencia. En general, muestras que contienen células se pueden incubar con una solución que comprende al menos un histoquímico, que directamente reaccionará o se enlazarán con grupos químicos del objetivo. Algunos histoquímicos deben ser coincubados con un mordiente o metal para permitir la coloración. Una muestra que contiene células se puede incubar con una mezcla de al menos un histoquímico que manche un componente de interés y otro histoquímico que actúe como una contratinción y se enlaza con una región fuera del componente de interés. Alternativamente, mezclas de sondas múltiples se pueden utilizar en la coloración, y proporcionar una forma de identificar las posiciones de sondas específicas. Procedimientos para manchar muestras que contienen células se conocen bien en la técnica.

[0044] La siguiente lista no limitativa proporciona cromóforos ilustrativos que se pueden utilizar como agentes de formación de imágenes histológicas (manchas o contratinciones) y sus células objetivo, compartimentos celulares, o componentes celulares: eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), hematoxilina (ácidos nucleicos), Naranja G (células de glándula pituitaria, sangre roja y páncreas), Verde Claro SF (colágeno), Romanowsky-Giemsa (morfología celular total), May-Grunwald (glóbulos rojos), contratinción azul (Trevigen), verde etil (CAS) (amiloides), Feulgen-Naphthol amarillo S (ADN), Giemsa (diferencialmente mancha varios compartimentos celulares), verde metil (amiloides), pironina (ácidos nucleicos), naftanol-amarillo (glóbulos rojos), rojo neutro (nucleico), tinción de Papanicolaou (que incluye típicamente una mezcla de hematoxilina, eosina Y, naranja G y mezcla Bismarck marrón (morfología celular total), contratinción rojo B (Trevigen), contratinción rojo C (Trevigen), Rojo de sirio (amiloides), reactivo Feulgen (pararosanilina) (ADN), cromo-alúmina de galocianina (ADN), cromo-alúmina de galocianina y naftol amarillo S (ADN), metil verde-pironina Y (ADN), reactivo de tionina-Feulgen (ADN), naranja de acridina (ADN), azul de metileno (ARN y ADN), azul de toluidina (ARN y ADN), azul de alciano (carbohidratos), rojo de rutenio (carbohidratos), negro de Sudán (lípidos), Sudán IV (lípidos), aceite Rojo-O (lípidos), mancha de tricromo de Van Gieson (fucsina ácida y mezcla ácido pírico) (células musculares), mancha de tricromo de Masson (hematoxilina, fucsina ácida y mezcla de verde claro) (mancha colágeno, citoplasma, nucleolos diferentemente), fucsina de aldehído (fibras de elastina) y mancha de Weigert (diferencia fibras reticulares y de colágeno). Una lista exhaustiva de tales manchas, su descripción y su uso general se da en R. D. Lillie, "Conn's Biological Stains", 8th ed., Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md. (1969). Mordientes adecuados y composiciones de lo anterior son bien conocidos por un experto en la técnica.

[0045] La siguiente lista no limitativa proporciona manchas histológicas fluorescentes ilustrativas y sus células objetivo, compartimentos celulares o componentes celulares si es aplicable: 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ácidos nucleicos), eosina (componentes celulares alcalinos, citoplasma), Hoechst 33258 y Hoechst 33342 (dos bisbenzimidaz) (ácidos nucleicos), yoduro de propidio (ácidos nucleicos), naranja de espectro (ácidos nucleicos), verde de espectro (ácidos nucleicos), quinacrina (ácidos nucleicos), fluoresceína-faloidina (fibras de actina), cromomicina A 3 (ácidos nucleicos), reacción de acriflavina-Feulgen (ácido nucleico), reacción auramina O-F-eulgen (ácidos nucleicos), bromuro de etidio (nucleico ácidos). Manchas de Nissl (neuronas), fluoróforos de ADN de alta afinidad tales como POPO, BOBO, YOYO y TOTO y otros, y proteína verde fluorescente fusionada con proteína de unión al ADN, tales como histonas, ACMA, naranja de quinacrina y acridina.

[0046] Una amplia variedad de sondas específicas de orgánulos fluorescentes patentados están disponibles comercialmente, e incluyen sondas específicas de mitocondria (colorantes MitoFluor y MitoTracker), retículo endoplásmico (ER) y sondas de Golgi (ER-Tracker y varios conjugados de ceramida), y sondas lisosómicas (colorantes LysoTracker). Estas sondas, al igual que muchos histoquímicos fluorescentes no patentados, están disponibles de y ampliamente descritos en Handbook of Fluorescent Probes and Research Products 8th Ed. (2001), disponible de Molecular Probes, Eugene, OR.

[0047] Cada muestra que contiene células se puede coincubar con sustratos apropiados para una enzima que sea un componente celular de interés y reactivos apropiados que produzcan precipitados coloreados en los sitios de actividad enzimática. Tales manchas histoquímicas enzimáticas son específicas para la enzima objetivo particular. La coloración con manchas histoquímicas enzimáticas se puede utilizar para definir un componente celular o un tipo particular de célula. Alternativamente, las manchas histoquímicas enzimáticas se pueden utilizar diagnósticamente para cuantificar la cantidad de actividad enzimática en las células. Una amplia variedad de sustratos enzimáticos y ensayos de detección se conocen y están descritos en la técnica.

[0048] Fosfatasa ácida se pueden detectar a través de diferentes métodos. En el método de Gomori para fosfatasa ácida, una preparación celular se incuba con glicerofosfato y nitrato de plomo. La enzima libera fosfato, que combina con plomo para producir fosfato de plomo, un precipitado incoloro. El tejido se sumerge luego en una solución de sulfuro de amonio, que reacciona con fosfato de plomo para formar sulfuro de plomo, un precipitado negro. Alternativamente, las células se pueden incubar con una solución que comprende pararosanilina-HCl, nitrito de sodio, naftolo ASB1 fosfato (sustrato) y tampón de acetato de veronal. Este método produce un precipitado rojo en las áreas de actividad de fosfatasa ácida. Debido a su contenido característico de fosfatasa ácida, lisosomas se pueden distinguir de otros gránulos citoplásmicos y orgánulos a través del uso de este ensayo.

[0049] Deshidrogenasas se pueden localizar por incubación de células con un sustrato apropiado para las especies de deshidrogenasa y tetrazol. La enzima transfiere iones de hidrógeno desde el sustrato al tetrazol, tetrazol reduciendo el tetrazol en formazán, un precipitado oscuro. Por ejemplo, NADH deshidrogenasa es un componente del complejo I de la cadena respiratoria y se localiza predominantemente en la mitocondria.

[0050] Otras enzimas para las que técnicas de coloración bien conocidas se han desarrollado, y sus ubicaciones celulares primarias o actividades, incluyen, pero de forma no limitativa, los siguientes: ATPasas (fibras musculares), succinato deshidrogenasas (mitocondria), citocromo c oxidasa (mitocondria), fosforilasas (mitocondria), fosfofructoquinasas (mitocondria), acetil colinesterasas (células nerviosas), lactasas (intestino delgado), leucina aminopeptidasas (células de hígado), mioadenilato deaminasas (células musculares), NADH diaforasas (eritrocitos) y sacarosas (intestino delgado).

65

- [0051] La inmunohistoquímica está entre las técnicas histoquímicas más sensible y específicas. Cada muestra t se puede combinar con una composición de enlace marcada que comprende una sonda de unión específica. Varias etiquetas pueden ser empleadas, tales como fluoróforos, o enzimas que producen un producto que absorbe luz o fluoresce. Se conocen una amplia variedad de etiquetas que proporcionan señales fuertes con respecto a un único evento de unión. Sondas múltiples usadas en la coloración se pueden marcar con más de un marcador fluorescente distinguible. Estas diferencias de color proporcionan una forma de identificar las posiciones de sondas específicas. El método de preparación de conjugados de fluoróforos y proteínas, tales como anticuerpos, está extensivamente descrito en la bibliografía y no requiere ejemplificación aquí.
- [0052] Aunque hay al menos 120.000 anticuerpos disponibles comercialmente, anticuerpos primarios ejemplares, que se conocen por enlazar específicamente componentes celulares y que se emplean actualmente como componentes en manchas inmunohistoquímicas usadas para investigación y, en casos limitados, para el diagnóstico de varias enfermedades, incluyen, por ejemplo, anticuerpo receptor anti-estrógeno (cáncer de mama), anticuerpo receptor anti-progesterona (cáncer de mama), anticuerpos anti-p53 (cánceres múltiples), anticuerpo anti-Her-2/neu (cánceres múltiples), anticuerpo anti-EGFR (factor de crecimiento epidérmico, cánceres múltiples), anticuerpos anti-catepsina D (cáncer de mama y otros), anticuerpos anti-Bcl-2 (células apoptóticas), anticuerpo anti-E-cadherina, anticuerpos anti-CA125 (cáncer ovárico y otros cánceres), anticuerpos anti-CA15-3 (cáncer de mama), anticuerpos anti-CA19-9 (cáncer de colon), anticuerpo anti-c-erbB-2, anticuerpo anti-P-glicoproteína, (MDR, resistencia a multifármacos), anticuerpo anti-CEA (antígeno carcinoembrionario), anticuerpo de proteína anti-retinoblastoma (Rb), anticuerpo de oncoproteína anti-ras (p21), anticuerpo anti-Lewis X (también llamado CD15), anticuerpos anti-Ki-67 (proliferación celular), anticuerpo anti-PCNA (cánceres múltiples), anticuerpos anti-CD3 (células T), anticuerpos anti-CD4 (células T auxiliares), anticuerpos anti-CD5 (células T), anticuerpos anti-CD7 (timocitos, células T inmaduras, células asesinas NK), anticuerpos anti-CD8 (células T supresoras), anticuerpos anti-CD9/p24 (todos), anticuerpos anti-CD10 (también llamados CALLA) (leucemia linfoblástica aguda común), anticuerpo anti-CD11c (monocitos, granulocitos, AML) anticuerpos anti-CD 13 (células mielomonocíticas, AML), anticuerpos anti-CD14 (monocitos maduros, granulocitos), anticuerpos anti-CD 15 (enfermedad de Hodgkin), anticuerpos anti-CD19 (células B), anticuerpos anti-CD20 (células B), anticuerpos anti-CD22 (células B), anticuerpos anti-CD23 (células B activadas, CLL), anticuerpos anti-CD30 (células T y B activadas, enfermedad de Hodgkin), anticuerpos anti-CD31 (marcador de angiogénesis), anticuerpos anti-CD33 (células mieloides, AML), anticuerpos anti-CD34 (células madre endoteliales, tumores estromales), anticuerpos anti-CD35 (células dendríticas), anticuerpos anti-CD38 (células de plasma, células T, B y mieloides activadas), anticuerpos anti-CD41 (plaquetas, megacariocitos), anticuerpos anti-LCA/CD45 (antígeno común de leucocito), anticuerpo anti-CD45RO (células T inductoras auxiliares), anticuerpo anti-CD45RA (células B), anti-CD39, anticuerpo CD100, anticuerpo anti-CD95/Fas (apoptosis), anticuerpos anti-CD99 (marcador de sarcoma de Ewings, producto génico MIC2), anticuerpo anti-CD106 (VCAM-1; células endoteliales activadas), anticuerpo anti-ubiquitina (enfermedad de Alzheimer), anticuerpo anti-CD71 (receptor de transferrina), anticuerpo anti-c-myc (oncoproteína y un hapteno), anticuerpo anti-citoqueratinas (receptor de transferrina), anticuerpo anti-vimentinas (células endoteliales) (células B y T), anticuerpo de proteínas anti-HPV (papilomavirus humano), anticuerpo de cadenas ligeras anti-kappa (célula B), anticuerpo de cadenas ligeras anti-lambda (célula B), (HMB45) anticuerpo anti-melanosomas (melanoma), anticuerpo antígeno específico anti-próstata (PSA) (cáncer de próstata), anticuerpo anti-S-100 (melanoma, células salivales gliales), anticuerpo antígeno anti-tau (enfermedad de Alzheimer), anticuerpo anti-fibrina (células epiteliales), anticuerpo anti-queratinas, anticuerpo anti-citoqueratina (tumor), anti-alfa-catenina (membrana celular), anticuerpo anti-Tn-antígeno (carcinoma de colon, adenocarcinomas y cáncer pancreático); anticuerpo anti-1,8-ANS (ácido de naftaleno-8-sulfónico de 1-anilino); anticuerpo anti-C4; anticuerpo anti-2C4 grado CASP; anticuerpo anti-2C4 CASP α ; anticuerpo anti-HER-2; anticuerpo cristalino anti-alfa B; anticuerpo anti-alfa galactosidasa A; anticuerpo anti-alfa-catenina; anticuerpo antihumano VEGF R1 (Flt-1); anticuerpo anti-integrina B5; anticuerpo anti-integrina beta 6; anticuerpo anti-fosfo-SRC; anticuerpo anti-Bak; anticuerpo anti-BCL-2; anticuerpo anti-BCL-6; anticuerpo anti-Beta catenina; anticuerpo anti-Beta catenina; anticuerpo anti-integrina alfa V beta 3; anticuerpo anti-c ErbB-2 Ab-12; anticuerpo anti-calnexina; anticuerpo anti-calreticulina; anticuerpo anti-calreticulina; anticuerpo anti-CAM5,2 (anti-citoqueratina bajo peso molecular); anticuerpo anti-cardiotina (R2G); anticuerpo anti-catepsina D; anticuerpo policlonal de pollo para galactosidasa alfa; anticuerpo anti-c-Met; anticuerpo anti-CREB; anticuerpo anti-COX6C; anticuerpo anti-ciclina D1Ab-4; anticuerpo anti-citoqueratina; anticuerpo anti-desmina; anticuerpo anti-DHP (1-6 Difeinil-1,3,5-Hexatrieno); anticuerpo DSB-X biotina de cabra anti pollo; anticuerpo anti-E-cadherina; anticuerpo anti-EEA1; anticuerpo anti-EGFR; anticuerpo anti-EMA (antígeno de membrana epitelial); anticuerpo anti-ER (receptor de estrógeno); anticuerpo anti-ERB3; anticuerpo anti-ERCC1 ERK (Pan ERK); anticuerpo anti-E-selectina; anticuerpo anti-FAK; anticuerpo anti-fibronectina; anticuerpo IgM de FITC-cabra anti ratón; anticuerpo anti-FOXP3; anticuerpo anti-GB3; anticuerpo anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial); anticuerpo anti-giantina; anticuerpo anti-GM130; anticuerpo anti-cabra a h Met; anticuerpo anti-Golgina 97; anticuerpo anti-GRB2; anticuerpo anti-GRP78BiP; anticuerpo anti-GSK-3Beta; anticuerpo anti-hepatocito; anticuerpo anti-HER-2; anticuerpo anti-HER-3; anticuerpo anti-histona 3; anticuerpo anti-histona 4; anticuerpo anti-histona H2A X; anticuerpo anti-histona H2B; anticuerpo anti-HSP70; anticuerpo anti-ICAM-1; anticuerpo anti-IGF-1; anticuerpo receptor anti-IGF-1; anticuerpo beta receptor anti-IGF-1; anticuerpo anti-IGF-II; anticuerpo anti-IKB-alfa; anticuerpo anti-IL6; anticuerpo anti-IL8; anticuerpo anti-integrina beta 3; anticuerpo anti-integrina beta 5; anticuerpo anti-integrina b8; anticuerpo anti-Jagged 1; anticuerpo antiproteína quinasa C Beta2; anticuerpo anti-LAMP-1; anticuerpo anti-M6P (Receptor de manosa 6-Fosfato); anticuerpo anti-MAPKAPK-2; anticuerpo anti-MEK 1; anticuerpo anti-MEK 2; anticuerpo de antígeno anti-mitocondrial; anticuerpo de marcador anti-mitocondrial; anticuerpo FM verde anti-Mitotracker; anticuerpo anti-MMP-2; anticuerpo anti-MMP9; anticuerpo anti-Na⁺/K ATPasa; anticuerpo anti-Na⁺/K ATPasa alfa 1; anticuerpo anti-Na⁺/K ATPasa Alfa 3; anticuerpo anti-N-cadherina; anticuerpo anti-nefrina; anticuerpo anti-NF- κ B p50; anticuerpo anti-NF- κ B P65;

anticuerpo anti-Notch 1; anticuerpo anti-OxPhos complejo IV - Alexa488 conjugado; anticuerpo anti-p130Cas; anticuerpo anti-P38 MAPK; anticuerpo anti-p44/42 MAPK; anticuerpo anti-P504S clon 13H4; anticuerpo anti-P53; anticuerpo anti-P70 S6K; anticuerpo de péptido bloqueante de anti-P70 fosfo quinasa; anticuerpo de cadherina anti-Pan; anticuerpo de anti-paxilina; anticuerpo anti-P-Cadherina; anticuerpo anti-PDI; anticuerpo anti-fosfo AKT; anticuerpo anti-fosfo CREB; anticuerpo anti-fosfo GSK-3-beta; anticuerpo anti-fosfo GSK-3 Beta; anticuerpo anti-fosfo H3; anticuerpo anti-fosfo MAPKAPK-2; anticuerpo anti-fosfo MEK; anticuerpo anti-fosfo p44/42 MAPK; anticuerpo anti-fosfo p53; anticuerpo anti-Fosfo-NF- κ B p65; anticuerpo anti-Phospho-p70 S6 quinasa; anticuerpo anti-fosfo PKC (Pan); anticuerpo anti-fosfo S6 proteína ribosómica; anticuerpo anti-fosfo Src; anticuerpo anti-Fosfo-Bad; anticuerpo anti-fosfo-HSP27; anticuerpo anti-fosfo-IKB-a; anticuerpo anti-fosfo-p44/42 MAPK; anticuerpo anti-fosfo-p70 S6 quinasa; anticuerpo anti-fosfo-Rb (Ser807/811) (retinoblastoma); anticuerpo anti-fosfo HSP-7; anticuerpo anti-fosfo-p38; anticuerpo anti-Pim-1; anticuerpo anti-Pim-2; anticuerpo anti-PKC β ; anticuerpo anti-PKC β 11; anticuerpo anti-podocalixina; anticuerpo anti-PR; anticuerpo anti-PTEN; anticuerpo anti-R1; anticuerpo anti-Rb 4H1 (retinoblastoma); anticuerpo anti-R-cadherina; anticuerpo anti-RRM1; anticuerpo anti-S6 proteína ribosómica; anticuerpo anti-S-100; anticuerpo anti-sinaptopodina; anticuerpo anti-sinaptopodina; anticuerpo anti-Sindecin 4; anticuerpo anti-Talina; anticuerpo anti-Tensina; anticuerpo anti-Tuberlina; anticuerpo anti-uroquinasa; anticuerpo anti-VCAM-1; anticuerpo anti-VEGF; anticuerpo anti-vimentina; anticuerpo anti-ZAP-70; y anti-ZEB.

[0053] Fluoróforos que se pueden conjugar a un anticuerpo primario incluyen pero de forma no limitativa fluoresceína, rodamina, rojo de Texas, Cy2, Cy3, Cy5, rojo de VECTOR, ELF™ (fluorescencia marcada con enzima), Cy0, Cy0,5, Cy1, Cy1,5, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy7, FluorX, calceína, calceína-AM, CRYPTOFLUOR™, naranja (42 kDa), mandarina (35 kDa), oro (31 kDa), rojo (42 kDa), carmesí (40 kDa), BHMP, BHDMAP, Br-Oregon, amarillo Lucifer, familia de tintes Alexa, N-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino]caproil] (NBD), BODIPY™, difluoruro de boro dipirrometeno, verde Oregón, rojo MITOTRACKER™, DiOC7 (3), DiIC18, ficoeritrina, ficobiliproteínas BPE (240 kDa) RPE (240 kDa) CPC (264 kDa) APC (104 kDa), espectro azul, espectro Aqua, espectro verde, espectro oro, espectro naranja, espectro rojo, NADH, NADPH, FAD, tintes infrarrojos (IR), GDP-ribosa cíclica (cGDPR), blanco de calcoflúor, lisamina, umbeliferona, tirosina y triptófano. Una amplia variedad de otras sondas fluorescentes están disponibles y/o exhaustivamente descritas en Handbook of Fluorescent Probes and Research Products 8th Ed. (2001), disponible de Molecular Probes, Eugene, OR, al igual que muchos otros fabricantes.

[0054] Se puede obtener más amplificación de señal usando combinaciones de miembros de enlace específico, tales como anticuerpos y anti-anticuerpos, donde los anti-anticuerpos se enlazan con una región conservada de la sonda de anticuerpo objetivo, particularmente donde los anticuerpos son de distintas especies. Alternativamente pares de ligando-receptor de enlace específico, tales como biotina-estreptavidina, se pueden utilizar, donde el anticuerpo primario se conjuga con un miembro del par y el otro miembro se marca con una sonda detectable. Así, se construye eficazmente un sándwich de miembros de enlace, donde el primer elemento de enlace se enlaza con el componente celular y sirve para proporcionar a unión secundaria, donde el elemento de enlace secundario puede o no incluir una etiqueta, que puede además proporcionar unión terciaria donde el elemento de enlace terciario proporcionará una etiqueta.

[0055] El anticuerpo secundario, avidina, estreptavidina o biotina están cada una independientemente marcadas con una fracción detectable, que puede ser una enzima que dirija una reacción colorimétrica de un sustrato que tiene un producto de reacción de color sustancialmente no soluble, un tinte fluorescente (mancha), un tinte luminiscente o un tinte no fluorescente. Ejemplos relacionados con cada una de estas opciones se enumeran a continuación.

[0056] En principio, cualquier enzima que (i) se pueda conjugar o enlazar indirectamente (por ejemplo, vía avidina conjugada, estreptavidina, biotina, anticuerpo secundario) a un anticuerpo primario, y (ii) que use un sustrato soluble para proporcionar un producto insoluble (precipitado) podría usarse.

[0057] La enzima empleada puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa y/o glucosa oxidasa; y el sustrato puede respectivamente ser una fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa o sustrato de glucosa-oxidasa.

[0058] Los sustratos de fosfatasa alcalina (AP) incluyen, pero de forma no limitativa, sustrato AP-Blue (precipitado azul, catálogo Zymed P. 61); sustrato AP-Orange (naranja, precipitado, Zymed), sustrato AP-Red (rojo, precipitado rojo, Zymed), 5-bromo, 4-cloro, 3-indolifosfato (sustrato BCIP, precipitado turquesa), 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato/nitroazul tetrazolil/ idonitrotetrazolio (BCIP/INT sustrato, precipitado amarillo-marrón, Biomed), 5-bromo, 4-cloro, 3-indolifosfato/nitroazul tetrazolio (BCIP/NBT sustrato, azul/morado) 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato/nitroazul tetrazolio / idonitrotetrazolio (BCIP/NBT/int, precipitado marrón, DAKO, Fast Red (rojo), Magenta-phos (color magenta), naftol AS-BI-fosfato (NABP)/Fast Red TR (rojo), naftol AS-BI-fosfato (NABP)/nueva fucsina (rojo), naftol AS-MX-fosfato (NAMP)/nueva fucsina (rojo), nueva fucsina AP sustrato (rojo), p-nitrofenil fosfato, (PNPP, amarillo, soluble en agua), VECTORTM Black (negro), VECTOR™ Blue (azul), VECTOR™ Red (rojo), Vega Red (color rojo frambuesa).

[0059] Sustratos de peroxidasa de rábano (HRP, a veces abreviado Po) incluyen, pero de forma no limitativa, 2,2' azino-di-3-etilbenzeno-tiazolina sulfonato (ABTS, verde, soluble en agua), aminoetil carbazol, 3-amino, 9-etilcarbazol AEC (3A9EC, rojo). Alfa-naftol pironina (rojo), 4-cloro-1-naftol (4C1N, azul, azul-negro), 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB, marrón), orto-dianisidina (verde), o-fenilen diamina (OPD, marrón, soluble en agua), TACS Blue

(azul), TACS Red (rojo), 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB, verde o verde/azul), TRUE BLUE™ (azul), VECTOR™ VIP (morado), VECTOR™ SG (azul ahumado-gris) y sustrato Zymed Blue HRP (azul vivo).

5 [0060] Sustratos de glucosa-oxidasa (GO), incluyen, pero de forma no limitativa, nitroazul tetrazolio (NBT, precipitado morado), tetranitroazul tetrazolio (TNBT, precipitado negro), 2-(4-iodofenil)-5-(4-nitrofenil)-3-feniltetrazolio cloruro (INT, precipitado rojo o naranja), azul de tetrazolio (azul), violeta de nitrotetrazolio (violeta), y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT, morado). Todos los sustratos de tetrazolio requieren glucosa como un co-sustrato. La glucosa se oxida y la sal de tetrazolio se reduce y forma un formazán insoluble que forma el precipitado de color.

10 [0061] Sustratos de beta-galactosidasa, incluyen, pero de forma no limitativa, 5-bromo-4-cloro-3-indoil beta-D-galactopiranosido (X-gal, precipitado azul). Los precipitados asociados a cada uno de los sustratos enumerados tienen firmas espectrales detectables únicas (componentes).

15 [0062] La enzima puede también dirigirse a catalizar una reacción de luminiscencia de un sustrato, tal como, pero no limitado a, luciferasa y aequorina, que tienen un producto de reacción sustancialmente no soluble capaz de luminiscencia o de dirigir una segunda reacción de un segundo sustrato, tal como pero no limitado a, luciferina y ATP o coelenterazina y Ca^{2+} , que tienen un producto de luminiscencia.

20 [0063] Las siguientes referencias, que son incorporados aquí en su totalidad, proporcionan ejemplos adicionales: J. M. Elias (1990) *Immunohistopathology: A practical approach to diagnosis*. ASCP Press (American Society of Clinical Pathologists), Chicago; J. F. McGinty, F. E. Bloom (1983) *Double immunostaining reveals distinctions among opioid peptidergic neurons in the medial basal hypothalamus*. *Brain Res.* 278: 145-153; and T. Jowett (1997) *Tissue In situ Hybridization: Methods in Animal Development*. John Wiley & Sons, Inc., New York; *J Histochem Cytochem* 1997 December 45(12):1629-1641.

25 [0064] Marcadores biológicos de ácidos nucleicos se pueden detectar utilizando hibridación *in situ* (ISH). En general, una sonda de secuencias de ácidos nucleicos se sintetiza y marca con una sonda fluorescente o un miembro de un par ligando:receptor, tal como biotina/avidina, marcado con una fracción detectable. Sondas ejemplares y fracciones son descritas en la sección precedente. La sonda de secuencia es complementaria de una secuencia de nucleótidos objetivo en la célula. Cada célula o compartimento celular que contiene la secuencia de nucleótidos objetivo puede enlazar la sonda marcada. Las sondas usadas en el análisis pueden ser oligonucleótidos o polinucleótidos de ADN o ARN y pueden contener no solo nucleótidos de origen natural sino también sus análogos tales como dioxigenina dCTP, biotina dCTP 7-azaguanosina, azidotimidina, inosina o uridina. Otras sondas útiles incluyen sondas de péptido y sus análogos, ADN de gen ramificado, peptidomiméticos, ácidos nucleicos de péptido y/o anticuerpos. Las sondas deberían tener complementariedad suficiente con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo de interés de modo que se produzca enlace específico y estable entre la secuencia de ácidos nucleicos objetivo y la sonda. El grado de homología requerido para hibridación estable varía con la astringencia de la hibridación. Metodologías convencionales para ISH, hibridación y selección de sonda son descritas en Leitch, *et al.* *In situ Hybridization: a practical guide*, Oxford BIOS Scientific Publishers, *Microscopy Handbooks v. 27* (1994); y Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989).

40 [0065] En una forma de realización, la dilución óptima de un reactivo usado en los presentes ensayos, tal como un reactivo de coloración o IHC, descrito aquí se puede determinar de forma cuantitativa y automática. En una forma de realización, conjuntos de dilución múltiple forman imágenes, donde cada conjunto de dilución consiste en un valor de dilución respectivo diferente y una disposición respectiva de valores de intensidad de coloración de inmunoensayo. Una métrica de rango dinámico respectiva se determina para cada uno de los conjuntos de dilución múltiple para la disposición respectiva de valores de intensidad de coloración de inmunoensayo. Tras encontrar la métrica de rango dinámico respectiva, un conjunto de dilución que tiene la métrica de rango dinámico numéricamente óptima se selecciona y el valor de dilución de este conjunto de dilución se selecciona como representativo de un nivel de dilución óptimo del reactivo para su uso en la presente invención.

55 [0066] Por ejemplo, una muestra de tejido montado en diapositiva se mancha con una de las series de dilución del anticuerpo primario utilizando técnicas de inmunohistoquímica común anteriormente descrita. Las muestras manchadas resultantes se visualizan utilizando un sistema para visualizar la señal detectable y adquirir una imagen, tal como una imagen digital de la coloración. Métodos para la adquisición de imágenes se describen con más detalle más adelante. Las imágenes así obtenidas son luego usadas por el método de la invención para determinar de forma cuantitativa la concentración óptima del reactivo para su uso en la presente invención. Cada conjunto de muestra de tejido incluye varias muestras de tejido diferentes preparadas con dilución de graduación respectiva, de manera que conjuntos de muestras de tejido diferentes tienen diluciones de graduación respectivas diferentes. Un análisis cuantitativo se realiza de las imágenes pixeladas de los conjuntos de muestra de tejido múltiples.

60 [0067] Para cada conjunto de dilución de los conjuntos de dilución múltiples, una métrica de rango dinámico y una especificidad de coloración se calculan. En una forma de realización de la presente invención, la métrica de rango dinámico es una desviación absoluta media. En otra forma de realización de la presente invención, el dato es log transformado, y la métrica de rango dinámico es una combinación ponderada de una desviación típica, una varianza y una relación de oscilación. La especificidad de coloración se calcula para maximizar la señal específica mientras se

minimiza el ruido. La especificidad de coloración se puede computar sumando cada uno de un conjunto de valores de intensidad de coloración de inmunoensayo asociado a un compartimento específico de coloración y luego computando un promedio específico de coloración para el compartimento específico de coloración, y también sumando cada uno de un conjunto de valores de intensidad de coloración de inmunoensayo asociado a un compartimento específico sin coloración y luego computando un promedio no específico de coloración. Tras el cálculo de estos dos promedios, el promedio específico de coloración puede ser dividido por el promedio específico sin coloración para producir la especificidad de coloración, o una señal para métrica de ruido. En tal forma de realización, una sensibilidad numéricamente grande de valor de coloración es óptima. En otra forma de realización, el promedio específico sin coloración es dividido por el promedio específico de coloración para producir la sensibilidad de coloración. En tal forma de realización, una sensibilidad numéricamente pequeña de valor de coloración es óptima. Después de calcular la métrica de rango dinámico y la sensibilidad de coloración para cada uno de los conjuntos de dilución, la métrica de rango dinámico y la sensibilidad de coloración se pueden combinar entre sí para generar un valor de combinación para cada conjunto de dilución. Los valores de combinación resultante se utilizan para seleccionar el conjunto de dilución con el valor de combinación numéricamente más óptimo. Asociado al conjunto de dilución seleccionado hay un valor de dilución representativo de una dilución óptima de un reactivo. Opcionalmente, el proceso realiza múltiples comparaciones para intentar identificar compartimentos específicos sin coloración y específicos de coloración múltiples.

Estandarización de instrumento y colección de imagen

[0068] Una vez que la muestra ha sido manchada, cualquier dispositivo de formación de imágenes óptico o no óptico se puede utilizar para detectar la mancha o etiqueta de biomarcador, tal como, por ejemplo, microscopios ópticos verticales o invertidos, microscopios confocales de escaneado, cámaras, microscopios electrónicos de tunelización o escaneado, microscopios de sonda de escaneado y detectores infrarrojos de formación de imágenes, etc.

[0069] En una forma de realización, el dispositivo de formación de imágenes es un sistema de microscopio que incluye una fuente de iluminación configurada para iluminar una muestra objetivo, ópticas configuradas para producir una imagen agrandada de la muestra objetivo iluminada y un detector, tal como una cámara digital, configurado para capturar una imagen digital de la imagen agrandada. Resultados cuantitativos se pueden obtener a través de la manipulación de las imágenes digitales capturadas. Tal manipulación de imagen puede incluir técnicas de tratamiento de imagen conocidas por los expertos en la materia. En al menos algunas formas de realización, una o más de tales capturas de imágenes y manipulaciones de imágenes se realizan con la ayuda de un procesador. El procesador puede incluir unas instrucciones preprogramadas de implementación informática.

[0070] Por ejemplo, una muestra de tejido o microarray tisular se puede representar de la siguiente manera: un usuario posiciona el microarray en un portamuestras. El usuario ajusta el portamuestras de modo que la primera región de interés o primer histopunto esté en el centro del campo de visión y focalizado por la cámara CCD. La lente objetiva debería ser ajustada a la resolución apropiada, por ejemplo, una muestra de 0,6 milímetros se puede ver a 10 \times de ampliación. Si se monta en parafina, la muestra generalmente corresponde a áreas de intensidad de luz más alta que la parafina circundante, como se evalúa a través de varios medios incluyendo señales derivadas de la dispersión de luz visible de tejidos manchados, autofluorescencia de tejido o de una etiqueta fluorescente. Un ordenador puede adquirir una imagen de baja resolución (por ejemplo, 64 píxeles \times 64 píxeles con 16 bits de resolución) utilizando software informático (Softworx 2.5, Applied Precision, Issaquah, WA) y una plataforma de formación de imágenes (por ejemplo, Deltavision). Un ordenador automáticamente traduce el portamuestras por una cantidad aproximadamente igual a un campo de visión. El ordenador luego adquiere una segunda imagen de baja resolución. Este proceso se repite hasta que el ordenador haya adquirido imágenes de la muestra de tejido entero o microarray. Utilizando software disponible comercialmente, el ordenador luego genera una imagen compuesta de la muestra de tejido entera o microarray.

[0071] Para estandarizar opcionalmente los resultados cuantitativos obtenidos utilizando un sistema particular, un factor intrínseco del sistema puede ser determinado para dar cuenta de la variabilidad de intensidad de la fuente de excitación y la variabilidad del dispositivo, por ejemplo, a lo largo de la trayectoria óptica. Para conseguir esto, una medición de la intensidad de la fuente luminosa de excitación también se pueden obtener por ejemplo usando una herramienta de medición de intensidad de lámpara en línea. También una medición de una muestra estándar o de calibración, p. ej., una diapositiva de microscopio de calibración se puede obtener utilizando el sistema particular para definir uno o varios factores de trayectoria óptica. El uso de tal diapositiva de calibración es particularmente útil para aplicaciones IHC basadas en fluorescencia, donde las regiones fluorescentes de la muestra de la diapositiva de calibración emiten radiación dentro de los anchos de banda respectivos. Las emisiones fluorescentes permiten la caracterización de una trayectoria óptica en cada una de la o las longitudes de onda respectivas. Esta medición se pueden obtener simultáneamente o separadamente.

[0072] El sistema también incluye opcionalmente un dispositivo de calibración configurado para redirigir una muestra estandarizada de la fuente de iluminación al detector, aunque se ha descubierto que los métodos de la presente invención no requieren el uso de tal dispositivo. En al menos algunas formas de realización, un procesador de sistema está configurado para determinar un factor de corrección para un microscopio dado. El factor de corrección se puede determinar a partir de una medición de la muestra estandarizada de la fuente de iluminación obtenida utilizando el dispositivo de calibración. El factor de corrección puede ser usado (por ejemplo, por el procesador) para corregir cualquier variación en la intensidad de una imagen detectada de la muestra objetivo. Por ejemplo, un factor de cubo de

calibración (CC) se determina por comparación con un cubo estándar universal. Un factor de fuente luminosa (LS) se determina sumando las intensidades de píxeles de una imagen capturada de la superficie de calibración. El factor de trayectoria óptica (OP) es el cociente de la intensidad de luz total media de 16 imágenes tomadas para cada combinación de cubo/muestra. Los factores CC y OP son intrínsecos del sistema de hardware específico que se estudia y necesita solo ser calculados una vez o a un intervalo donde se sospeche que se ha producido algún tipo de modificación en la óptica.

[0073] La puntuación de AQUA® estandarizada se muestra por debajo:

Puntuación de AQUA® estandarizada = puntuación de AQUA® bruta * factor CC * factor LS * factor OP donde los factores CC y OP se definen por configuración/construcción del sistema y el factor LS se mide simultáneamente.

[0074] En algunas formas de realización, un procesador de sistema se configura con instrucciones (por ejemplo, software) para obtener el factor de calibración. Alternativamente o además, el procesador de sistema se configura con instrucciones para utilizar el factor de corrección para corregir imágenes detectadas. Tal calibración es útil para reducir la variabilidad en la intensidad de la fuente de iluminación en el mismo sistema de microscopio, como puede ocurrir en el tiempo, y entre resultados cuantitativos obtenidos utilizando sistemas de microscopio diferentes y/o fuentes de iluminación diferentes.

Optimización de imagen

Tiempo de exposición

[0075] El rango dinámico de datos de intensidad de píxel de la imagen recogida pueden ser opcionalmente optimizado para reducir adicionalmente las variaciones ronda a ronda, especialmente debido a la intensidad de coloración y diferencias de equipo que afectan a los tiempos de exposición. El proceso incluye la captación de una imagen de un sujeto en el campo de visión de una cámara fotográfica en un primer tiempo de exposición, dando como resultado una imagen capturada que comprende un número predeterminado de píxeles, donde cada píxel tiene un valor de intensidad. Una distribución de frecuencias de intensidades de píxel de la imagen capturada se requiere para determinar una región de la incidencia de frecuencia mayor de las intensidades de píxel de la distribución de frecuencias. El tiempo de exposición se ajusta luego desde el primer tiempo de exposición para desviar esa región de distribución de frecuencias mayor hacia el centro del rango de valores de intensidad. En otras palabras, el centro de masa (COM) de una histograma, o distribución de frecuencias es determinado del que un tiempo de exposición ajustado se calcula para conseguir un rango dinámico optimizado de intensidades de píxel. Una segunda imagen del sujeto puede después ser capturada en el tiempo de exposición ajustado dando como resultado una imagen con un rango dinámico óptimo.

[0076] Hay varias maneras de corregir la exposición para los métodos descritos aquí. Una técnica de corrección es para adquirir iterativamente una imagen nueva en un tiempo más largo o más corto de exposición que el de la imagen precedente hasta que los píxeles saturados se minimizan y el rango dinámico óptimo se consigue. Este proceso reiterativo permite un ajuste rápido en el tiempo de exposición para llevar las intensidades de píxeles por debajo de la gama de detección para optimizar la exposición y el rango dinámico. Sin embargo, este método simplista también puede hacer que el sistema sobrecorrija los píxeles saturados y ajuste el nuevo tiempo de exposición demasiado bajo. Por lo tanto, es deseable modificar la agresividad de la corrección para que el tiempo de exposición sea proporcional a cuantos píxeles son saturados en la imagen precedente.

[0077] Para conseguir esto, el nuevo tiempo de exposición se puede calcular como:

$$E = E' x (1 - (0.5)^{(I + S)}),$$

donde

$$S = A \frac{CCD_x CCD_y SL}{P}$$

donde E es el nuevo tiempo de exposición, E' es el tiempo de exposición establecido actualmente, A es un nivel de agresión, SL es el límite de saturación, CCD_x y CCD_y representan las dimensiones de píxel de la imagen capturada y P es el recuento de píxeles a intensidad máxima. El nivel de agresión, A, puede variar pero, generalmente, los valores que uno desearía elegir dependerían de la cantidad por la que las imágenes tienden a ser sobresaturadas. Un valor de cero (0) para A representa un valor mínimo para el que el tiempo de exposición sería dividido. Un valor máximo práctico para A es aproximadamente 10, después de lo cual el tiempo de exposición no cambiará lo suficiente para que el algoritmo sea útil. En una forma de realización preferida de la invención, el valor para A puede estar en el rango de aproximadamente 0 ≤ A ≤ 4,5. Más preferiblemente, A se establece alrededor de 3,5.

[0078] El procedimiento de reducción del tiempo de exposición para asegurar la imagen no es superpuesto, es típicamente un proceso multifase. En una forma de realización ejemplar, un histograma de 256 casillas se genera

5 primero para una imagen de 8-bit por píxel obtenida de la cámara fotográfica en el tiempo de exposición actual, E'. El número de píxeles saturados se identifican y comparan con un valor de umbral de saturación predeterminado. Luego, si la imagen está en o por debajo del límite de saturación, se sale del procedimiento de sobreexposición. Sin embargo, si la imagen se sobreexpone, el tiempo de exposición es disminuido. El nuevo tiempo de exposición disminuido puede variar basada en el número de píxeles sobreexpuestos actualmente. En una forma de realización ejemplar, un valor S se puede determinar como

$$S = A \frac{0.0002 \times 2048^2}{M},$$

10 donde A es un "nivel de agresión" definido actualmente a 3,5 y M es el recuento de píxeles a intensidad máxima. Luego, el tiempo de exposición siguiente E se deriva de la siguiente manera:

$$E = E' - E' 0.5^{1+S}$$

15 [0079] Cuando el número de píxeles sobreexpuestos es mucho mayor que el límite de saturación, $E \approx E' - 0,5E'$ (por ejemplo, el tiempo de exposición se reduciría a la mitad). La cantidad mínima de cambio para el tiempo de exposición actual se produce cuando el número de píxeles sobresaturados es casi muy igual al límite de saturación, en cuyo caso $E \approx E' - 0,088E'$. Así, debido a que se sale del algoritmo cuando la imagen está en o por debajo del límite de saturación, el número de píxeles saturados no será nunca igual al límite de saturación. El procedimiento de reducción del tiempo de
20 exposición se puede repetir de manera reiterativa hasta que la cantidad de sobreexposición esté dentro de un umbral elegido, o hasta que un número máximo de iteraciones se haya realizado. En cualquier caso, se sale luego de la rutina de corrección de sobreexposición.

25 [0080] Un proceso alternativo y igualmente viable para corregir la sobreexposición es adquirir una imagen nueva con el mínimo tiempo de exposición, luego proceder con optimización del tiempo de exposición por cálculo del COM y llevarla dentro del rango del punto medio, como se ha descrito anteriormente.

Validación de imagen

30 [0081] La calidad de la imagen puede se puede evaluar y optimizar automáticamente para reducir las variaciones debidas a uno o varios factores seleccionados de la uniformidad de coloración, calidad de coloración, suficiencia de tejido, posición de muestra de tejido, saturación de señal, enfoque, e intensidad de señalan. Así, las imágenes pueden ser corregidas por lecturas falsas debido a que no hay muestra, la muestra es demasiado pequeña, detrito, muestra múltiple o "imagen dividida" (en el caso de análisis TMA) y enfoque pobre de manera que las imágenes inválidas se
35 pueden excluir de análisis de datos posterior. Cada mancha se puede convalidar independientemente de otras manchas en la misma imagen o diferentes. Estas valoraciones y optimizaciones se pueden realizar automáticamente por un programa de tratamiento de imagen con valores de umbral particulares fijados en el programa o proporcionados por el usuario.

40 [0082] Para determinar opcionalmente la uniformidad de mancha a través de la diapositiva o al menos la porción representada de la diapositiva, los valores de intensidad de columnas verticales de los píxeles de imagen se combinan a lo largo de la columna respectiva y se fijan a través del eje x. La combinación puede ser una adición directa de valores de intensidad de píxel a lo largo de la columna. Alternativamente o además, la combinación puede ser un valor alcanzado estadísticamente, tal como un valor de intensidad media de todos los píxeles en la columna. Por ejemplo, con
45 una imagen que utiliza 8 bits para representar la intensidad, hay 256 valores de intensidad de píxel posibles para cada píxel. Los valores de intensidad de píxel abarcan un rango del negro (por ejemplo, "0") al blanco (por ejemplo, "255"). Valores entre blanco y negro se asocian con sombras variables de gris. Los valores de intensidad máxima relativos, o valores de valor máximo, se pueden comparar entre regiones diferentes de la imagen para determinar la uniformidad de mancha y la tendencia posicional. Si se encuentra una tendencia, la imagen se puede excluir de posterior análisis.

50 [0083] Para determinar opcionalmente la calidad de la mancha, la intensidad de coloración de la mancha específica de compartimento dentro del compartimento se mide analizando la intensidad de los píxeles de la imagen digital que son identificados como parte del compartimento. Por ejemplo, para medir la calidad de la mancha de una mancha nuclear, la intensidad de la mancha total en el compartimento celular nuclear se puede formular como una combinación, tal como
55 una suma de las intensidades de los píxeles identificados como núcleos representantes. Intensidad de mancha total fuera del compartimento celular nuclear se puede formular de forma similar a una suma de las intensidades de píxeles identificados como no nucleares. Los dos valores para núcleos y no nuclear son comparados. Por ejemplo, los dos valores se pueden combinar en una proporción, el valor único de la proporción indicativo de la comparación. Por ejemplo, la intensidad de los núcleos combinados se puede dividir por la intensidad no nuclear combinada por el programa de tratamiento de imagen para proporcionar una proporción de calidad de mancha de tejido. Una proporción
60 baja, tal como una proporción acercándose al 1, es indicativa de baja calidad de coloración o integridad de tejido pobre.

Un umbral de calidad de coloración mínimo aceptable se puede fijar o ajustar por un usuario. Tales muestras identificadas como que no llegan al umbral de coloración mínimo se pueden excluir de los datos ajustados y de posterior análisis por el programa de validación.

5 [0084] La suficiencia de tejido se puede analizar por recuento de los píxeles de una imagen con intensidades de señal por encima de una intensidad de umbral luego determinando si el número total de píxeles positivos cumple un criterio mínimo para tejido suficiente. Asimismo, el porcentaje de píxeles positivos del total se pueden utilizar como el criterio.

10 [0085] Cuando se analizan los microarrays tisulares, la posición de la muestra de tejido se puede evaluar por cálculo de la intensidad de píxel media en cada una de las diferentes secciones identificadas en el campo de visión. Muestras o histopuntos individuales se deben identificar para determinar la posición, que se puede usar para comparar la posición del borde de la muestra con el centro de la muestra. El borde de la muestra se determina basado en la intensidad de píxel de áreas rectangulares para valorar si el centrado debidamente, y la intensidad de píxel central se mide para determinar si los bordes no se deben más de una muestra. La detección del borde de muestra se puede realizar utilizando un operador de diferenciación discreta, tal como un detector de borde Sobel, o cualquier otro número de detectores de borde bien conocidos en la técnica. Muestras incorrectamente posicionadas o puntos de división que contienen más de un objetivo se pueden identificar luego y excluir de posterior análisis.

20 [0086] El enfoque de la muestra puede ser evaluado, tal como por determinación de un valor de curtosis para las intensidades de píxel de la imagen. Los valores de intensidad de coloración de píxeles en una imagen digitalizada se pueden fijar en un histograma. La distribución se puede analizar como una indicación de foco. Una imagen enfocada típicamente tendrá una distribución de intensidad de píxel con un valor máximo definido relativamente alto, (curtosis más alta) en comparación con una imagen desenfocada que tendrá una distribución de intensidad de píxel con un valor máximo aplanado (curtosis más baja). La altura o la planicie de tal distribución se puede representar en un valor único, tal como un valor de curtosis. Un valor de curtosis más alto es indicativo de un valor máximo definido con relativamente alto; mientras que, un valor de curtosis más baja es indicativo de un valor máximo aplanado.

25 [0087] La curtosis es una medida de si los datos son maximizados o planos con respecto a una distribución normal. Esto es, conjuntos de datos con alta curtosis tienden a tener un valor máximo diferente cerca de la media, descienden bastante rápidamente, y tienen colas pesadas. Conjuntos de datos con baja curtosis tienden a tener un máximo plano más bien que un máximo elevado. Para datos univariantes Y_1, Y_2, \dots, Y_N , la fórmula para curtosis es:

$$\text{curtosis} = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^4}{(N - 1)s^4}$$

35 donde Y es la media, s es la desviación típica, y N es el número de puntos de datos. La curtosis de exceso se puede definir como

$$\text{curtosis} = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \bar{Y})^4}{(N - 1)s^4} - 3$$

40 de modo que la distribución normal estándar tiene una curtosis de cero. La curtosis positiva indica una distribución "en pico" y la curtosis negativa indica una distribución "plana". Imágenes con curtosis negativa se pueden entonces excluir de posterior análisis.

45 [0088] La intensidad de señal se puede evaluar por selección de los datos de intensidad de señal medidos a partir de imágenes adquiridas en cada canal pertinente para cada histopunto e identificando el número de muestras con bajas intensidades de coloración. Tales muestras se pueden excluir de posterior análisis.

Puntuación AQUA®

50 [0089] Una vez que la imagen se optimiza y convalida, con cualquier histopuntos inválidos o imágenes retiradas, la imagen se enmascara virtualmente, aproximaciones tridimensionales de células en la muestra pueden ser generadas, y marcadores biológicos se asocian con compartimentos subcelulares de células individuales. Tal algoritmo para automáticamente realizar estas tareas es la plataforma de análisis cuantitativo automatizado (plataforma AQUA®). Esta técnica se describe también en la patente de EE.UU. nº 7.219.016 y Camp *et al.*, 2002 Nature Medicine 8(11)1323-1327

que se incorporan ambas específicamente aquí por referencia en su integridad. Sin embargo, por primera vez, la automatización de cada paso se describe aquí, aumentando la facilidad y la reproducibilidad de este análisis.

5 [0090] En una forma de realización, muestras de tejido se manchan con marcadores que definen, por ejemplo, los compartimentos celulares de interés y el objetivo específico (u objetivos) que se están estudiando. La asignación local basada en píxeles para compartimentación de expresión (PLACE) es el algoritmo clave que funciona para segmentar eficazmente píxeles de imagen para el fin de compartimentación de expresión. Un paso crítico en este algoritmo es el ajuste de umbrales de intensidad que se utilizan para delinear píxeles de fondo o no específicos a partir de píxeles específicos de señal. Imágenes que se han "enmascarado" de esta manera son posteriormente combinadas en una forma mutuamente exclusiva de manera que los píxeles por encima de los umbrales se asignen a compartimentos celulares específicos. Una vez que los píxeles se han sido asignado a cada compartimento, la señal para el biomarcador objetivo puede después ser promediada según todos los píxeles asignados a un compartimento dado, que es la puntuación de AQUA® para esta muestra.

15 [0091] Por ejemplo, una máscara específica de tumor se puede generar por umbralización manual de la imagen de un marcador (citoqueratina) que diferencia tumor de estroma y/o leucocitos circundantes. Esto crea una máscara binaria (cada píxel es bien 'activado' o 'desactivado'). Los niveles de umbral son verificados, y ajustado si es necesario, por control de una muestra pequeña de imágenes y luego las imágenes restantes son automáticamente enmascaradas utilizando el valor de umbral determinado único. Todas las manipulaciones de imagen posteriores implican solo información de imagen a partir del área enmascarada. Las imágenes específicas fuera de objetivo se pueden reagrupar para iterativamente ajustar las intensidades de píxel de objetivos enmascarados no estándar. La técnica de tratamiento de imagen dilatada permite que un filtro de paso bajo espacial para llene los píxeles de vecinos más cercanos que están rodeados por píxeles incluidos en la máscara. La técnica de tratamiento de imagen erosionada permite que un filtro de paso alto espacial elimine píxeles que no estén contiguos a la máscara o que forman estructuras que sean contrarias a las estructuras previstas para una muestra de tejido montado en diapositiva dada. Tales ajustes permiten incluir muestras válidas pero no conformes que de otro modo se pueden excluir de posterior análisis.

30 [0092] Después, la señal para proporción de ruido se puede mejorar por corrección del ruido de fondo. Por ejemplo, dos imágenes (una enfocada, una desenfocada, por ejemplo, tomado 6 μ m más profundo en la muestra) se toman de las etiquetas específicas de compartimento y el marcador objetivo. La imagen desenfocada actúa como un filtro de paso bajo espacial que proporciona un valor de fondo. Por ejemplo, el porcentaje de la imagen desenfocada es sustraído de la imagen enfocada, basado en un análisis de píxel a píxel de las dos imágenes, tal como usando un algoritmo llamado RESA (algoritmo de sustracción exponencial rápida). El algoritmo RESA mejora la interfaz entre áreas de coloración de intensidad más alta y áreas adyacentes de coloración de intensidad inferior, lo que permite una asignación más fácil de píxeles a los compartimentos de fondo y adyacentes. Finalmente, el algoritmo PLACE asigna cada píxel de la imagen a un compartimento celular específico. Los píxeles que no se pueden asignar con precisión a un compartimento dentro de un grado definido por el usuario de confianza son descartados. Por ejemplo, los píxeles donde las intensidades de píxel nucleares y citoplásmicas son demasiado similares para ser asignadas con precisión son negadas (por ejemplo, comprendiendo <8% de los píxeles totales). Una vez que cada píxel se asigna a un compartimento celular (o se excluye como se ha descrito anteriormente), la señal en cada ubicación se suma para generar la puntuación de AQUA® para esta muestra, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$AQ = \left(\frac{1}{\sum C_i} \right) (\sum T_i C_i)$$

45 donde AQ es la puntuación de AQUA® bruta, T_i es la intensidad objetivo i^{th} , también conocida como densidad de potencia, y C_i es la probabilidad de compartimento celular i^{th} . Estos datos se guardan y pueden posteriormente ser expresados bien como un porcentaje de señal total o como la intensidad de señal media por área de compartimento.

50 [0093] Preferiblemente, la puntuación de AQUA® puede ser automáticamente normalizada, por ejemplo, por agrupamiento, para asignar píxeles a un compartimento celular particular basado en datos de intensidad. Este agrupamiento permite posterior eliminación de ruido de fondo, asignación de píxeles específicos a un compartimento dado y asignación probabilística de píxeles a cada compartimento donde puede haber señales de superposición. Una vez que los píxeles se asignan a cada compartimento (o se descartan en el caso de ruido) las señales de objetivo asociadas pueden ser medidas, por ejemplo, sumadas y una puntuación calculada.

55 [0094] La asignación se determina preferentemente en una base imagen a imagen, en lugar de establecer criterios universales. Además, la asignación de píxeles (por ejemplo, píxeles de Cy3/citoqueratina a citoplasma) es también una función de otra imágenes de compartimento de manera que se da consideración al estado de los píxeles en otras imágenes de compartimento. En una forma de realización, una imagen es una primera mancha que específicamente etiqueta un primer compartimento (por ejemplo, una imagen de cy3/citoqueratina, representando el compartimento citoplásmico) y una segunda imagen es de una segunda mancha que específicamente etiqueta un segundo

compartimento (por ejemplo, imagen DAPI, representando el compartimento nuclear) y las asignaciones de píxeles se basan en cuatro criterios:

- 1.) Intensidad baja tanto en la primera como en la segunda imagen (por ejemplo, DAPI y Cy3): FONDO: ELIMINAR
- 2.) Intensidad alta de la segunda mancha (por ejemplo; DAPI) con respecto a la intensidad de la primera mancha (Cy3): SEGUNDO COMPARTIMENTO (por ejemplo, NUCLEAR)
- 3.) Intensidad alta de la primera mancha (por ejemplo; Cy3) con respecto a la intensidad de la segunda mancha (por ejemplo, DAPI): PRIMER COMPARTIMENTO (por ejemplo, CITOPLÁSMICO)
- 4.) Intensidad alta de la segunda mancha y la primera mancha (por ejemplo, DAPI y Cy3): INDETERMINANTE: ELIMINAR

[0095] El agrupamiento es una función algorítmica matemática por la cual centroides dentro de conjuntos de datos se definen por distancias relativas de cada punto de datos entre sí, como se determina, por ejemplo, por distancia de logaritmo de verosimilitud o euclidiana. Si bien no se desea estar limitado por la teoría, se cree que el agrupamiento de intensidades de píxel de al menos dos imágenes (por ejemplo, DAPI y Cy3), podrían dar como resultado centroides que definen píxeles como se describe, al menos, por los criterios anteriores. Debido a que el agrupamiento es objetivo y se puede realizar individualmente en cada imagen, el agrupamiento es un método fiable para asignación de píxeles a compartimentos, independiente de la intervención de operador.

[0096] En otra forma de realización, píxeles que contienen señales indicativas de tanto la primera como la segunda mancha se asignan a compartimentos por el siguiente método. Cada píxel de las imágenes adquiridas tiene tres atributos aportación de intensidad a partir de marcador de compartimento A, aportación de intensidad a partir del marcador de compartimento B y una aportación de intensidad a partir del objetivo o biomarcador de interés. Estas intensidades se miden en sus canales de fluorescencia respectivos por la configuración experimental. Para evitar el sesgo experimental, la intensidad objetivo no se manipula en este método actual. Así, los datos para los dos atributos de compartimento se pueden ilustrar en un gráfico bidimensional esquemáticamente.

[0097] Píxeles con una fuerte tendencia hacia cualquiera del ejes se pueden asignar a ese compartimento (por ejemplo, píxeles en las regiones de A y B se podrían asignar absolutamente a los compartimentos A y B respectivamente). Píxeles cerca del origen representan bajas intensidades para ambos canales y se pueden descartar como fondo junto con píxeles atípicos que tienen alta intensidad pero valores similares. Píxeles que permanecen en la región A/B pueden después ser asignados a cada compartimento basado en la probabilidad. Esta asignación permite señal objetivo en los píxeles que se van a distribuir a través de ambos compartimentos basados en la caracterización de probabilidad.

[0098] Para definir las regiones anteriormente descritas, por ejemplo, para cada imagen, se usa el agrupamiento para determinar tres centroides en los datos. Este método es completamente automatizado y no requiere ninguna decisión de operador para proceder. El análisis se realiza mediante la realización de agrupamiento con medios K en tres centroides utilizando distancias euclidianas.

[0099] Los datos son luego analizados de la siguiente manera: (i) píxeles de fondo y atípicos son descartados de posterior cálculo. Un píxel se define como de fondo si su distancia al origen es inferior a dos veces la distancia del centroide de fondo al origen. Un píxel se define como atípico si su intensidad excede el valor definido por la línea o plano definido por los centroides más exteriores; (ii) píxeles de las regiones A y B se asignan exclusivamente a esos dos compartimentos; (iii) píxeles en la región triangular A/B se les asigna luego un valor de probabilidad que les permite esencialmente ser distribuidos en compartimentos múltiples. Este valor de probabilidad se puede calcular basado en la distancia a partir de las dos regiones A y B, o, utilizando una función de forma que también asignará una probabilidad de cada píxel que tiene una aportación a partir de la región de fondo examinando cada distancia el píxel desde los tres vértices dados por los centroides; (iv) con todos los píxeles asignados, las puntuaciones objetivo asociadas se pueden sumar para cada compartimento y una puntuación se puede calcular utilizando métodos estándar:

$$\frac{\sum_i^{\# \text{ píxeles}} Int_i * P_i}{\sum_i^{\# \text{ píxeles}} P_i}$$

donde Int es la intensidad del píxel, P es la probabilidad del píxel asignado a un compartimento particular (que varía de 0 a 1).

[0100] Los puntos de corte se establecen usando algoritmos para separar muestras en grupos con características específicas, tales como muestras que contienen tejidos con niveles de expresión de biomarcadores diferentes para uno o más biomarcador, como se describe con más detalle en McCabe *et al.*, J. Natl. Cane. Inst. (2005) 97(24):1808-1815, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Al reducir los resultados de cuantificación de

biomarcadores de muestra utilizando los métodos de la presente invención, la variación intragrupo se minimiza, las diferencias entre grupos se maximizan y se identifican más fácilmente. Por ejemplo, un nivel de expresión alto de un biomarcador, representado por una puntuación de AQUA® alta, puede estar más estrechamente correlacionada con enfermedad agresiva y supervivencia reducida, mientras que una puntuación de AQUA® inferior no lo está. Al distinguir de una forma fiable los dos grupos, la correlación entre un biomarcador y una enfermedad se vuelve más clara. Así, las puntuaciones de AQUA® generadas utilizando los métodos de la invención proporcionan un ensayo fiable para comparar grupos de muestra de manera que el biomarcador pueda estar más específicamente correlacionado con las características particulares, llevando a un diagnóstico más fiable y una estimación de pronóstico en una muestra individual.

Reproducibilidad

[0101] Debido a que la variabilidad de las puntuaciones de AQUA® se reduce mediante la estandarización del instrumento automático, tal como optimización de exposición, al igual que a través de la normalización de las puntuaciones de AQUA® brutas por agrupamiento, al igual que por validación de imagen opcionalmente mejorada, la sensibilidad y la reproducibilidad del ensayo se mejora. Por ejemplo, en una forma de realización, la señal de datos atribuida a dos o más compartimentos celulares se puede distinguir de una forma más fiable. En otra forma de realización, la señal de datos se puede distinguir con al menos aproximadamente 90% de intervalo de confianza. En otra forma de realización, la señal de datos se puede distinguir con aproximadamente un 95% de intervalo de confianza. En otra forma de realización, la señal de datos se puede distinguir con aproximadamente un 99% de intervalo de confianza.

[0102] La puntuación de AQUA® normalizada proporciona una determinación de punto de corte más reproducible, llevando a mayor superior de clasificación de muestra entre rondas. En una forma de realización, el ensayo proporciona una concordancia mayor de 85% para clasificación de muestra de una ronda a otra para cada muestra. En otra forma de realización, el ensayo proporciona más de 90% de concordancia para clasificación de muestra de una ronda a otra para cada muestra. En otra forma de realización, el ensayo proporciona más de 95% de concordancia para clasificación de muestra de una ronda a otra para cada muestra. En otra forma de realización, el ensayo proporciona más de 99% de concordancia para clasificación de muestra de una ronda a otra para cada muestra.

[0103] La puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada más reproducible de expresión de biomarcador. En una forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad por encima de 80%. En otra forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad por encima de 90%. En otra forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad por encima de 95%. En otra forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad por encima de 99%. En otra forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad de aproximadamente 85% a aproximadamente 99%. En otra forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad de aproximadamente 90% a aproximadamente 99%. En otra forma de realización, la medida cuantificada del nivel de expresión del biomarcador tiene una reproducibilidad de aproximadamente 90% a aproximadamente 97%).

[0104] En una forma de realización, la puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo de 20%. En otra forma de realización, la puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo de 10%. En otra forma de realización, la puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo de 5%. En otra forma de realización, la puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%. En otra forma de realización, la puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%. En otra forma de realización, la puntuación de AQUA® normalizada proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) de aproximadamente 4% a aproximadamente 7%.

[0105] Así, las puntuaciones de AQUA® normalizadas proporcionan un ensayo fiable para comparar grupos de muestra de manera que el biomarcador puede estar más específicamente correlacionado con las características particulares, llevando a diagnóstico y estimación de pronóstico más fiables.

Ejemplos

Ejemplo 1: estandarización de análisis HER2 utilizando materiales y métodos de tecnología AQUA® automatizada

Descripción de cohorte y construcción de TMA

5 [0106] Una cohorte de cáncer de mama grande en el formato de microarray tisular (TMA) fue empleada en estos estudios para probar técnicas de estandarización. Esta cohorte de la Yale Tissue Microarray Facility (YTMA49) ha sido descrita en detalle previamente (Dolled-Filhart M, *et al.* Cancer Res. (2006) 66:5487-94). En resumen, la cohorte de mama (n=669) de carcinoma ductal invasivo fue recogida en serie del departamento de patología de la Universidad de Yale de 1961 a 1983. También en la matriz hay una selección de tejido normal y controles de línea celular. El tiempo de seguimiento medio es 12,8 años con una edad media de diagnóstico de 58,1 años. Esta cohorte contiene aproximadamente la mitad de especímenes de ganglios positivos y la mitad de ganglios negativos. Información de tratamiento detallada no estaba disponible para esta cohorte.

10 Coloración de tejido de inmunohistoquímica/inmunofluorescencia

15 [0107] La coloración inmunohistoquímica basada en cromógeno y marcada para casos en YTMA49 fue realizada previamente como se describe (Camp RL, *et al.* Cancer Res. (2003) 63:1445-1448, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad). YTMA49 fue manchada usando un protocolo de inmunofluorescencia indirecta modificada (Camp RL, *et al.* Nat. Med. (2002) 8:1323-1327, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad). En resumen, diapositivas de microarrays de tejido recubierto de parafina precortado se desparafinizaron y se recuperó el antígeno por recuperación de epítipo inducido por calor en 10 mM de Tris (pH 9,0). Usando una tinción automática (LabVision, Fremont, CA), las diapositivas se preincubaron con Background Sniper (BioCare Medical, Concord, CA). Las diapositivas se incubaron luego con anticuerpos primarios contra HER2 (Dako (Carpintería, California), policlonal de conejo, 1:8000 dilución) y pan-citoqueratina (policlonal de conejo, 1:200 dilución, DAKO, Carpintería, CA) diluido en DaVinci Green (BioCare Medical, Concord, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente.

25 [0108] Las diapositivas fueron lavadas 3 x 5 min con 1X TBS conteniendo 0,05% Tween-20. Anticuerpos secundarios correspondientes fueron diluidos en Da Vinci Green e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Estos incluyen bien anticuerpos directamente conjugados con un fluoróforo para anti-citoqueratina (cabra anticonejo conjugado con Alexa 555; 1:100, Molecular Probes, Eugene, Oregon), y/o conjugado con una peroxidasa de rábano (HRP) vía, anti-ratón o conejo Envision (Dako, Carpintería, California). Las diapositivas fueron otra vez lavada 3 x 5 min con TBS conteniendo 0,05% Tween-20. Las diapositivas fueron incubadas con un sistema de amplificación de cromágeno fluorescente (Cy-5-tiramida, NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts) que, como DAB, se activa por HRP y produce la deposición de numerosos tintes de Cy-5 de manera covalente asociados inmediatamente adyacentes al anticuerpo secundario conjugado con HRP. Cy-5 (rojo) fue usado porque su valor máximo de emisión está bien fuera del espectro verde-naranja de auto-fluorescencia de tejido. Las diapositivas para análisis automatizado fueron cubiertas con un medio de diapositiva que contenía DAPI antiborrado (ProLong Gold, Molecular Probes, Eugene, OR).

35 Sistema de microscopía y adquisición de imagen

40 [0109] El sistema PM2000™, comercializado por HistoRx, Inc. (New Haven, CT), se basa en un sistema descrito previamente (Camp *et al.*, 2002, *supra*). En resumen, está compuesto por el microscopio de epifluorescencia Olimpo BX51 (Olimpo America, Inc., Center Valley, PA) que está equipado con una boquilla motorizada para controlar selección de objetivos (por ejemplo, 4X, 10X, 20X, 40X y 60X); un torreta de filtro motorizado para controlar la selección de diferentes cubos de filtro (por ejemplo, DAPI, Cy2, Cy3, Cy5 y Cy7 o longitudes de onda equivalentes); una fase motorizada para controlar los movimientos de fase (Prior Scientific Inc., Rockland, MA); una fuente luminosa de mercurio/haluro metálico X-Cite 120 (EXFO Life Sciences & Industrial Division, Ontario, Canadá); y una cámara digital monocromática QUANTFIRE (Optronics, Inc., Goleta, CA).

50 [0110] La captura de imagen automatizada fue realizada por el HistoRx PM-2000 utilizando el paquete de software AQUAsition™. Imágenes digitales de alta resolución, 8 bits (dando como resultado 256 valores de intensidad discretos por píxel de una imagen adquirida) de la coloración de citoqueratina visualizada con Cy3, DAPI, y coloración objetivo (HER2) con Cy5 fueron capturadas y salvadas para cada histopunto en la matriz. Se escribieron píxeles en ficheros de imagen como función de potencia (potencia (P) = ((intensidad de píxel/256)/tiempo de exposición) para ayudar a compensar las variaciones experimentales en la intensidad de coloración y tiempos de exposición.

55 Generación de puntuación de AQUA®

60 [0111] Imágenes fueron convalidadas para tumor de área en porcentaje (tumores que muestran <5% área/campo fueron censurados), desenfocado y detritos. De las 669 muestras tumorales en YTMA49, 86 muestras fueron censurados (12,8%) dejando 583 muestras para marcado y análisis posterior. Las puntuaciones de AQUA® específicas de compartimento para HER2 para cada histopunto fueron generadas basadas en el algoritmo PLACE (asignación local basada en píxel para compartimentación de algoritmo de expresión) como se ha descrito previamente (Camp *et al.*, 2002, *supra*). Para eliminar tendencia operador a operador para ajuste del umbral, un algoritmo de agrupamiento basado en píxel no supervisado para segmentación de imagen óptima fue usado en el algoritmo PLACE como se ha descrito en otro lugar de esta solicitud.

65 Estandarización de instrumento

[0112] Para estandarización de puntuación de AQUA® para variabilidad de instrumento, tres factores de calibración fueron desarrollados: factor de cubo de calibración (factor CC), factor de fuente luminosa (factor LS), y factor de trayectoria óptica Cy5 (factor OP). El cálculo de estos factores se basa en mediciones de intensidad de pixel dadas por imágenes adquiridas bajo condiciones descritas. Todos los factores se basan en un cubo de filtro especializado (cubo de calibración) diseñado por el cual luz se refleja directamente desde la fuente luminosa a la cámara vía papel de filtro blanco fijado al extremo objetivo del cubo de filtro. Para dar cuenta de las variaciones en las diferentes construcciones de cubos, los cubos de calibración para cada máquina fueron estandarizados calculando el porcentaje de la intensidad de luz total media en comparación con la intensidad de luz total media de un cubo de calibración "regla de oro" (produciendo el factor CC). Este es un factor constante que se calcula y mantiene para cada cubo, y así cada sistema de microscopio con ese cubo instalado. El factor de fuente luminosa se calcula para cada histopunto adquirido y es la intensidad de luz total como medida por el cubo de calibración dividido por una constante (100.000). El factor de trayectoria óptica representa la cantidad de luz pasada a través de una combinación de objetivo/filtro de microscopio específica con respecto a la intensidad de luz entrante medida. Para estas mediciones, una muestra estándar es requerida que se puede transferir entre máquinas diferentes y mantener la reproducibilidad en su construcción. Una diapositiva estándar fluorescente azul disponible comercialmente fue seleccionada para este propósito (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT). La estandarización fue realizada como se ha descrito en este caso previamente.

Análisis estadístico

[0113] Para análisis, las puntuaciones de AQUA® fueron Log2 transformadas. El análisis estadístico y el resultado fue realizado utilizando SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Il.) a menos que se especifique de otro modo. Los puntos de corte óptimos para datos de AQUA® HER2 continuos para muerte específica de enfermedad de 5 años fueron generados como una función de supervivencia utilizando el paquete de software X-Tile como se ha descrito previamente (Camp RL, *et al.*, Clin. Cancer Res. (2004) 10:7252-7259, que se incorpora en la presente por referencia en su integridad). X-tile ejecuta simulaciones Monte Carlo (por ejemplo, validación de cruce (Raeside DE. Phys Med Biol. (1976) 21:181-97, que se incorpora por referencia en su totalidad) para producir valores P corregidos para evaluar la significación estadística de datos generados por puntos de corte múltiples. El software también genera subconjuntos de formación/validación para estimación de valor P adicional. Porcentajes de acuerdo con 95% de intervalos de confianza para tablas de contingencia 2x2 fueron determinados utilizando la herramienta basada en la web, JavaStat, para análisis de tabla de contingencia de 2 vías.

Resultados

Coloración de inmunofluorescencia HER2

[0114] Manchas fluorescentes fueron multiplexadas para compartimentar y medir la expresión de marcadores biológicos específicos. Para HER2, solo píxeles (Cy5) en el compartimento derivado de citoqueratina (específico del epitelio) (Cy3) fueron considerados para análisis, diferenciando así el tumor de la señal HER2 estromal al igual que membrana/citoplasma de la señal HER2 nuclear. Como se describe, sólo los píxeles HER2 que coincidían con los píxeles de citoqueratina fueron usados para generar una puntuación de AQUA®. Correlación de puntuación de AQUA® con métodos de puntuación IHC tradicional

[0115] Las puntuaciones de AQUA® HER2 mostraron una correlación moderada, pero altamente significativa, con métodos de puntuación IHC categóricos (0, +1, +2 y +3) con valor Rho de Spearman de 0,46 ($P < 0,001$). El análisis de regresión multinomial (para comparación de datos categóricos contra continuos) mostró una correlación altamente significativa ($P < 0,001$) con un valor pseudo-R de 0,56. La figura 3 categoriza puntuaciones de AQUA® HER2 como una función de puntuaciones IHC utilizando un gráfico de caja. Aunque hubo una diferencia altamente significativa en la media de población (ANOVA $P < 0,001$), dado que AQUA® proporciona una puntuación de expresión continua, superposición significativa de puntuaciones de AQUA® fue observada a través del rango de puntuación categórica tradicional.

Puntuaciones de expresión HER2 normalizadas

[0116] Tres secciones en serie de una cohorte (n=669) de cánceres de mama invasivos fueron manchados fluorescentemente para HER2 como se describe en materiales y métodos. La primera sección en serie fue usada para generar puntuación de AQUA® a través de tres instrumentos diferentes y tres operadores diferentes. Las segundas y terceras secciones en serie fueron manchadas en días separados para valorar la variabilidad ronda a ronda. La figura 4 da parcelas de caja que muestran distribuciones de puntuación de AQUA® normalizadas para cada parámetro de adquisición indicado (instrumento (figura 4A), operador (figura 4B) y rondas de coloración independiente (figura 4C)). Para las 583 muestras de paciente, el coeficiente de porcentaje medio de variación (%CV) fue 1,8% (min = 0,04%; máx = 10,7%) a través de instrumentos, 2,0% (min = 0,06%; máx = 15,6%) a través de operadores, y 5,1% (min = 0,12%; máx. = 29,7%) a través de rondas de coloración independientes. Estos %CVs rivalizan con los inmunoensayos *in vitro* tales como ELISA (Butler *et al.* J Immunoassay. (2000) 21:165-209).

65 Concordancia positiva/negativa

[0117] Un parámetro crítico para análisis HER2 en el laboratorio clínico es la capacidad para clasificar reproductivamente pacientes como positivos o negativos. Utilizando la supervivencia como una etiqueta sustituta para classification22 positiva/negativa, un punto de corte de puntuación de AQUA® óptimo fue establecido utilizando X-tile19 para puntuaciones de AQUA® HER2 normalizadas producidas para instrumento 1, operador 1 y ronda de coloración 1. La figura 5A muestra análisis de supervivencia Kaplan-Meier de clasificación HER2 positiva/negativa para instrumento 1. Como se describe en materiales y métodos, el punto de corte fue convalidado con importancia por la simulación Monte Carlo ($P < 0,001$) y subconjuntos de formación/validación ($P = 0,002$). Este punto de corte validado se aplicó a puntuaciones de AQUA® generadas en instrumentos 2 y 3 con importancia, $P < 0,001$ y $P = 0,004$ respectivamente (figuras 5B y 5C). Se observó reproducibilidad similar a través de operador independiente y adquisiciones de ronda de coloración con valores P todos $\leq 0,01$ (datos no mostrados).

[0118] Las actuales pautas ASCO-CAP están sugiriendo que los laboratorios consigan 95% de concordancia positiva/negativa para metodologías de ensayo HER2 actuales (Wolff AC *et al*, Arch Pathol Lab Med. (2007) 131:18). Un estudio reciente muestra que para puntuación basada en IHC HER2, la concordancia entre observadores varía de 54-85%, por debajo de estas pautas (Hameed *et al.*; en prensa; comunicación directa). Concordancia positiva/negativa para puntuación de AQUA® normalizada a través de instrumentos, operadores y días de coloración fue examinada utilizando los puntos de corte establecidos por encima. Como se muestra en la figura 6, la concordancia total oscilaba de 94,5% (instrumento 1 a instrumento 3; figura 6B) a 99,3% (operador 1 a operador 2, figura 6C). Estos análisis incluyen todos los casos que incluyen los que serían considerados ambiguos.

[0119] Para valorar donde se produjo la clasificación diferencial en la distribución de puntuaciones de AQUA® normalizadas, histogramas de frecuencia panelados fueron generados para examinar donde casos diferencialmente clasificados estaban ocurriendo. Como se muestra en la figura 7, para instrumento a instrumento, operador a operador y ronda a ronda, casos diferencialmente clasificados ocurren en el punto de corte y no sobre toda la distribución. Estos datos sugieren que el error de clasificación concierne a la no generación de selección de punto de corte y reproducibilidad de la puntuación de AQUA® HER2 normalizada. Tomados en conjunto, estos datos muestran clasificación de pacientes para evaluación interinstrumento, interoperador e interronda de expresión HER2 usando puntuación de AQUA® es altamente reproducible con índices de concordancia que se acercan, si no superan, los sugeridos por ASCO/CAP.

Ejemplo 2: análisis AQUA® de EGFR: datos de rendimiento analítico

[0120] Los métodos de la presente invención fueron aplicados a la evaluación del biomarcador EGFR en las secciones de tejido de cáncer de mama. Como se muestra en figura 8A, una cohorte TMA de 748 especímenes fue analizada para expresión HER2 por análisis de AQUA® normalizado a través de tres instrumentos, 3 operadores y 3 rondas de coloración separadas con un %CV medio de 4,3%. La evaluación de rendimiento analítico preliminar fue realizada con EGFR PharDx (Dako). Como muestran las figuras 8B-D, el análisis AQUA® de expresión EGFR a través de 3 diapositivas y 3 días de coloración en un TMA compuesto por tumor de mama y líneas celulares ($n=152$) muestra un grado alto de precisión diapositiva a diapositiva y día a día con una pendiente media de 1,00047, un R de Pearson medio de 0,95, un %CV medio para tejido tumoral de 3,3%, y un %CV medio para líneas celulares de 4,7%. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el análisis de AQUA® permite un ensayo EGFR con un grado alto de precisión, y combinado con controles de instrumento y software, el desarrollo de un ensayo de biomarcador clínico robusto es posible.

Ejemplo 3: análisis AQUA® de expresión ER: reproducibilidad

[0121] Para demostrar la reproducibilidad del AQUAnalysis™ con otro biomarcador, cuatro bloques de tejido de mama fueron obtenidos que representaban un rango de expresión de receptor de estrógenos (ER) (según puntuación de Allred). Secciones de estos bloques de tejido se tomaron para generar diapositivas H&E sobre las que un patólogo certificado por la junta rodeó el área de tumor para todos los análisis posteriores. Un conjunto en serie de secciones fue manchado con DAB con el receptor α de estrógenos de ratón anti-humano monoclonal, anticuerpo de clon 1D5 y evaluado para puntuación Allred por el mismo patólogo. Véase, por ejemplo, Harvey JM, *et al.*, (1999) J. Clin. Oncol. 12:1474, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

[0122] Secciones en serie fueron luego manchadas utilizando el protocolo de coloración de inmunofluorescencia anteriormente descrito. Las imágenes fueron recogidas en la plataforma de microscopía HistoRx PM-2000™ y luego pasadas a AQUAnalysis™ para puntuación. Todas las puntuaciones fueron transformadas en una log2.

[0123] Ficheros de imagen para las cuatro diapositivas fueron adquiridos y luego pasados a través del paquete de software AQUAnalysis™ $n=10$ veces por el mismo operador para demostrar reproducibilidad de software total. Para todos los ficheros, el %CV fue esencialmente 0 (menos luego 1E-7).

[0124] Los mismos cuatro ficheros de imagen fueron luego proporcionados a tres operadores diferentes junto con las instrucciones de funcionamiento del software. Aquí, los operadores censuraron imágenes en el método descrito para revisión técnica de calidad de imagen, que refleja uso típico. Los resultados, mostrados en la tabla 1, demuestran que

incluso con más del 30% de variabilidad en el número de imágenes puntuadas (en el caso de diapositivas #3 y #4) el %CV en la puntuación total sigue siendo del orden de 1% o menos.

Tabla 1. Reproducibilidad interoperador

(n=3)	Operador	Puntuación de AQUA® media por operador	#campos puntuados	Media	StDev	%CV
Diapositiva #1	Operador 1	9,941	100	9,945	0,0047	0,05
	Operador 2	9,945	104			
	Operador 3	9,950	109			
Diapositiva #2	Operador 1	10,382	60	10,397	0,0357	0,34
	Operador 2	10,437	61			
	Operador 3	10,370	62			
Diapositiva #3	Operador 1	10,254	102	10,232	0,0194	0,19
	Operador 2	10,216	110			
	Operador 3	10,227	150			
Diapositiva #4	Operador 1	13,723	4	13,818	0,1644	1,19
	Operador 2	13,723	4			
	Operador 3	14,008	14			

[0125] Para demostrar el rendimiento en sitios independientes y usando sistemas de hardware alternativos para adquisición de imágenes, el software AQUAnalysis™ fue evaluado en tres plataformas diferentes que cumplieran las especificaciones de hardware requeridas (descritas en el manual del operador). Los sistemas son descritos más abajo en la tabla 2.

Tabla 2. Sistemas de hardware usados para análisis de reproducibilidad

	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
Componentes	HistoRx PM-2000™	Sistema externo #1	Sistema externo #2
Fuente luminosa	Exfo Xcite 120	Exfo Xcite 120	Prior Lumen
Microscopio	Olympus BX-52	Olympus BX-51	Nikon 50i
Objetivo Mag.	20X	10X	10X
Cámara	Optronics Quantifire, 2048x2040,7.4µM píxel	Cooke Sensicam QE 1376x040,6.45µM píxeles	PixelLink PL-B872-MF 1392x1040,6.45µM píxeles
FOV tamaño	758µMx758µM	887µMx671µM	898µMx671µM
Filtros	Cy3, Cy5, DAPI	Cy3, Cy5, DAPI	Cy3, Cy5, DAPI

[0126] Para asegurar pruebas uniformes, era crítico asegurar que las mismas regiones de tejido fueran probadas en cada sistema ya que la adquisición de imagen automatizada no es requerida o está necesariamente disponible en todas las plataformas enumeradas. Para realizar esto, un TMA fue construido a partir de las mismas cuatro muestras descritas en las pruebas de reproducibilidad precedentes, utilizando cinco núcleos de cada uno de los cuatro bloques (para un total de 20 puntos). Este microarray fue luego manchado inmunofluorescentemente y el mismo TMA único fue adquirido en tres sistemas de hardware separados consecutivamente. Las imágenes fueron adquiridas en el laboratorio del sistema de hardware instalado por el operador después de recibir entrenamiento sobre el funcionamiento del software. Los resultados fueron mantenidos en forma ciega para todas las pruebas externas y se proporcionan más adelante en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de pruebas inter-sitio/inter-hardware

	HistoRx			Sitio externo 1			Sitio externo 2			Total		
	AVG	SD	CV	AVG	SD	CV	AVG	SD	CV	AVG	SD	CV
Muestra 1	8,12	0,19	2,40	9,01	0,40	4,44	8,36	0,45	5,34	8,50	0,46	5,37
Muestra 2	9,05	0,55	6,10	9,72	0,52	5,36	8,74	0,81	9,22	9,17	0,51	5,51
Muestra 3	9,34	0,16	1,66	10,08	0,04	0,39	9,40	0,31	3,26	9,61	0,41	4,27
Muestra 4	12,01	0,30	2,53	12,78	NA	NA	11,23	0,57	5,11	12,01	0,77	6,43

[0127] Cada "muestra" se refiere al promedio de las puntuaciones de los puntos TMA cinco veces redundantes con núcleo de la muestra de sección de tejido entera asociada usada en análisis precedente (con un rango de puntuaciones de Allred).

5 [0128] En general, los valores de %CV para valores de puntuación AQUA® medios están en el rango de 4-6,5% y no varían significativamente a través del rango de expresión de ER. Las variaciones de %CV observadas dentro de una única muestra en un único sitio es el resultado de indicativo de heterogeneidad marcadora en la muestra, no error de medición. El análisis ANOVA indicó que aunque haya variación significativa entre las puntuaciones de muestras como previsto ($p < 0,001$), no hay diferencia significativa entre sitios ($p = 0,58$).

10 **Ejemplo 4: análisis AQUA® de expresión ER: correlación con puntuación Allred**

15 [0129] Para demostrar la utilidad de las puntuaciones AQUA®, un estudio de comparación fue realizado para examinar la relación entre tejido de mama inmunofluorescentemente manchado y luego puntuado usando AQUAnalysis™ y tejido de mama manchado cromogencialmente luego puntuado utilizando el método Allred. Como se ha discutido en el ejemplo 1, una cohorte de microarray tisular de 669 pacientes se obtuvo de la Yale University Tissue Microarray Facility que consistía en muestras de los archivos de tejidos del Yale University Department of Pathology recogido entre 1961 y 1983.

20 [0130] Dos secciones en serie fueron manchadas utilizando el anticuerpo de ratón monoclonal 1D5. Una sección fue manchada utilizando DAB y la segunda utilizando los métodos de inmunofluorescencia anteriormente descritos. La diapositiva manchada con DAB fue luego proporcionada a los tres patólogos certificados por la junta para puntuación de Allred. A cada patólogo se le ocultaron los resultados de los otros (y los resultados de coloración fluorescente) y no se les dio más información que la naturaleza del tejido puntuado y el biomarcador (ER). En paralelo, la sección en serie fluorescentemente manchada del TMA fue pasada por el software AQUAnalysis™ y se generaron puntuaciones AQUA®. Hubo una tendencia definitiva entre la puntuación de Allred y la puntuación de AQUA® como se muestra más abajo (figuras 9A-C) para todos los patólogos. La puntuación de Allred y la puntuación de AQUA® fue altamente correlativa ($p < 0,001$) para todos los patólogos por análisis de correlación no paramétrica (Spearman's Rho, figura 9D). El análisis de regresión logística multinomial demostró una relación significativa ($p < 0,001$) y directa (pseudo R2) entre la puntuación de Allred y la puntuación de AQUA® para todos los patólogos (véase figura 9).

35 [0131] Aunque hay una variación en las puntuaciones individuales proporcionadas por los patólogos, en la práctica típica, un punto de corte se aplica a los datos. Para el método de puntuación de Allred, un punto de corte de 3 fue usado de manera que las puntuaciones < 3 (0 o 2) fueron consideradas negativa y las puntuaciones ≥ 3 fueron consideradas positiva. Véase, por ejemplo, Harvey *et al, supra*. Este punto de corte se aplicó a los resultados individuales de cada uno de los conjuntos de datos de patólogo manualmente puntuados y una puntuación de consenso fue generada. Muestras donde al menos un patólogo no pudo proporcionar una puntuación fueron eliminadas del consenso. Si las puntuaciones no concordaron, la puntuación de la mayoría fue usada. Como resultado de esto, se observó que los patólogos demostraron acuerdo universal para clasificación positiva/negativa 91% del tiempo para los 523 casos.

40 [0132] Para determinar un punto de corte para los datos de puntuación de AQUA®, un algoritmo de agrupamiento Bayesiano no supervisado basado en distancias de logaritmo de verosimilitud se aplicó utilizando el programa de software disponible comercialmente, SPSS (SPSS, Inc. Chicago, 11). Para este algoritmo, los pacientes fueron agrupados basados en miembro de agrupación de las puntuaciones de AQUA®. Cuando el agrupamiento fue realizado, cuatro agrupaciones se manifestaron en los datos (véase figura 10A). Análogo de la puntuación de Allred, la supervivencia fue usada para determinar clasificación positiva y negativa entre grupos de expresión. Como se muestra en la figura 10B, tres (agrupaciones 2-4) muestran supervivencia mejorada mientras que la agrupación 1 muestra supervivencia disminuida. Por lo tanto, los pacientes de la agrupación 1 fueron considerados ER negativos y todos los demás ER positivos.

50 [0133] Con clasificación positiva/negativa determinada para los datos de AQUA®, una matriz de concordancia fue generada para comparar los resultados del software de AQUAnalysis™ con los resultados del consenso de puntuación derivado de la puntuación de Allred manual. Los resultados indican que la concordancia total entre los métodos es del 94,9% con acuerdo positivo de porcentaje de 96,0% y acuerdo negativo de porcentaje de 92,5%, como se muestra en la tabla 4 por debajo.

60

65

Tabla 4. Concordancia de puntuación de AQUA® con puntuación de Allred de IHC manual.

Puntuación de AQUA®	Puntuación de Allred Manual			Total
		Positivo	Negativo	
	Positivo	218	8	226
	Negativo	9	99	108
	Total	227	107	334
% Acuerdo positivo (218/227) = 96,0% (95%CI = 92,6 - 98,2)				
% Acuerdo negativo (99/107) = 92,5% (95%CI = 85,8 - 96,7)				
% Acuerdo total (317/334) =94,9% (95%CI = 92,0 - 97,0)				

5 [0134] Como confirmación de clasificación positiva/negativa de puntuaciones ER de AQUA®, la supervivencia total fue comparada entre puntuación de Allred y puntuación de AQUA®, como se muestra en la figura 11. Ambos métodos predicen supervivencia específica de enfermedad quinquenal significativa y muestran índices de supervivencia acumulativa similares para clasificación positiva/negativa.

10 **Ejemplo 5: reproducibilidad de puntuación de AQUA® y puntuación de Allred**

10 [0135] Una única diapositiva de TMA descrita en los ejemplos 3 y 4 fue manchada para expresión ER usando técnicas de inmunohistoquímica cromogénica convencional tal y como se ha descrito anteriormente e independientemente evaluada por tres patólogos usando microscopía óptica y puntuada por el método Allred (figura 12A). Una segunda diapositiva TMA, sección en serie, fue manchada para análisis de AQUA® (inmunohistoquímica fluorescente) de expresión ER y la misma diapositiva fue analizada en tres instrumentos independientes por análisis de AQUA® (figura 12B). El examen de los resultados obtenidos por cada patólogo unos contra otros mostrados como gráficos de dispersión (figura 12A) muestra que mientras que la concordancia total es alta, hay muestras consideradas positivas por un patólogo que son consideradas negativas por otro. Estos pacientes recibirían tratamientos diferentes (terapia hormonal) dependiendo del patólogo que lea sus resultados de ER.

20 [0136] Los valores kappa (que varan de 0 a 1, tabla 5) sobre la extensión de las puntuaciones de Allred indican que hay una gran cantidad de varianza en las determinaciones de puntuación manual de patólogos respectivos.

25 Tabla 5. Kappa de resultados puntuada por patólogos.

Ruta 1 vs. Ruta 2: Kappa = 0,482 (p<0,001) Ruta 1 vs. Ruta 3: Kappa = 0,444 (p<0,001) Ruta 2 vs. Ruta 3: Kappa = 0,400 (p<0,001)
--

30 [0137] El análisis de regresión total de los resultados obtenido para cada combinación de instrumentos PM 2000 se muestra en la figura 12B. Hay correlación extremadamente alta ($R^2 > 0,99$ en todos los casos, tabla 6) con una fuerte correspondencia (coeficientes de regresión, análogo a la pendiente de la línea de regresión, son todos ~1,0). Además, el análisis ANOVA de los conjunto de datos produce $p > 0,05$, indicando que los conjuntos de datos son estadísticamente indistinguibles. En comparación con la figura 12A, los resultados obtenidos por el análisis AQUA es altamente reproducible con un CV medio de 1,35%. Por lo tanto los métodos de la presente invención proporcionan resultados consistentes independientemente de en qué instrumento (y por lo tanto ubicación) la muestra fue analizada.

35 Tabla 6. Comparación de resultados obtenidos en tres instrumenta por análisis AQUA.

Comparación	R ²	Coefficiente de regresión (95% CI; valor p)
Instrumento 1 v2	0,996	1,003 (0,99 - 1,01; <0,001)
Instrumento 1 v3	0,995 1,01	(1,00 - 1,02; <0,001)
Instrumento 2 v3	0,996	1,003 (0,99 - 1,01; <0,001)

40 [0138] Los ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos solo y no deberían usarse para limitar el ámbito de la invención. Muchas otras formas de realización de la invención son aparentes para los técnicos en la materia en vista del contenido y las instrucciones de esta divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Método para cuantificar reproductivamente la expresión de biomarcadores en una muestra de tejido montada en una diapositiva que comprende:

- (a) obtención de una muestra de tejido montada en una diapositiva, que se ha manchado para permitir la localización de al menos un compartimento celular y al menos un biomarcador;
- (b) obtención de una o más imágenes formadas por píxeles de la muestra de tejido manchada utilizando un sistema óptico estandarizado, y análisis de una o más imágenes formadas por píxeles para obtener uno o más conjuntos de datos;
- (c) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados a partir de los píxeles de la imagen para diferenciar la señal de datos del ruido;
- (d) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados a partir de los píxeles de la imagen para diferenciar la señal de datos atribuible a cada uno de dicho al menos un compartimento celular;
- (e) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados a partir de los píxeles de la imagen para diferenciar la señal de datos atribuible a dicho al menos un biomarcador para cada uno de dicho al menos un compartimento celular;
- (f) cuantificación de la cantidad de biomarcador expresado en cada uno de dicho al menos un compartimento celular para llegar a una puntuación estandarizada, que es un producto de una puntuación bruta, un factor de fuente luminosa, un factor de trayectoria óptica, y opcionalmente un factor de cubo de calibración,

por lo cual el sistema óptico estandarizado está dispuesto para ajuste automático de tiempo de exposición para proporcionar un rango dinámico optimizado de datos capturados en los píxeles de la imagen, y donde un tiempo de exposición nuevo se calcula como:

$$E = E' \times (1 - (0.5)^{(1+S)})$$

donde

$$S = A \times (CCD_x \times CCD_y \times SL) / P,$$

donde E es el nuevo tiempo de exposición, E' es el tiempo de exposición actualmente establecido. A es un nivel de agresión, SL es el límite de saturación, CCDx y CCDy representan las dimensiones de píxel de la imagen capturada, y P es el recuento de píxeles a intensidad máxima.

- 2. Método según la reivindicación 1, donde cada paso de análisis automático se realiza de una manera no supervisada.
- 3. Método según la reivindicación 1, donde la cantidad de biomarcador expresado en cada dos o más de los compartimentos celulares es cuantificada.
- 4. Método según la reivindicación 1, donde la señal de datos atribuible a dos o más compartimentos celulares se diferencia con un intervalo de confianza de aproximadamente 95%.
- 5. Método según la reivindicación 1, que comprende además la evaluación de la calidad de una o más muestras de tejido montadas en diapositiva o una o más imágenes formadas por píxeles o una o más partes agrandadas de las mismas por análisis de cualquiera de integridad de señal, integridad de muestra e integridad de imagen de la muestra montada en diapositiva y eliminando la imagen del análisis si una o más de la integridad de señal, integridad de muestra e integridad de imagen falla.
- 6. Medio legible por ordenador que tiene instrucciones legibles por ordenador almacenadas en el mismo para su ejecución por un procesador para ejecutar un método de cuantificación reproductivamente de expresión de biomarcador en una muestra de tejido montada en diapositiva que comprende:

- (a) adquisición de una o más imágenes formadas por píxeles de una muestra de tejido montada en diapositiva utilizando un sistema óptico estandarizado, que se ha manchado para permitir la localización de al menos un compartimento celular y al menos un biomarcador y análisis de una o más imágenes formadas por píxeles para obtener uno o más conjuntos de datos;
- (b) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados a partir de los píxeles de la imagen para diferenciar la señal de datos del ruido;
- (c) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados a partir de los píxeles de la imagen para diferenciar la señal de datos atribuible a cada uno de dicho al menos un compartimento celular; y
- (d) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados a partir de los píxeles de la imagen para diferenciar la señal de datos atribuible a dicho al menos un biomarcador para cada uno de dicho al menos un compartimento celular.

(e) cuantificación de la cantidad de biomarcador expresado en cada uno de dicho al menos un compartimento celular para llegar a una puntuación estandarizada, que es un producto de una puntuación bruta, un factor de fuente luminosa, un factor de trayectoria óptica, y opcionalmente un factor de cubo de calibración,

5 por lo cual el sistema óptico estandarizado está dispuesto para ajuste automático de tiempo de exposición para proporcionar un rango dinámico optimizado de datos capturados en los píxeles de la imagen, y donde un tiempo de exposición nuevo se calcula como:

$$E = E' \times (1 - (0.5)^{(1+S)})$$

10 donde

$$S = A \times (CCD_x \times CCD_y \times SL) / P,$$

15 donde E es el nuevo tiempo de exposición, E' es el tiempo de exposición actualmente establecido, A es un nivel de agresión, SL es el límite de saturación, CCDx y CCDy representan las dimensiones del píxel de la imagen capturada, y P es el recuento de píxeles a intensidad máxima.

20 7. Sistema para cuantificar reproductivamente la expresión de biomarcadores en una muestra de tejido montado en diapositiva que comprende:

(a) una o más lentes configuradas para agrandar al menos una porción de una muestra de tejido montada en diapositiva, que se ha manchado para permitir la localización de al menos un compartimento celular y al menos un biomarcador;

25 (b) un sistema óptico estandarizado, que incluye una fuente luminosa y un sensor de imagen en comunicación óptica con dicho una o más lentes, el sistema óptico obtiene una o más imágenes formadas por píxeles de la muestra de tejido manchada;

(c) un módulo procesador en comunicaciones con el sistema óptico, el módulo procesador configurado para analizar una o más imágenes formadas por píxeles para obtener uno o más conjuntos de datos; y luego:

30 (i) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados de los píxeles de imagen para diferenciar la señal de datos del ruido,

(ii) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados de los píxeles de imagen para diferenciar la señal de datos atribuible a cada uno de dicho al menos un compartimento celular, y

35 (iii) análisis automático de uno o más conjuntos de datos derivados de los píxeles de imagen para diferenciar la señal de datos atribuible a dicho al menos un biomarcador para cada uno de dicho al menos un compartimento celular.

(iv) cuantificación de la cantidad de biomarcador expresada en cada uno de dicho al menos un compartimento celular para llegar a una puntuación estandarizada, que es un producto de una puntuación bruta, un factor de fuente luminosa, un factor de trayectoria óptica, y opcionalmente un factor de cubo de calibración,

40 por lo cual el sistema óptico estandarizado está dispuesto para ajuste automático de tiempo de exposición para proporcionar un rango dinámico optimizado de datos capturados en los píxeles de la imagen, y donde un tiempo de exposición nuevo es calculado como:

$$E = E' \times (1 - (0.5)^{(1+S)})$$

45 donde

$$S = A \times (CCD_x \times CCD_y \times SL) / P,$$

50 donde E es el nuevo tiempo de exposición, E' es el tiempo de exposición actualmente establecido, A es un nivel de agresión, SL es el límite de saturación, CCDx y CCDy representan las dimensiones de píxel de la imagen capturada, y P es el recuento de píxeles a intensidad máxima.

55 8. Método según la reivindicación 1, que proporciona una concordancia mayor de 85% para clasificación de muestra de una ronda a otra para cada muestra.

9. Método según la reivindicación 1, que proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un nivel de reproducibilidad en el rango de aproximadamente 90 a aproximadamente 97 por ciento.

60 10. Método según la reivindicación 1, que proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) por debajo del 20 por ciento.

11. Método según la reivindicación 1, que proporciona una medida cuantificada de expresión de biomarcador que tiene un coeficiente de variación (%CV) en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 por ciento.
 12. Método según la reivindicación 1, donde la muestra de tejido montada en diapositiva ha sido manchada con una dilución óptima de uno o más reactivos y en la cual dicha dilución óptima produce una o más imágenes formadas por píxeles que tiene una métrica de rango dinámico óptima.
- 5

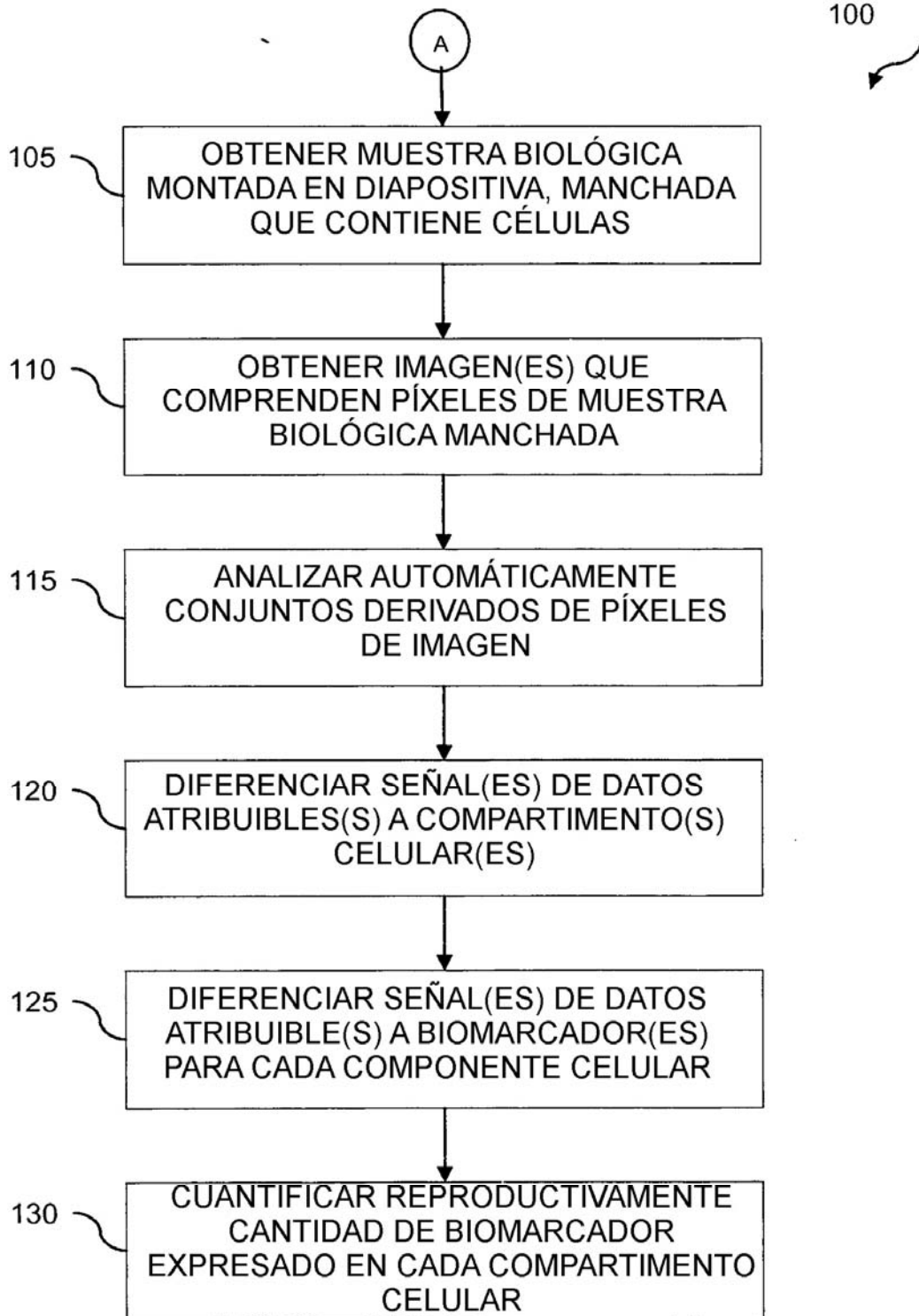


FIG. 1

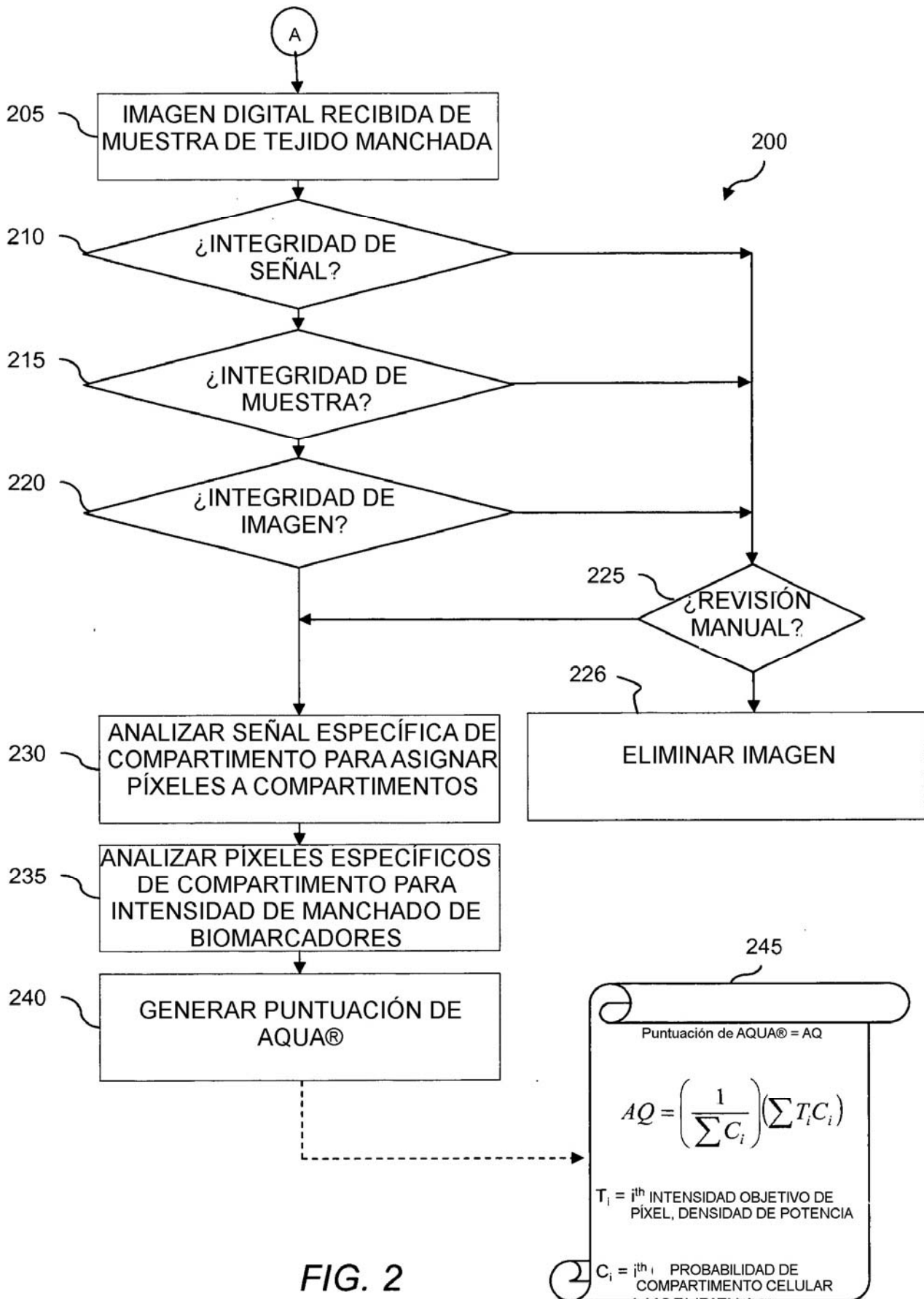


FIG. 2

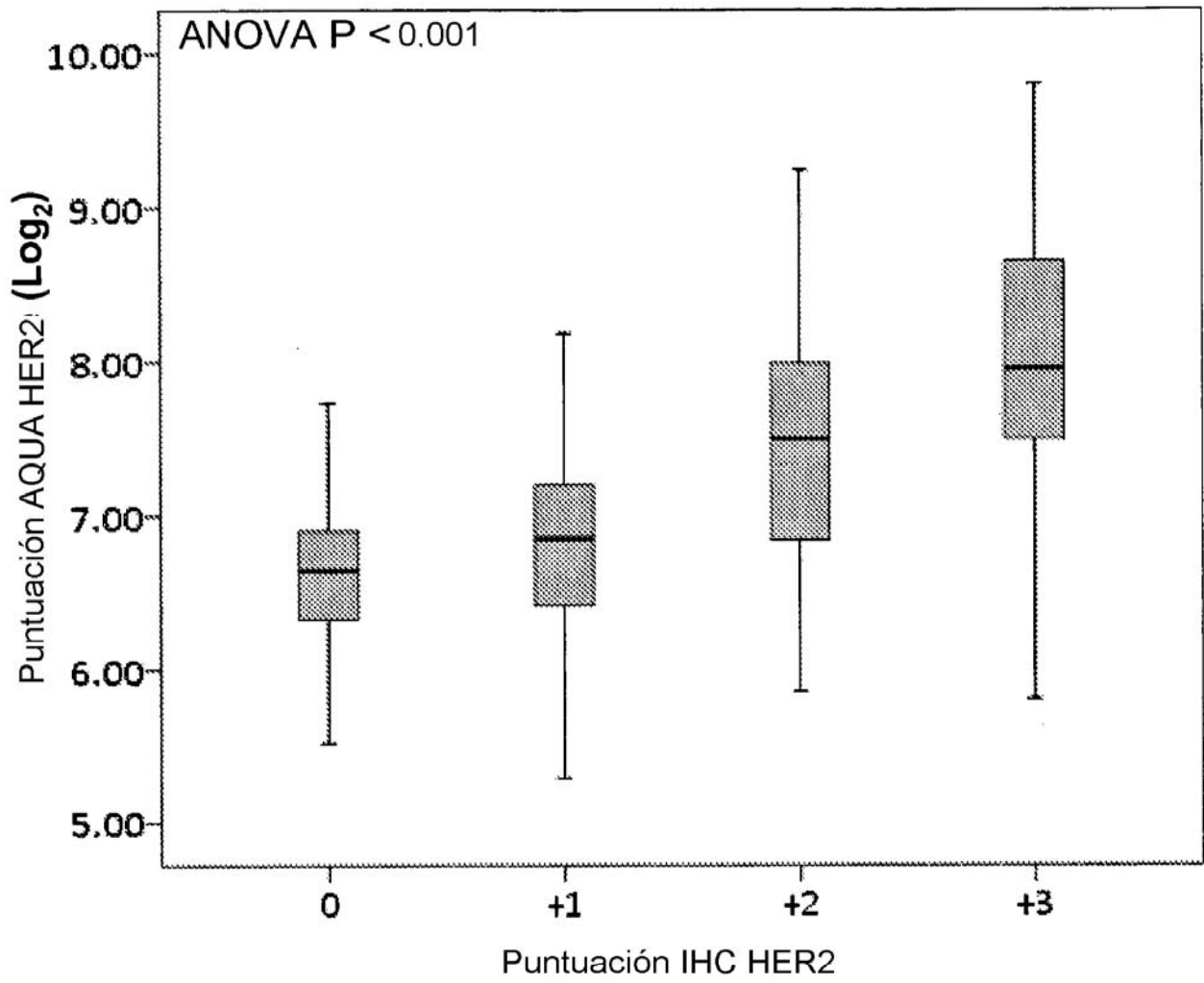


FIG. 3

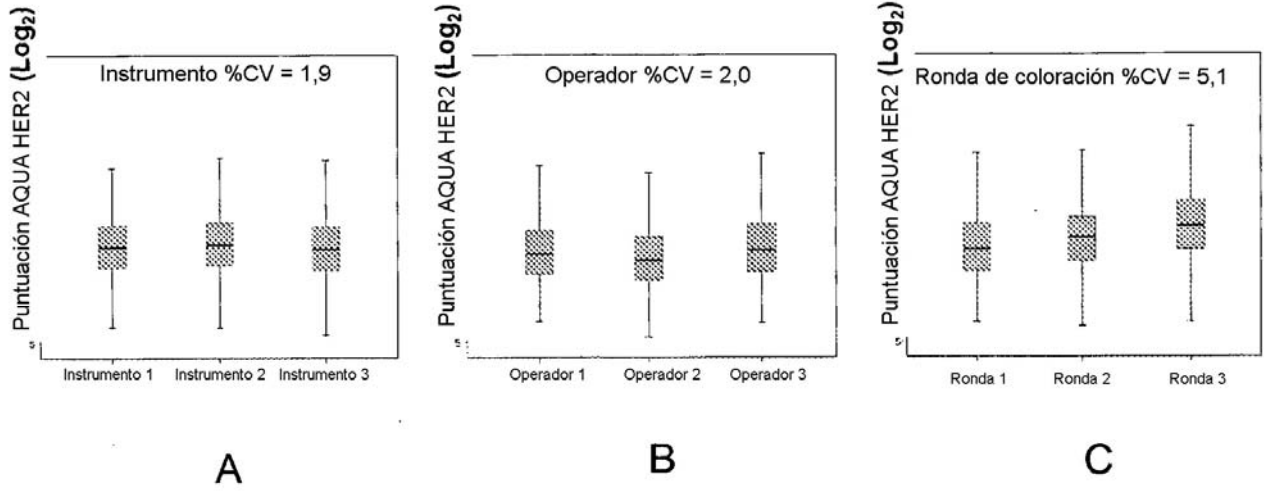
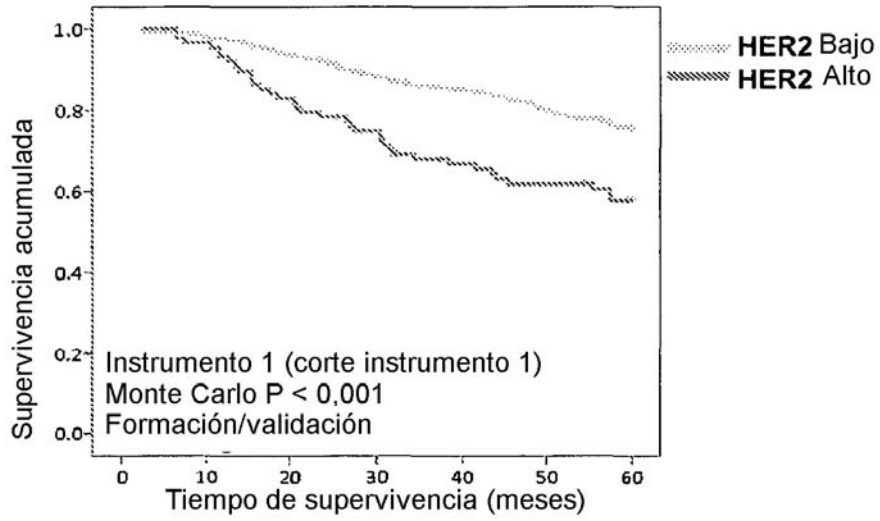
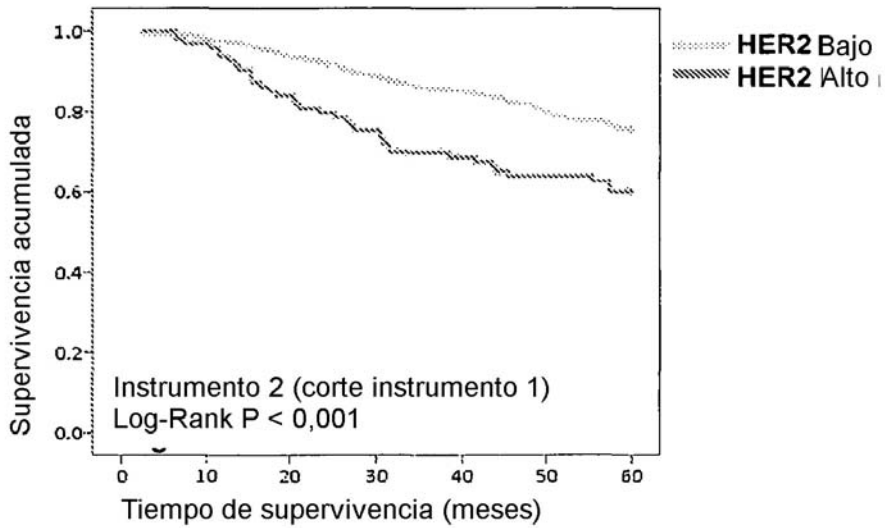


FIG. 4

A.



B.



C.

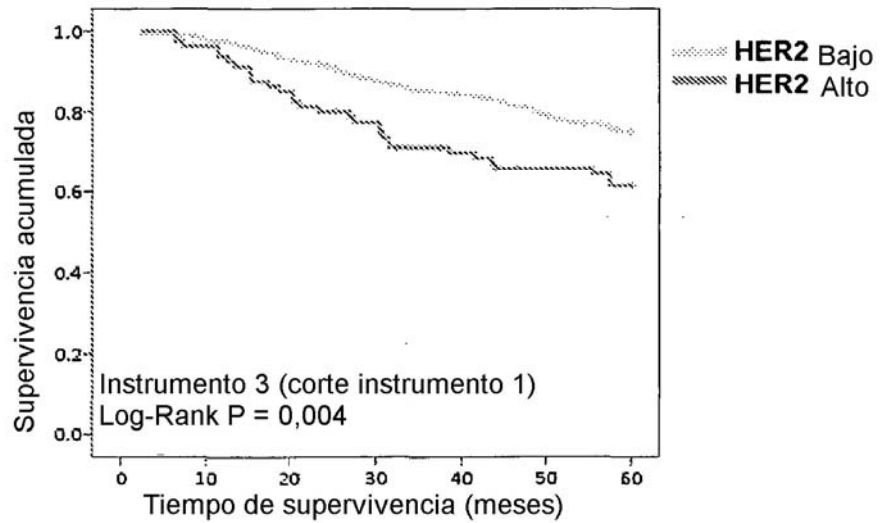


FIG. 5

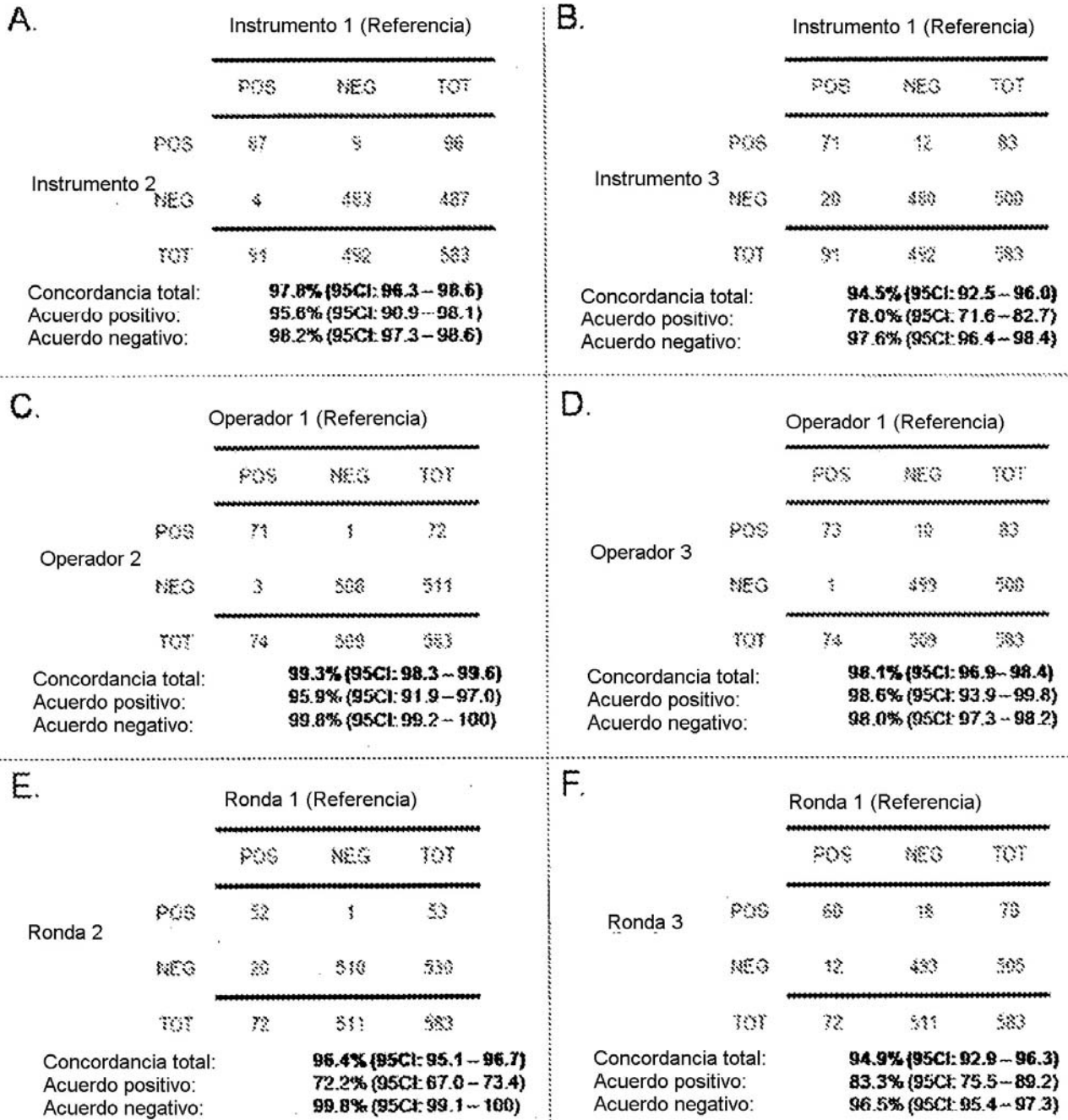


FIG. 6

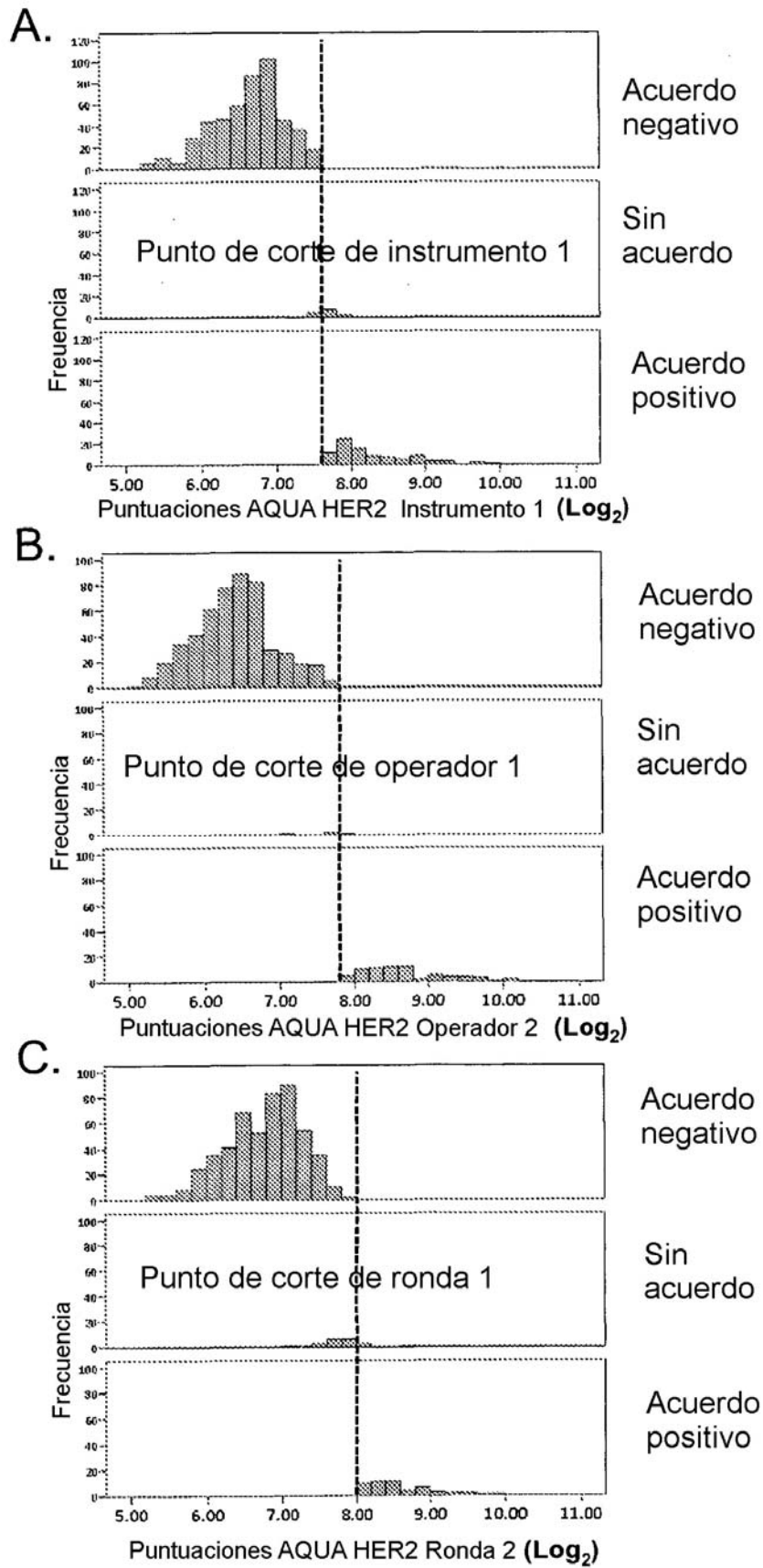


FIG. 7

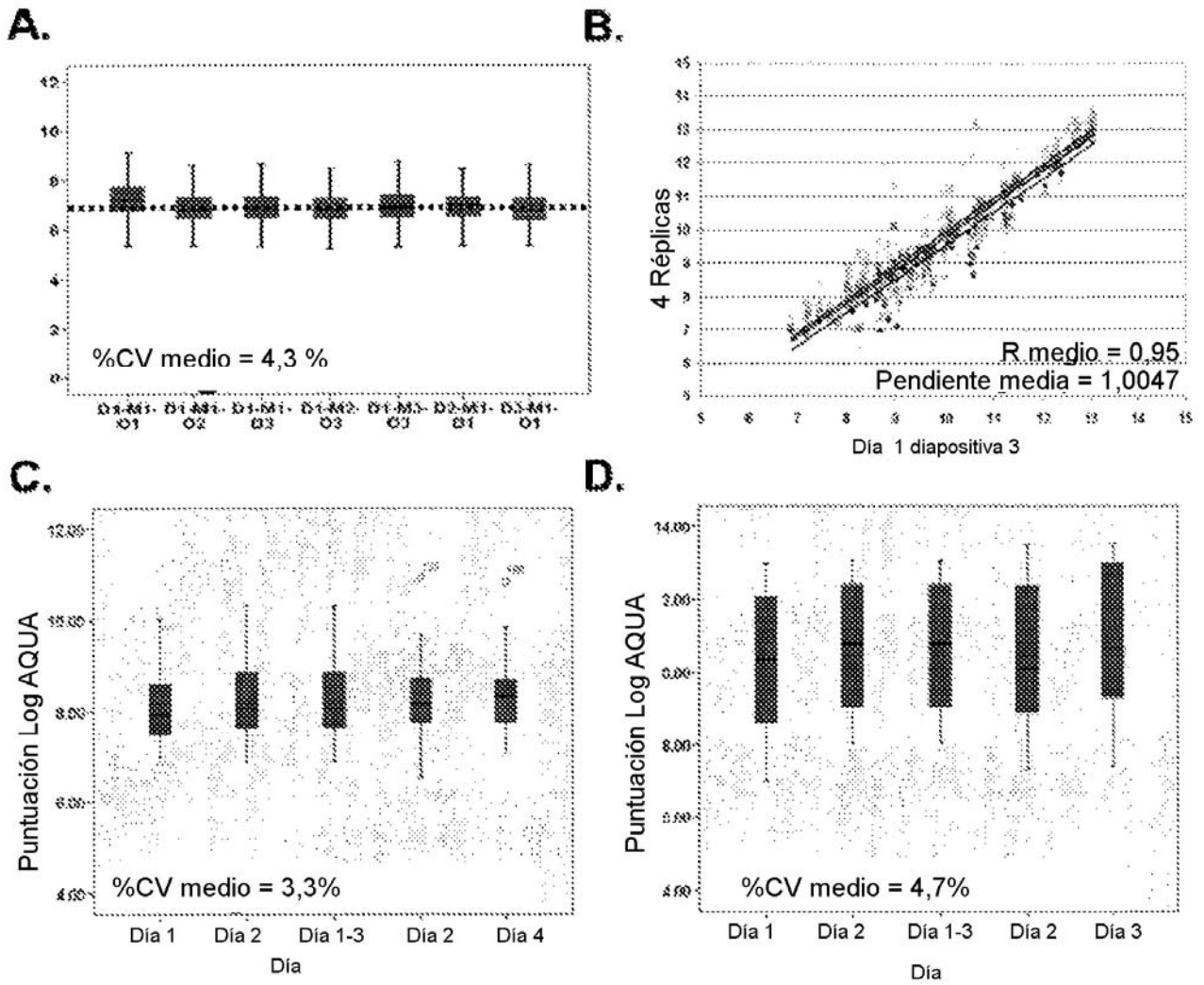


FIG. 8

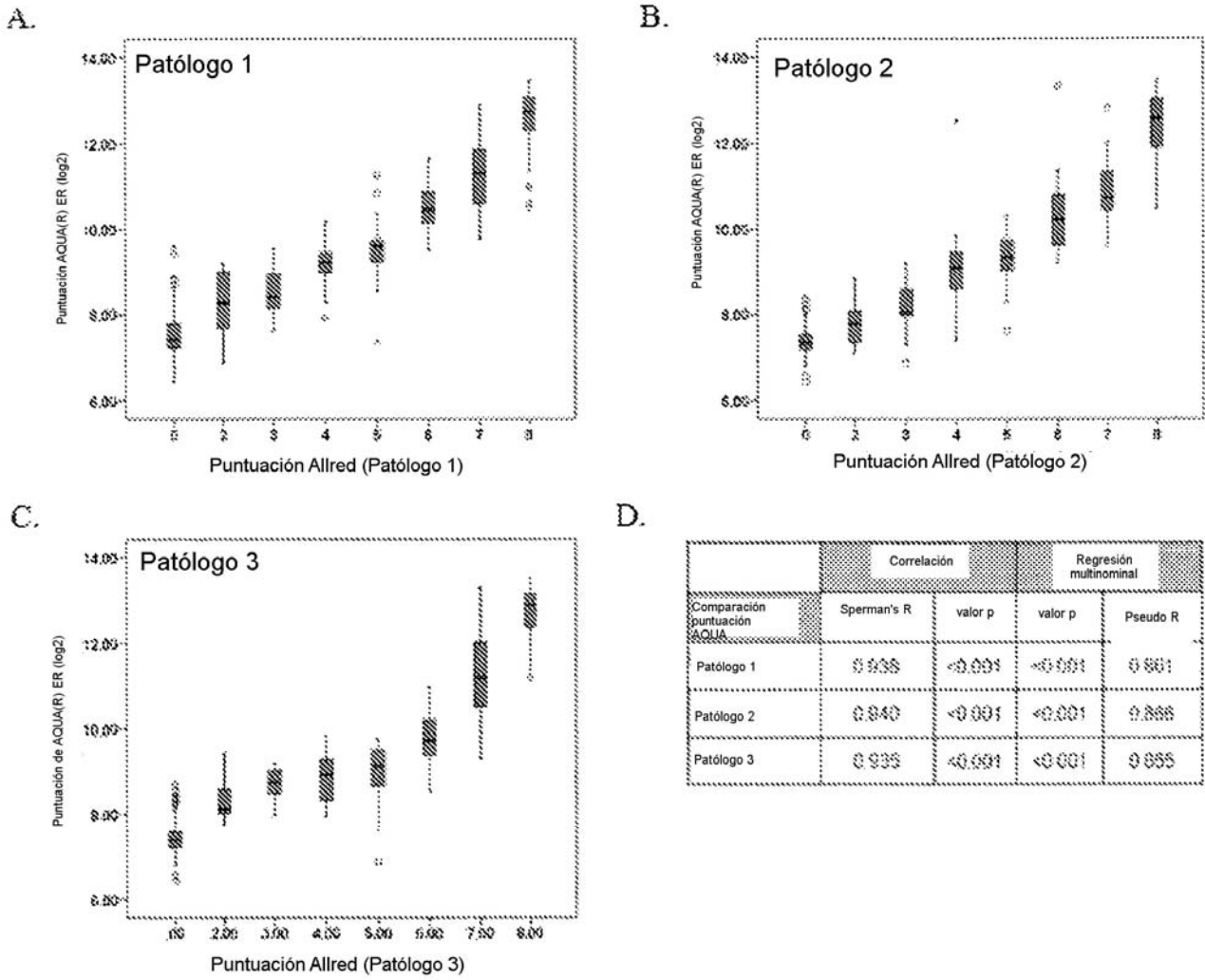


FIG. 9

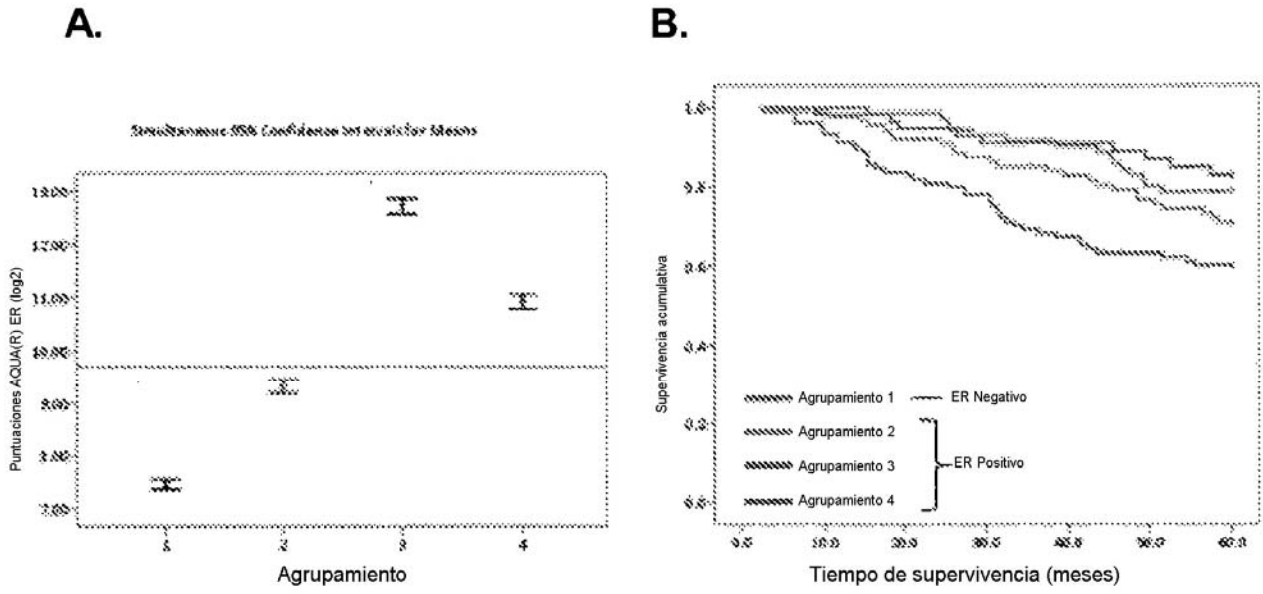


FIG. 10

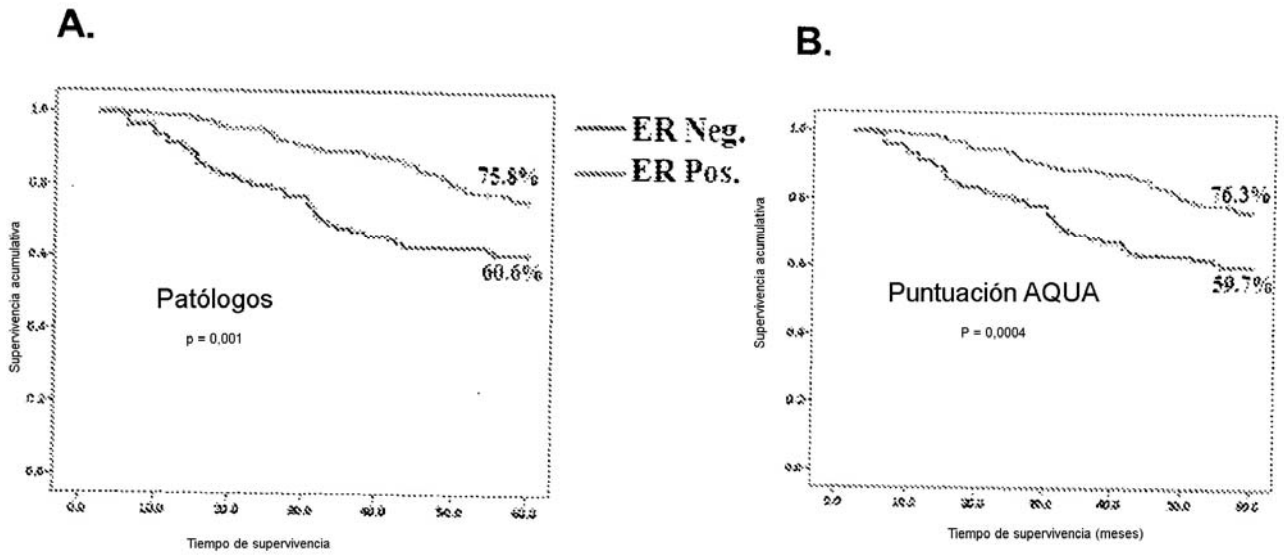
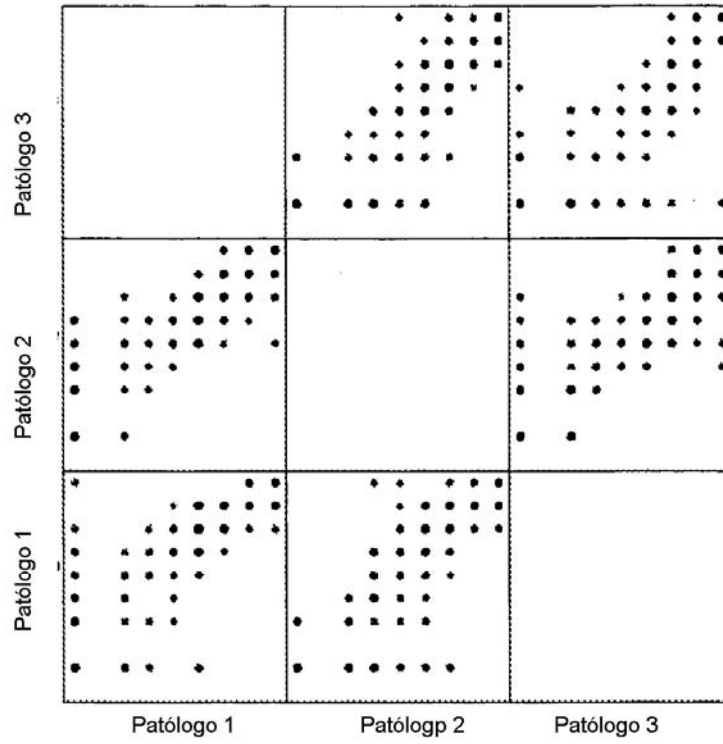


FIG. 11

A



B.

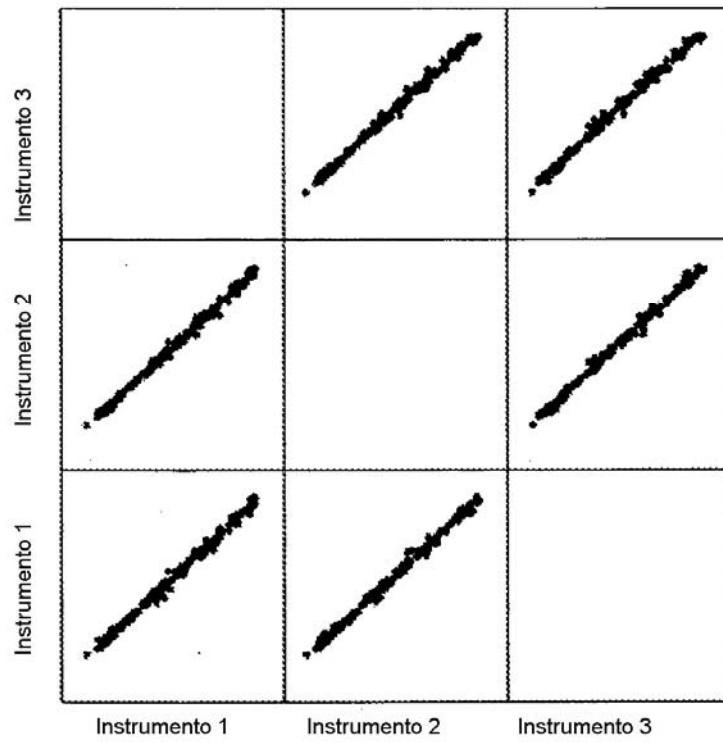


FIG.12