

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 507**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2012 PCT/EP2012/058356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12152747**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2012 E 12725639 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2707505**

54 Título: **Obtención de imágenes espectrales para la medición de características patológicas nucleares en células de cáncer preparadas para el análisis in situ**

30 Prioridad:

09.05.2011 US 201161483928 P

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

14.11.2016

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (50.0%)
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US y
CORNELL UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEMICHELIS, FRANCESCA;
GARSHA, KARL;
MILLER, PHILLIP C;
NAGLE, RAY B;
OTTER, MICHAEL;
PESTANO, GARY ANTHONY y
RUBIN, MARK A.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 589 507 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

Obtención de imágenes espectrales para la medición de características patológicas nucleares en células de cáncer preparadas para el análisis *in situ*

5

Campo de la invención

En general, la tecnología dada a conocer se refiere a la identificación de subtipos de cáncer. Más concretamente, la tecnología dada a conocer se refiere a métodos para determinar reguladores moleculares del cáncer y/o progresión utilizando datos multivariantes de imágenes y el análisis estadístico de marcadores moleculares *in situ* y características morfológicas en las mismas células de una muestra de tejido de un cáncer. Este análisis tiene lugar tras una única adquisición que obtiene los datos morfológicos moleculares y anatómicos en paralelo. El análisis compara marcadores morfológicos y moleculares específicos con muestras conocidas que muestran reguladores genéticos particulares del cáncer. Este método proporciona información estadística que proporciona una mayor fiabilidad para la identificación de los reguladores moleculares específicos del cáncer.

15

Antecedentes de la invención

Se utilizan los ensayos pronósticos patológicos para proporcionar información para ayudar a guiar y desarrollar regímenes de tratamiento y predecir resultados para una multitud de tipos de cáncer. La detección precoz y la determinación precisa de la base molecular de un cáncer es una característica clave en el tratamiento de los pacientes de cáncer. Para muchos cánceres lo anterior requiere múltiples preparaciones separadas de muestras de tejido del paciente para determinar diferentes factores morfológicos y moleculares.

20

Típicamente, se examinan patológicamente muestras de cáncer mediante la fijación de las células sobre portaobjetos de microscopía y se tiñen utilizando una diversidad de métodos de tinción (por ejemplo tinciones morfológicas o citogenéticas). A continuación se evalúan los especímenes teñidos para la presencia o la ausencia de células anormales o cancerosas y las morfologías celulares. Aunque proporcionan sólo información general, los métodos de tinción histológica son los métodos más comunes actualmente puestos en práctica para la detección de las células cancerosas en las muestras biológicas. Entre otros métodos de tinción utilizados frecuentemente para la detección del cáncer se incluyen la inmunohistoquímica y las tinciones de actividad. Estos métodos se basan en la presencia o ausencia de antígenos específicos o actividad enzimáticas en las células cancerosas. Otros métodos de detección de células cancerosas utilizan la presencia de aberraciones cromosómicas en las células de cáncer. En particular, la delección o multiplicación de copias de cromosomas completos o segmentos cromosómicos y niveles más altos de amplificación de regiones específicas del genoma son incidencias comunes en el cáncer. Las aberraciones cromosómicas con frecuencia se detectan utilizando métodos citogenéticos tales como los cromosomas teñidos con Giemsa (bandeo G) o la hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

25

30

35

Típicamente, las muestras biológicas teñidas mediante cualquiera de los métodos anteriormente indicados son evaluadas manualmente por un técnico de laboratorio o un patólogo. Los portaobjetos de microscopía son visionados bajo una magnificación baja para localizar las áreas candidatas y dichas áreas se ven bajo magnificación más elevada para evaluar la presencia de células cancerosas. Además, los métodos actuales habitualmente requieren un único método de tinción en cada ocasión y en el caso de que se lleve a cabo más de un método de tinción, habitualmente no se realiza en exactamente las mismas células. Lo anterior se añade a la probabilidad de resultados falsos negativos asociados a los métodos de tinción citológicos o a los resultados falsos positivos asociados a métodos de tinción inmunogénicos o basados en la actividad. La incapacidad de asociar directamente medidas objetivas de morfología a reorganizaciones genéticas particulares al utilizar portaobjetos separados presenta una utilidad limitada a la combinación de dichas mediciones de una manera significativa.

40

45

En el hombre, el cáncer de próstata es la forma más prevalente de cáncer de todas las razas. Mientras que cada año se diagnostican más de 300.000 hombres con cáncer de próstata sólo en los Estados Unidos, los ensayos actualmente disponibles resultan notoriamente inexactos y subjetivos. En consecuencia, muchas incidencias de cáncer de próstata no resultan diagnosticadas hasta que la enfermedad ha progresado a estadios tardíos, incluyendo metástasis. Tanto la incidencia del cáncer de próstata como su mortalidad asociada han ido incrementándose durante los últimos diez años. La enfermedad clínicamente evidente representa sólo la punta del iceberg, en el sentido de que prácticamente el 30 por ciento de todos los hombres de más de 50 años alojan una forma microscópica silenciosa de cáncer de próstata latente. Los métodos de detección precoz actualmente utilizados están incrementando la identificación de esta forma latente de cáncer, que ahora representa más de 11 millones de casos en la población masculina de los Estados Unidos. Los estudios de tasa de crecimiento indican que estos tumores aparentemente crecen muy lentamente y que la gran mayoría seguramente permanecerán en estado clínicamente silencioso. Se estima que aproximadamente 50% a 65% de los cánceres de próstata son localizados, 9% a 17% se ha extendido a un área próxima a la próstata y 20% a 25% ha metastazado a otras partes del cuerpo.

55

60

El cribado para el cáncer de próstata se realiza principalmente mediante AEP (un análisis de sangre para el Antígeno Específico de la Próstata) y las pruebas de ERD (examen rectal digital). La confirmación del cáncer se lleva a cabo

65

mediante examen de muestras de tejido derivadas de biopsias con aguja. Estos métodos no pueden diferenciar entre enfermedad benigna y cáncer. La no diferenciación puede resultar, por ejemplo, en la exposición de los pacientes con enfermedad benigna a tratamientos que resultan innecesarios y presentan efectos secundarios (por ejemplo impotencia e incontinencia). Actualmente los factores que deben considerarse en la evaluación de la progresión del cáncer son estimaciones. Puede utilizarse el volumen tumoral, la gradación histológica pre- y post-operatoria del cáncer y la neoplasia intraepitelial de grado elevado, la estadificación tumoral clínica y patológica y la AEP sérica para predecir la agresividad biológica del cáncer de próstata. Desafortunadamente estas técnicas generalmente presenta sólo un valor predictivo marginal. Además, se estima que los ensayos de AEP omite 20% a 30% de todos los individuos con cáncer. De acuerdo con lo anterior, existe una clara necesidad de diagnósticos de mejor sensibilidad y especificidad.

Está bien aceptado que la transformación epigenética y genética de una célula prostática normal en una célula de cáncer con progresión a un fenotipo metastático requiere múltiples etapas. El desarrollo de métodos para identificar estos cambios con el fin de seleccionar mejor las terapias y de predecir la agresividad del tumor ha sido el objetivo de mucho trabajo en el cáncer de próstata. A pesar de los progresos realizados en la evaluación de la progresión del cáncer de próstata, resulta evidente que se requieren mejoras en la exactitud de dichas determinaciones.

De esta manera, existe una necesidad ampliamente reconocida, y resultaría altamente ventajoso disponer de, un método de análisis del cáncer y las morfologías asociadas al cáncer que puedan analizar múltiples variables en células individuales de una muestra biológica en una única adquisición, proporcionando un nivel de fiabilidad más elevado para la identificación de mecanismos específicos que regulen el pronóstico del cáncer y que proporcionen más información al profesional sanitario en el diseño y selección de los protocolos de tratamiento.

La patente US nº 6.025.128 se refiere a la predicción de la progresión del cáncer de próstata (reivindicación 1) mediante la realización de análisis multivariantes (reivindicaciones 7 y 8, columna 37, línea 38) de descriptores de la morfología nuclear (DMN, columna 37, línea 32), biomarcadores, varianza de la redondez nuclear (VRN, columna 37, línea 32).

El documento nº US 2010/317002 da a conocer un método de diagnóstico del cáncer mediante análisis multivariante que considera la delección genética (párrafo 146) y variables citológicas (displasia).

Breve descripción resumida de la invención

La tecnología actualmente dada a conocer proporciona métodos mejorados para una especificidad incrementada en el análisis de los mecanismos moleculares de un cáncer de tejido. De esta manera, en determinadas realizaciones, la tecnología se refiere a un método de diagnóstico de cáncer multivariante en el que dicho método determina la presencia de tanto marcadores moleculares como marcadores morfométricos fenotípicos al nivel celular en una célula individual o en una muestra individual que contiene una población de células de un tejido, comprendiendo dicho método:

- a. obtener datos de marcadores moleculares de una única muestra de un sujeto que comprende una única célula o población de células procedente de un tejido,
- b. obtener datos cuantitativos de la morfología celular de la misma célula individual o población de células tal como se utiliza en la etapa (a) para proporcionar un análisis multivariante de dicha muestra individual, comprendiendo el conjunto de datos multivariable tanto datos cuantitativos de la morfología celular de la etapa (b) como datos de marcadores moleculares de la etapa (a), y
- c. comparar los datos de análisis multivariante obtenidos en la etapa (b) con un conjunto de datos de análisis multivariante de referencia creado mediante la obtención de tanto datos de marcadores moleculares como datos cuantitativos de morfología celular de muestras celulares de cáncer y de no cáncer obtenidas de individuos con resultado clínico conocido.

Los resultados de la comparación de la etapa (c) proporcionan una predicción de un resultado clínico del sujeto definido por combinaciones específicas de características y marcadores asociados estadísticamente con la progresión, incidencia y metástasis del cáncer u otras características del resultado clínico observadas en el conjunto de datos de análisis multivariante de referencia.

En dichos métodos diagnósticos, el marcador molecular es un reorganización genética. Por ejemplo, dicha reorganización genética puede ser una reorganización del gen ETS, incluyendo el gen ERG.

En los métodos dados a conocer, las medidas morfológicas incluyen el tamaño, forma y contenido de ADN del núcleo.

Una aplicación preferente del método diagnóstico es en una célula de cáncer que es una célula de cáncer de próstata.

La tecnología contempla además un método de identificación de reorganizaciones genéticas específicas o patrones de marcadores moleculares en una muestra de ensayo que contiene una única célula o una población de células de un tejido canceroso que comprende:

- 5 a. obtener la relevancia estadística de características fenotípicas medibles y marcadores moleculares derivados mediante análisis de regresión de múltiples variables marcadores morfológicos y moleculares de una única muestra perteneciente a una población de células de cáncer de cohortes de resultados moleculares conocidos de cáncer para crear una biblioteca de referencia que muestra marcadores fenotípicos y moleculares asociados a un resultado clínico,
- 10 b. correlacionar fenotipos morfométricos específicos con reorganizaciones genéticas específicas o patrones de marcadores moleculares de dicha biblioteca,
- 10 c. realizar análisis moleculares *in situ* en una muestra de ensayo que contiene una única célula o una población de células de un tejido canceroso y simultánea o concurrentemente medir características morfométricas en la misma muestra de ensayo para determinar tanto la morfología como los marcadores moleculares de la muestra,
- 15 d. comparar los datos moleculares y morfométricos *in situ* agrupados que se han obtenido de la muestra de ensayo de la etapa (c) con la biblioteca en la etapa (b) e identificar reorganizaciones genéticas específicas o patrones de marcadores moleculares en dicha única célula o población de células de la muestra de ensayo de tejido canceroso.
- 15 El tejido canceroso puede ser un tejido sólido un tejido fluido, tal como un tejido hematológico. En los métodos dados a conocer en la presente memoria, las células de cáncer pueden ser células de cáncer que están asociadas a un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de leucemia, linfoma, cáncer de cerebro, cáncer cerebrospectral, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cervix, cáncer de útero, cáncer ovárico, cáncer de riñón, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer pancreático y melanoma.
- 20 En los métodos dados a conocer, el contraste morfológico puede derivarse de la utilización de una tinción fluorescente (por ejemplo DAPI y los puntos cuánticos), las propiedades ópticas del tejido (por ejemplo la iluminación de campo oscuro transmitida), marcadores de reflexión o de dispersión (por ejemplo el oro coloidal y la tinción de plata) o agentes de contraste absorbentes de la luz (por ejemplo la hematoxilina o el DAB).
- 25 El contraste de marcadores moleculares *in situ* utilizado en la presente memoria puede derivarse de la utilización de tinción fluorescente (por ejemplo DAPI o puntos cuánticos), de las propiedades ópticas del tejido (por ejemplo la iluminación de campo oscuro transmitida), de marcadores de reflexión o dispersión (por ejemplo el oro coloidal), o de los agentes de contraste absorbentes de la luz (por ejemplo la hematoxilina, el DAB, Fast Red, Fast Blue o la tinción de plata).
- 30 En otros aspectos, el marcador molecular *in situ* es una sonda inmunológica, una sonda de ADN, una sonda de ARN, lectina, un aptámero, un ligando de proteína o un cofactor enzimático.
- 35 En una realización específica, el ensayo multivariante se lleva a cabo en una célula de cáncer que es una célula de cáncer de próstata, en la que se utiliza el análisis molecular *in situ* para determinar la presencia de una reorganización génica ETS, incluyendo ERG, y la tinción morfológica es una tinción DAPI. Más concretamente, la reorganización ERG es una inserción en el gen ERG, o la delección de la región 5' de ERG, y el métrico morfológico es un redondez irregular de los núcleos.
- 40 La presente tecnología se refiere además a métodos de identificación precoz de células precancerosas o asociadas a cáncer que es probable que presenten una reorganización genética específica, que comprende:
- 45 a. obtener una biblioteca de marcadores moleculares *in situ* y mediciones morfométricas realizadas en una población de células a partir de cohortes precáncer de reorganizaciones genéticas conocidas que se asocian con un resultado de cáncer,
- 50 b. correlacionar los fenotipos morfométricos con una reorganización genética específica de dicha biblioteca para generar datos de biblioteca,
- 50 c. realización de un análisis molecular *in situ* en una muestra celular de ensayo que contiene una única célula o una población de células y medir características anatómicas de la misma muestra para determinar la morfología de la muestra celular de ensayo, y
- 50 d. comparar los datos moleculares y morfométricos *in situ* agrupados que se han obtenido de la muestra celular de ensayo de la etapa (c) con los datos de biblioteca en la etapa (b) y proporcionar una confianza estadística incrementada de identificación de la muestra celular de ensayo como muestra celular de cáncer o precáncer.
- 55 Las células precancerosas o asociadas a cáncer pueden estar asociadas a un célula seleccionado de entre el grupo que consiste de leucemia, linfoma, cáncer cerebral, cáncer cerebrospectral, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cervix, cáncer de útero, cáncer ovárico, cáncer de riñón, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer pancreático y melanoma.
- 60 En dichos métodos nuevamente el contraste morfológico puede derivarse de la utilización de una tinción fluorescente (por ejemplo DAPI o puntos cuánticos), de las propiedades ópticas del tejido (por ejemplo la iluminación de campo oscuro transmitida), de marcadores de reflexión o de dispersión (por ejemplo el oro coloidal o la tinción de plata) o de agentes de contraste absorbentes de la luz (por ejemplo la hematoxilina o el DAB) 14. El contraste de marcadores moleculares *in situ* puede derivarse de la utilización de una tinción fluorescente (por ejemplo DAPI o puntos cuánticos), de las propiedades ópticas del tejido (por ejemplo la iluminación de campo oscuro transmitida), de marcadores de
- 65

reflexión o dispersión (por ejemplo el oro coloidal) o de agentes de contraste absorbentes de la luz (por ejemplo la hematoxilina, el DAB, Fast Red, Fast Blue o la tinción de plata).

5 El marcador molecular in situ puede ser una sonda inmunológica, una sonda de ADN, una sonda de ARN, una lectina, un aptámero, un ligando de proteína o un cofactor enzimático.

10 En un método específico, la célula precancerosa o asociada a cáncer es una célula de la próstata, el análisis molecular in situ se utiliza para determinar la presencia de una reorganización ERG y la tinción morfológica es una tinción DAPI. Más particularmente, la reorganización ERG es una inserción en el gen ERG o la delección de la región 5' del gen ERG, y el métrico morfológico es un redondez irregular de los núcleos celulares.

15 En otra realización, la célula precancerosa o asociada a cáncer es una célula de cáncer de próstata, se utiliza el análisis FISH para determinar la presencia de una reorganización de ERG y la tinción morfológica es una tinción DAPI. La reorganización de ERG puede ser una inserción en el gen ERG, o la delección de la región 5' del gen ERG, y dicho cambio morfométrico es un redondez irregular de los núcleos celulares.

Se describe además un método de identificación de la presencia de un marcador molecular predictivo de un resultado clínico en un sujeto de cáncer, presentando las etapas siguientes:

- 20 a. preparar una biblioteca de referencia de reorganizaciones genéticas asociadas a un resultado de cáncer específico de muestras obtenidas de una pluralidad de sujetos que presentan un cáncer conocido y un resultado clínico asociado a dicho cáncer,
- 25 b. preparar una biblioteca de referencia de cambios morfológicos asociados a un resultado de cáncer específico de muestras obtenidas de una pluralidad de sujetos que presentan un cáncer conocido y un resultado clínico asociado a dicho cáncer,
- 30 c. combinar la biblioteca de reorganizaciones genéticas con la biblioteca morfológica para obtener una biblioteca en la que los cambios morfológicos en las células de cáncer se correlacionan o de asocian de otro modo a reorganizaciones genéticas específicas en tipos individuales de cáncer y resultados clínicos,
- 35 d. obtener datos cuantitativos de morfología celular a partir de una muestra de ensayo que contiene una única célula o una población de células obtenida de un sujeto de ensayo que se sospecha que presenta cáncer,
- e. comparar los datos cuantitativos de morfología celular obtenidos del sujeto de ensayo con la reorganización genética y biblioteca morfológica agrupadas de la etapa c) con el fin de identificar la reorganización genética específica presente en el sujeto de ensayo. Más concretamente, el método puede caracterizada en que la presencia de una combinación de características morfológicas y reorganizaciones genéticas proporciona la identificación de un resultado clínico específico en el sujeto.

En dicho método, el método puede comprender además la confirmación de la presencia de la reorganización genética mediante la detección in situ de un marcador molecular.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

- 40 Figura 1: ilustra el método de la presente tecnología en el que se adquieren los datos en bruto mediante obtención de imágenes espectrales cuantitativas se descompone basándose en la distribución de la señal de longitudes de onda de la tinción nuclear y la detección de la sonda.
- 45 Figura 2: ilustra una vista ejemplar de un campo.
- Figura 3: ilustra un gráfico de dispersión del área media representada frente al coeficiente de la varianza (CV) expresada como porcentaje del valor de la media.
- 50 Figura 4: ilustra un gráfico de dispersión de la redondez media representado frente al coeficiente de la varianza (CV) expresado como porcentaje del valor de redondez media.
- Figura 5: ilustra un gráfico de dispersión del área media (abscisa) representado frente al valor de redondez media (ordenada).
- 55 Figura 6: ilustra un gráfico de dispersión del área media (abscisa) representado frente al área de CV (ordenadas). Los cores de cáncer negativos para reorganización de ERG se representan en azul (rombos), los cores positivos sólo para traslocación de ERG se representan en magenta (cuadrados) y los cores positivos para traslocación de ERG + delección son verdes (triángulos).
- 60 Figura 7: ilustra un gráfico de dispersión dla redondez media (abscisa) representado frente al redondez CV (ordenada). Los cores de cáncer negativos para reorganización de ERG se representan en azul (rombos), los cores positivos solo para traslocación de ERG se representan en magenta (cuadrados) y los cores positivos para translocación de ERG + delección se representan en verde (triángulos).
- 65

Figura 8: ilustra un gráfico de dispersión del área media (abscisa) representado frente al redondez media (ordenada). Los cores de cáncer negativos para reorganización de ERG se representan en azul (rombos), los cores positivos sólo para la traslocación de ERG se representan en magenta (cuadrados) y los cores positivos para traslocación de ERG + delección se representan en verde (triángulos).

Figura 9: ilustra un gráfico de la frecuencia de núcleos de cáncer con una intensidad integrada total (DAPI) dada obtenida de 1 campo por cada core.

Figura 10: ilustra un gráfico de la significancia estadística y el análisis de regresión para el tamaño nuclear y la puntuación de Gleason.

Figura 11: ilustra un gráfico de la significancia estadística y el análisis de regresión para la forma nuclear (redondez) y las reorganizaciones de ERG.

Descripción detallada de la invención

La presente tecnología proporciona un análisis cuantitativo de imágenes de muestras biológicas utilizando una nueva adquisición única de información multivariante de datos moleculares y morfológicos de células de cáncer individuales analizadas en combinación para proporcionar una especificidad y sensibilidad mejoradas con el fin de determinar los mecanismos subyacentes que controlan un cáncer. Preferentemente, las células proceden de una muestra de tejido. Estos nuevos datos de tejido multivariantes pueden ayudar a estratificar el riesgo y ayudar en las decisiones de tratamiento en casos que de otra manera resultarían difíciles de clasificar basándose en la gradación convencional de patologías con biopsias teñidas con H y E únicamente.

La presente tecnología proporciona información para determinar los estados de pronóstico patológico del cáncer mediante de marcaje fluorescente de marcadores moleculares conjuntamente con enfoques especializados de obtención de imágenes que implican la detección con resolución espectral y el preprocesamiento de los datos. La presente tecnología proporciona un enfoque de obtención de imágenes que puede adquirir y analizar la morfología nuclear en tejido que ha sido preparado para la detección de sondas específicas de molécula en el tejido en un único ciclo de adquisición de datos. Este enfoque de obtención de imágenes utiliza una combinación de tecnologías de marcaje, adquisición, preprocesamiento y análisis. Se capta una imagen multidimensional y se analiza para separar y distinguir diferentes canales de analito de interés según la longitud de onda de emisión. Los canales de analito posteriores representan diferentes aspectos de los datos que cuantifican la morfología y la reorganización genética, la expresión genética y/o la expresión de proteínas de la célula.

En una realización, de la presente tecnología, la recolección de datos y el análisis de la combinación de información morfológica y de reorganizaciones genéticas de células de cáncer individuales se analiza para proporcionar un nivel de confianza más alto de la identificación de los controladores subyacentes del cáncer basados en el estudio patológico de lo que puede conseguirse mediante cualquier parte separada de la información considerada por sí sola. Los datos recogidos se comparan con características de poblaciones celulares analizadas previamente a fin de proporcionar una referencia para el tipo de cáncer específico con el fin de determinar los mecanismos contributivos al subtipo de cáncer. En la presente tecnología, la distribución de marcadores y características de la población de referencia pueden crearse mediante correlación o asociación de otro modo de los datos de la información morfológica y molecular in situ obtenida mediante el método de la presente tecnología en muestras que presentan un genotipo de cáncer y resultado conocidos. De esta manera, las identidades de subtipo de cáncer y la probabilidad asociada de resultado para un tipo específico de cáncer se obtiene con intervalos de confianza estadística a partir de los datos morfológicos medidos y datos específicos de reorganización genética molecular. Los datos obtenidos de una muestra de cáncer desconocida seguidamente pueden compararse con datos de los subtipos moleculares conocidos de la biblioteca de tejidos de cáncer para proporcionar una identificación mejorada de subtipos moleculares y la predicción de resultados para la muestra de cáncer desconocida.

Se encuentra contemplado que la presente tecnología pueda utilizarse para el pronóstico de diferentes tipos de cáncer, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de cerebro, cáncer cerebroespinal, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cérvix, cáncer de útero, cáncer ovárico, cáncer de riñón, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de colon, melanoma, neuroblastoma y cáncer pancreático. En una realización preferente de la presente tecnología, los métodos se utilizan para proporcionar una identificación mejorada del subtipo molecular de cáncer de próstata.

Entre las características morfológicas de la célula de cáncer de la presente tecnología se incluyen la medición y el análisis estadístico de una diversidad de características nucleares, incluyendo el tamaño, la morfología, la distribución de la cromatina intranuclear ("textura de la cromatina"), la variabilidad internuclear de cantidad de marcaje de la cromatina (contenido de ADN o de cromatina), la presencia de macronucleolos y los patrones globales de crecimiento de los tejidos según pone de manifiesto la distribución nuclear. Se obtienen imágenes de las características morfológicas nucleares utilizando una técnica de tinción del ADN fluorescente, por ejemplo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, una tinción fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en A-T del ADN).

Entre los ejemplos de otras tinciones fluorescentes del ADN se incluyen el yoduro de propidio (YP) y el bromuro de etidio, que pueden visionarse bajo un microscopio de fluorescencia utilizando una modalidad de iluminación fluorescente. Las tinciones morfológicas absorbentes de la luz, tales como una tinción May-Grunwald-Giemsa, una tinción Giemsa, una tinción Papanicolau o una tinción de hematoxilina-eosina también pueden visualizarse mediante microscopía óptica. Las propiedades ópticas constitutivas del tejido preparado, tal como el índice de refracción, también pueden aprovecharse para mejorar y/o identificar la forma del límite nuclear.

La reorganización genética de acuerdo con la presente tecnología puede medirse mediante hibridación in situ. La hibridación in situ es un método útil para detectar aberraciones cromosómicas mayores y/o menores. En dicho método, las sondas de ácidos nucleicos marcadas se desnaturalizan y se aplican sobre células fijadas y desnaturalizadas. Las células en los estadios de metafase o interfase del ciclo celular permiten que las sondas se hibridan con secuencias específicas en el genoma de las células. Entre los ejemplos de hibridación in situ se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la hibridación in situ fluorescente (FISH), la hibridación in situ cromogénica (CISH), la hibridación in situ marcada radioactivamente, la hibridación in situ marcada con digoxigenina y la hibridación in situ biotinilada. Se conocen de la técnica numerosas técnicas de marcaje de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un pigmento fluorescente puede unirse covalentemente al extremo 5' o 3' de una sonda de ácidos nucleicos. Tras la hibridación, la sonda marcada puede visualizarse directamente utilizando un microscopio fluorescente y la modalidad de campo oscuro. Puede llevarse a cabo una FISH utilizando métodos manuales y automatizados que son conocidos por el experto en la materia. En una realización particular del pronóstico del cáncer de próstata, los ácidos nucleicos marcados para detectar las reorganizaciones de ERG pueden utilizarse en la FISH.

En la presente memoria, la expresión "mecanismo molecular" se refiere a la caracterización de las células de cáncer basada en varios parámetros que se utilizan para determinar los cambios moleculares subyacentes del cáncer y las opciones terapéuticas relevantes. La naturaleza multifactorial del cambio fenotípico y el muestreo de los tejidos proporciona un nivel de confianza, en el que la presente tecnología proporciona un nivel más alto de confianza en la identificación de los mecanismos moleculares subyacentes de un cáncer utilizando los métodos descritos de manera general en la presente memoria que cualquier método utilizado por sí solo.

En una realización preferente, la presente tecnología proporciona un método para determinar adicionalmente los cambios moleculares subyacentes de una muestra de cáncer de próstata mediante la realización de una única recolección de datos de imágenes multivariante y el análisis de células de cáncer de próstata individuales de la muestra. Este análisis multivariante incluye la realización de la tinción FISH para detectar la reorganización de ERG y también el análisis morfológico con la tinción DAPI de la misma célula. Los resultados del análisis tanto de reorganización de ERG como morfológico se recogen de una única adquisición de imagen de las células de la muestra de tejido de cáncer de próstata y se analizan mediante comparación de los resultados de cada célula en la población de células específicas de cáncer muestreadas en la imagen con los resultados que han sido recogidos y compilados en la biblioteca de poblaciones de células de cáncer de referencia con cambios moleculares conocidos y los cambios morfológicos medibles correspondientes. La biblioteca de células de cáncer de próstata está compuesta de datos recogidos de las muestras de tejido de cáncer de próstata con reorganizaciones genéticas conocidas. Esta realización y el desarrollo de la biblioteca celular de cáncer de próstata se describe en mayor detalle en los ejemplos, tal como se detalla posteriormente.

Tal como se indica en los ejemplos, se consiguieron tanto datos morfométricos y fotométricos de alta calidad que representan la morfología nuclear básica como el contenido relativo de cromatina nuclear revelado por la tinción DAPI de secciones de tejido preparadas para la hibridación in situ fluorescente (FISH). Se utilizó el análisis FISH para determinar la reorganización de un gen particular (ERG) que participa en sucesos tempranos que controlan el cáncer de próstata, y estos datos conjuntamente con el tamaño nuclear, la forma nuclear y el contenido relativo de cromatina de núcleos medidos en combinación pueden utilizarse para comparar con una biblioteca de estado de ERG de cáncer de próstata conocido y grado morfológico.

Por ejemplo, se creó una biblioteca específica de la reorganización por inserción de ERG en célula de cáncer de próstata mediante la recolección de características básicas de tamaño nuclear (área), forma nuclear (redondez) y cantidad de tinción contenida en el núcleo (intensidad integrada) de núcleos de cáncer seleccionados de entre 150 cores de tejido diferentes que representan una cohorte retrospectiva en un tejido. Además de las mediciones básicas, el coeficiente de la varianza (CV) se calculó para las características de tamaño y forma para cada core, permitiendo una comparación más sencilla de la relación entre variabilidad del tamaño nuclear en un core y la variabilidad de la forma nuclear en los mismos cores. El CV también permite investigar la relación entre el tamaño y forma nucleares medios y la correlación con la dispersión de dichos valores en un core. De media, se muestrearon 4 campos de visión para cubrir cada core de tejido y cada core de tejido representa un foco de cáncer individual. Se midieron y evaluaron varios miles de núcleos que representaban diferentes estadios de grado patológico con el fin de producir dichos datos de biblioteca. Pueden analizarse bibliotecas específicas de otros cánceres de una manera similar tal como se indica para el cáncer de próstata en la presente memoria.

La presente tecnología utiliza una implementación estandarizada de la obtención de imágenes espectrales

5 fluorescentes para la adquisición de imágenes destinadas a la medición de patología nuclear y sondas moleculares in situ. Las imágenes fluorescentes proporcionan ventajas significativas respecto a las imágenes de campo brillante en términos de linealidad, contraste y rango dinámico. Este enfoque de obtención de imágenes nucleares está diseñado para producir datos de imágenes estandarizadas de muy alta calidad bajo condiciones de no inmersión (preferentemente a una magnificación de 32x, aunque pueden obtenerse imágenes secas de alta resolución a una diversidad de magnificaciones ópticas). Resolución espacial, rango dinámico y señal: el ruido generado en los datos en bruto está altamente controlado mediante la utilización de un tren óptico, tecnología de sensores y de iluminación bien caracterizados. Los factores que presentan un impacto sobre los datos (nivel de iluminación, magnificación, apertura numérica, tamaño de los píxeles de los sensores, exposición de la cámara, etc.) se hacen corresponder y se estandarizan cuidadosamente para maximizar el rendimiento para los requisitos de la aplicación. Debido a que se cualifican y se calibran los parámetros de ruido del sistema, puede garantizarse la significancia estadística de los niveles de brillantez. Los límites de resolución espacial en los planos X, Y y Z se entienden bien y se optimizan para producir datos de alta calidad.

15 En algunas realizaciones, puede combinarse un grado anatómico Gleason y otras variables clínicas importantes con dichos datos de morfología nuclear y correlacionarse con el resultado del paciente en un análisis posterior con el fin de revelar los factores predictivos más significativos.

20 El grado Gleason es un patrón de puntuación para el cáncer de próstata que es conocido de la técnica. Brevemente, el patólogo asigna un grado al patrón tumoral más común y un segundo grado al segundo patrón tumoral más común. Los dos grados se unen para generar una puntuación de Gleason. El grado Gleason también se conoce como patrón Gleason y la puntuación de Gleason también se conoce como suma de Gleason. El grado Gleason o el patrón Gleason se encuentra comprendido entre 1 y 5, siendo 5 el peor pronóstico.

25 La presente tecnología proporciona una nueva aplicación de tecnologías de obtención de imágenes para cuantificar múltiples variables de secciones de tejido preparadas para la fluorescencia in situ multianalito. Entre los múltiples puntos de datos se incluyen la reorganización de un gen particular (tal como ERG) que participan en sucesos tempranos que controlan el cáncer de próstata, el tamaño nuclear, la forma nuclear y el contenido relativo de cromatina de núcleos medidos en una única imagen adquirida.

30 La presente tecnología utiliza equipos y procesamiento para la obtención de imágenes espectrales cuantitativas cuidadosamente optimizadas para proporcionar información morfológica de alta calidad que puede medirse objetivamente en el software. Los equipos y software de obtención de imágenes adecuados se describen en los ejemplos, posteriormente. Se interroga el tamaño nuclear (área) y la forma nuclear (redondez) a partir de una micromatriz de tejidos (MMT) bien caracterizada. La presente tecnología demuestra que los valores elevados de tamaño nuclear se correlacionan con una probabilidad más alta de pertenecer a un cáncer de grado morfológico Gleason más alto en el cáncer de próstata.

40 La presente tecnología proporciona una nueva capacidad de medir objetivamente la morfología y correlacionar la morfología con la reorganización molecular en la misma sección de tejido, proporcionando una sensibilidad y especificidad mejoradas en la determinación de la condición de inserción, tal como demuestra la asociación estadísticamente relevante de la reorganización por inserción de ERG y la mayor irregularidad de la forma nuclear (menor redondez), tal como se demuestra en los ejemplos, posteriormente.

45 En enfoque de obtención de imágenes espectrales cuantitativas y análisis morfométrico nuclear de la presente tecnología proporciona información cuantitativa sobre la intensidad integrada relativa para características segmentadas. Esta información puede utilizarse de una manera única, por ejemplo para medir el contenido relativo de cromatina en tejido fijado en formalina e incluido en parafina preparado mediante procedimientos de FISH automatizado. Se encuentra contemplado que dicho enfoque se utilice adicionalmente para determinar las células en división rápida o las condiciones de ploidía anómala en muestras preparadas para el análisis multiplexado de analitos.

50 El experto en la materia reconocerá que pueden realizarse modificaciones en la presente tecnología sin apartarse del espíritu o alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, los cuales no deben interpretarse como limitativos de la invención en espíritu o alcance a los procedimientos o composiciones específicos indicados en la misma.

Ejemplos

60 Valor correlativo con la morfología nuclear y la reorganización de ERG para las células de cáncer de próstata

Las tecnologías cuantitativas se han hecho avanzar y se han aplicado en el presente estudio para permitir la extracción de datos morfométricos de tejido preparado para el análisis molecular *in situ* fluorescente de sondas multiplexadas. Se utiliza un enfoque de obtención de imágenes espectrales altamente caracterizado para producir datos de alta resolución (resolución de longitudes de onda, resolución espacial y resolución de intensidad) (figura 1). La figura 1 ilustra las etapas de la presente tecnología en la que los datos en bruto adquiridos mediante obtención de imágenes

espectrales cuantitativas se descomponen basándose en la distribución de las señales de longitud de onda de la tinción nuclear y la detección de sondas. Lo anterior produce una imagen cuantificable que representa la distribución relativa real del marcaje sobre la sección de tejido. La proporción de señal a ruido de dichas imágenes es muy elevada, en parte debido a la capacidad de separar la señal real de señales contaminantes constitutivas del tejido.

5 Dichos datos se procesan posteriormente para proporcionar mediciones de características nucleares en secciones de tejido de cáncer de próstata. Los datos producidos mediante la utilización de imágenes espectrales se descomponen basándose en la distribución de las señales de longitud de onda de la tinción nuclear y la detección de sondas; lo anterior produce una imagen cuantificable que representa la distribución relativa verdadera del marcaje sobre la
10 sección de tejido. La proporción de señal a ruido de dichas imágenes es muy elevada, en parte debido a la capacidad de separar la señal verdadera de las señales contaminantes constitutivas del tejido.

La morfología nuclear y el contenido relativo de cromatina nuclear se evaluaron mediante tinción DAPI de secciones de
15 tejido preparadas para la hibridación in situ fluorescente (FISH). Las características básicas de tamaño nuclear (área), forma nuclear (redondez) y cantidad de tinción contenida en el núcleo (intensidad integrada) se extrajeron de los núcleos de cáncer seleccionados de entre 150 cores de tejido diferentes que representaban una cohorte retrospectiva en una matriz de tejidos (CTMA 17.1). Además de las mediciones básicas, se calculó el coeficiente de la varianza (CV) para las características de tamaño y forma para cada core, permitiendo una comparación más sencilla de la relación entre la variabilidad del tamaño nuclear en el core y la variabilidad de la forma nuclear en los mismos cores; el CV
20 también permitió investigar la relación entre el tamaño y forma nucleares medios y la correlación con la dispersión de dichos valores dentro de un core. De promedio, se muestrearon 4 campos de visión para cubrir cada core de tejido, y cada core de tejido representaba un foco de cáncer individual. Se midieron varios miles de núcleos que representaban diferentes estadios de grado patológico para producir dichos datos.

25 Las muestras se prepararon de manera automatizada que había sido optimizada para el interrogatorio molecular multiplexado con tecnología de detección de puntos cuánticos y contratinción nuclear DAPI. Los datos espectrales se obtuvieron de CTMA 17.1 utilizando un microscopio Zeiss Axiolmager.M2 (Zeiss MicroImaging, Thornwood, NY) configurado con un objetivo 20X N.A 0.85 plan con corrección apocromática en serie con un lente de tubo de 1,6X con corrección apocromática que genera una magnificación total de 32X con una profundidad de campo de 1,8
30 micrómetros. Esta magnificación total se había determinado previamente que producía datos de imagen limitados por la difracción óptica (resolución de la imagen de ~0,4 micrómetros) convolucionada con las dimensiones de pixel de 6,5 micrómetros del sensor de imágenes CCD incorporado en el sistema. Se utilizó un filtro de interferencia de paso largo con corte de 409 nm (Omega, Brattleboro, VT) para separar la señal visible de la excitación de fluorescencia. Para la excitación DAPI se utilizó una fuente de luz de UV próximo estabilizada con bucle cerrado (Exfo (ahora Lumen
35 Dynamics) Exacte, Ontario, CA), calibrada para proporcionar una fluencia integrada de 110 mW (370 nm \pm 20 nm) en el plano de muestra a través del objetivo de 20X. Para permitir un registro de la estructura del tejido extranuclear e información contextual, se utilizó una luz transmitida filtrada a 710 nm \pm 10 nm y calibrada a una fluencia integrada de 1,27 mw en el plano de muestra, para capturar datos contextuales en la misma adquisición espectral.

40 Dicha estrategia de obtención de imágenes utiliza una fuente de luz estabilizada capaz de repetir la iluminación en el plano de muestra con menos de 1% de variación en el nivel absoluto de iluminación; el nivel de iluminación también puede ajustarse de manera lineal en incrementos de 1%. Más comúnmente, el rango de iluminación para la detección de puntos cuánticos se restringe al rango del UV próximo. La combinación de una fuente de luz cuantitativa calibrada (haluro de metal de bucle cerrado) y un sistema de detección cuantitativa calibrado (detección espectral basada en
45 CCD) garantiza que la variabilidad de los niveles de brillantez pueda trazarse al origen en la muestra y reflejar la distribución real de la tinción. Pueden medirse las variaciones relativas de la tinción con elevada repetibilidad. De esta manera, ahora resulta posible analizar la variabilidad en las intensidades de tinción nuclear y de la cromatina entre núcleos y extraer conclusiones que pueden resultar útiles para determinar el contenido relativo de cromatina en los
50 núcleos.

Se adquirieron datos espectrales utilizando un interferómetro Sagnac en una configuración de espectrómetro de imágenes (Malik Z. et al., J. Microsc. 182:133-140, 1996); se configuraron los parámetros de adquisición del interferómetro para proporcionar una resolución espectral de 5 nm a 7 nm en el rango de longitudes de onda visibles (400 nm a 800 nm) en una serie de adquisición rápida de exposiciones. Los datos espectrales que contenían
55 intensidades de todas las longitudes de onda visibles en cada píxel se desconvolucionaron en canales específicos de longitud de onda que representaban la contribución DAPI pura y la contribución contextual (700 nm a 720 nm) a la señal total mediante descomposición lineal (Garini Y. et al., Cytometry Part A. 69A:735-747, 2006). Se llevó a cabo la descomposición lineal utilizando espectros de referencia normalizados para DAPI y los componentes de iluminación de IR próximo. Los espectros de referencia se adquirieron utilizando instrumentación idéntica bajo condiciones estandarizadas para cancelar la influencia de la respuesta dependiente de las longitudes de onda ópticas. Este enfoque permite proporciones de señal a ruido ideales de cada componente espectral. De esta manera, el contenido relativo de DAPI de los núcleos de cáncer individuales en un campo de visión puede medirse con exactitud conjuntamente con las características especiales; ello ayuda a controlar la posibilidad de núcleos parciales debido al
60 seccionado histológico y puede proporcionar información adicional.

65

De promedio, se requirieron cuatro campos de visión para cubrir cada core. Los campos se ajustaron interactivamente para maximizar la captura de los núcleos glandulares. Los cores dañados, los no cancerosos y los campos no informativos fueron excluidos de los análisis. Las intensidades máximas de imagen en un campo de visión se normalizaron para que se encontrasen comprendidas en 3/4 del límite superior del rango dinámico del sensor de imagen (16.000 e⁻ de capacidad de pozo) mediante el ajuste del tiempo de exposición.

Las imágenes que representan los componentes espectrales individuales se obtuvieron de software de adquisición espectral como datos monocromáticos de 16 bits. El software de análisis de imagen (Imagen Pro Analyzer 7.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD) se calibró espacialmente a la magnificación de adquisición de 32X para permitir la expresión de las mediciones en unidades micrométricas. Se aplicó un filtro de paso alto de Fourier a cada imagen como etapa de preprocesamiento con el fin de incrementar las transiciones de límite de los núcleos (Russ J.C., The Image Processing Handbook, New York: CRC Press LLC, 2002). Se determinaron los umbrales para las características nucleares en la imagen con el fin de separar los objetos en estrecha proximidad.

Los núcleos no glandulares, los núcleos no de cáncer y las estructuras irrelevantes se eliminaron manualmente de cada campo de visión, de manera que sólo se mantuviesen los núcleos glandulares cancerosos (figura 2). Este procedimiento de eliminación fue guiado por un patólogo principal. La figura 2 muestra un ejemplo de campo de visión. La imagen de la izquierda representa un ejemplo del campo de visión. La imagen de la izquierda representa la morfología del tejido en el campo adquirido tal como la proporciona los componentes espectrales contextuales nucleares y del tejido. La imagen de la derecha representa el componente DAPI y las características nucleares segmentadas tras deseleccionar manualmente los núcleos irrelevantes o pobremente segmentados.

De esta manera, se midieron objetivamente los parámetros de forma nuclear relevantes con el software, con guía médica experta para garantizar el mínimo ruido en los datos de células irrelevantes y estructuras extrañas. Tras deseleccionar los núcleos irrelevantes, se guardaron las siluetas nucleares en archivos separados y se exportaron las mediciones de área, redondez e intensidad integrada a Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA). El área se expresa en píxels, con 0,2 micrómetros/píxel. Se calculó la redondez utilizando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{perímetro}^2}{4 \pi \times \text{área}}$$

, en la que un círculo perfecto presentará un redondez de 1, y una desviación creciente respecto al redondez presentará un valor superior a 1. La intensidad integrada es la suma de todos los valores de píxel contenidos en un núcleo; cada píxel puede presentar un valor comprendido entre 0 y 65.536 (escala de 16 bits). La intensidad integrada es una medida indirecta del contenido de cromatina después del procesamiento del tejido; el contenido relativo de cromatina es fiablemente informado por la tinción intercalante DAPI (Coleman A.W. et al., J. Histochem. Cytochem. 29:959-968, 1981).

Los datos CTMA17-1 se guardaron en un directorio que contenía una única carpeta para cada core que se había analizado. Dentro de cada carpeta se encuentran los archivos de imagen contextual DAPI y anatómico del tejido (formato *.tif de 16-bits monocromo) para cada campo de visión de ese core particular. La carpeta contenía además los archivos de silueta guardados para cada imagen DAPI analizada (formato propietario de ImagePro). Además, se exportaron los datos numéricos a una hoja de cálculo de Microsoft Excel que contenía los datos de recuentos para ese corte al ser exportado desde Image Pro Analyzer 7.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

Se utilizó un archivo de Microsoft Excel en el directorio CTMA 17.1 principal para medir los datos de mediciones en bruto para el análisis posterior. La hoja de cálculo del archivo contenía todos los datos de cada core (cada core presentaba su propia hoja de cálculo marcada), así como una hoja de cálculo de resume que contenía valores medios y coeficientes de varianza para área y redondez para cada core, así como gráficos que mostraban sus relaciones mutuas. La carpeta principal contenía otra hoja de Microsoft Excel titulada "Datos de histograma", que contenía un histograma creado a partir de las intensidades de DAPI integradas y normalizadas. Para este histograma se utilizó un campo por cada core canceroso.

Se resumieron los resultados preliminares y después se sometieron a análisis estadístico y de regresión adicional. El objetivo del análisis estadístico para este estudio era evaluar cuantitativamente las características morfométricas y fotométricas de los núcleos de cáncer en el contexto de la progresión tumoral. Para ello, se analizaron las variables de tamaño nuclear (área), forma nuclear (redondez) y contenido relativo de cromatina (intensidad normalizada) frente a los puntos finales de grado Gleason, estado de reorganización de ERG y células tumorales vs. benignas.

Con el fin de evaluar la posibilidad de diferencias de distribución de la forma o tamaño nucleares o el contenido de cromatina con respecto al estado de reorganización de ERG, se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para someter a ensayo la hipótesis nula de que no existía ninguna diferencia entre tipos de reorganización (normal, reorganización mediante inserción, reorganización mediante delección) y su redondez, tamaño o contenido de cromatina. En las situaciones en las que se detectó una diferencia estadísticamente significativa en un grupo de reorganización, se llevó a cabo un análisis de regresión logística.

5 Con el fin de evaluar la posibilidad de diferencias de distribución de la forma o tamaño nucleares o el contenido de cromatina con respecto a un estado con puntuación de Gleason superior a 6 (en comparación con una puntuación de Gleason inferior a 6), se utilizó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon para someter a ensayo la hipótesis nula de que no existían diferencias entre Gleason >6 y Gleason ≤6 y la redondez, tamaño o contenido de cromatina. En situaciones en las que se detectaba una diferencia estadísticamente significativa entre grupos de Gleason, se llevó a cabo un análisis de regresión logística.

10 Se resumen posteriormente y en las figuras los resultados preliminares de tamaño y forma; antes del análisis estadístico se representaron los valores que representaban el tamaño y la forma para cores individuos con codificación de color para núcleos normales vs. núcleos de cáncer, y para el estado de reorganización de ERG en núcleos de cáncer (figura 3, figura 4 y figura 5). Cada punto de datos representa el valor de varios campos recogidos de un core micromatriz. Los cores de cáncer se representan en azul (rombos) y los cores normales, en magenta (cuadrados).

15 Se creó un histograma de contenido de DAPI integrado, normalizado respecto a la intensidad integrada de los núcleos más brillantes, con el fin de proporcionar una medida del contenido relativo de cromatina remanente en los núcleos con imágenes obtenidas de los tejidos seccionados y procesados (figura 9). Los valores se normalizaron para cada campo de visión de manera que los núcleos en el campo con la intensidad integrada más alta se les asignase un valor de 1. Los núcleos con la mitad de intensidad integrada se esperaría que presentasen un valor de 0,5. Se esperaría que los valores más frecuentes representasen los núcleos con 2 juegos de cromosomas (2N), tal como se esperaría para las células en interfase, y los valores más brillantes representarían los núcleos con más de 2 juegos de cromosomas, tal como se esperaría en la poliploidía o en células en división. Existe una distribución de valores de intensidad integrada consistente con dicho modelo; ello proporciona cierta evidencia para controlar la posibilidad de que los núcleos han sido seccionados en diferentes planos.

20 Los análisis estadísticos y de regresión adicionales de dichos datos preliminares revelan diferencias significativas de tamaño nuclear para las puntuaciones anatómicas de Gleason superiores a 6 (por ejemplo Gleason 3+4) (figura 10). Los resultados indican que los núcleos de mayor tamaño es más probable que estén asociados a un grado de Gleason superior a 6.

25 El análisis estadístico revela además diferencias significativas en el caso de núcleos de cáncer con ERG reorganizado en comparación con núcleos de cáncer con ERG normal. Se observa además una asociación estadísticamente relevante entre menos redondez y la reorganización de ERG por inserción (figura 11). Los resultados indican que los núcleos de forma irregular es más probable que estén asociados a reorganizaciones de ERG y en particular sucesos de únicamente inserción de ERG.

30 A continuación, se describe la presente tecnología en términos lo suficientemente completos, claros y concisos para permitir al experto en la materia a la que se refiere la misma, ponerla en práctica. Debe entenderse que lo anteriormente indicado describe las realizaciones preferentes de la presente tecnología y que pueden llevarse a cabo modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu o alcance de la tecnología dada a conocer, tal como se indica en las reivindicaciones adjuntas. Además, los ejemplos se proporcionan a título no exhaustivo sino ilustrativo de varias realizaciones que se encuentran comprendidas dentro del alcance según las reivindicaciones.

35

40

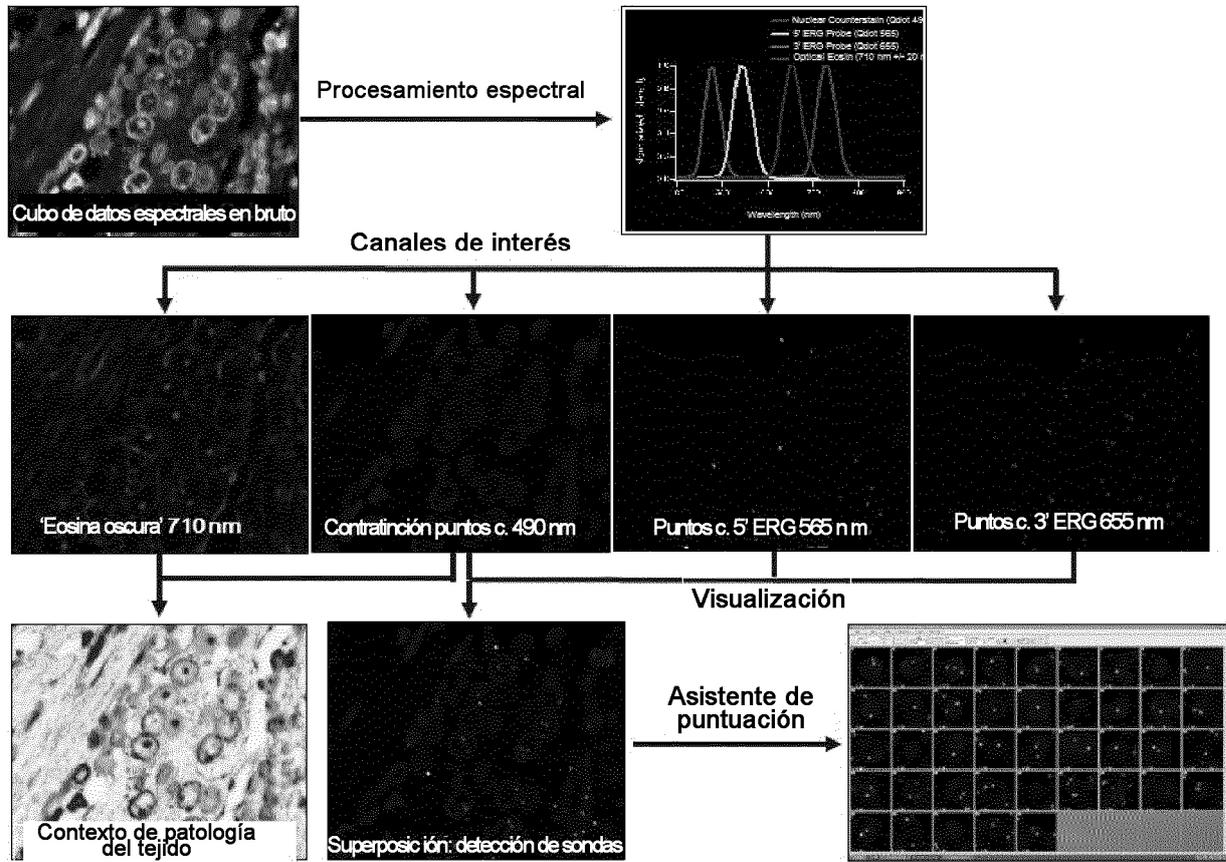
45

50

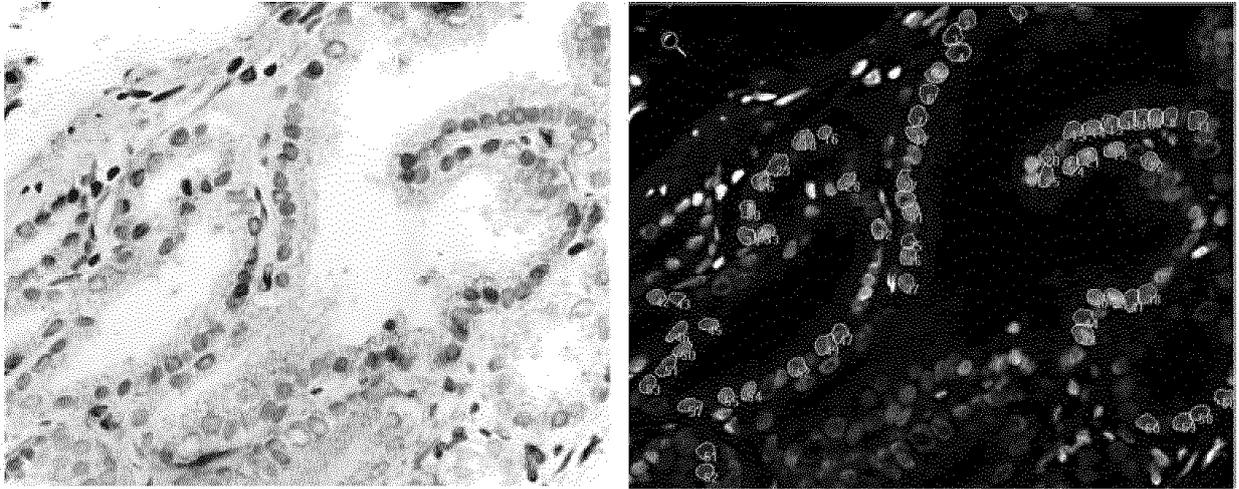
REIVINDICACIONES

1. Método diagnóstico del cáncer multivariante, comprendiendo el método:
 - a. obtener datos de marcadores moleculares de una única muestra de un sujeto que comprende una única célula o población de células procedente de un tejido, en el que el marcador molecular es una reorganización genética,
 - b. obtener datos cuantitativos de la morfología celular de la misma célula individual o población de células utilizada en la etapa (a), en la que los datos de marcadores de la morfología celular son el tamaño nuclear, la forma nuclear y el contenido de ADN,
 - c. llevar a cabo un análisis multivariable de dicha muestra única para generar un conjunto de datos de análisis multivariable que comprende datos cuantitativos de marcadores de la morfología celular de la etapa (b) y datos de marcadores moleculares de la etapa (a),
 - d. comparar los datos de análisis multivariable obtenidos en la etapa (c) con un conjunto de datos de análisis multivariable de referencia creado mediante la obtención de tanto datos de marcadores moleculares como datos cuantitativos de morfología celular de muestras celulares de cáncer y de no cáncer obtenidas de individuos con resultado clínico conocido, en el que el marcador molecular es una reorganización genética y los datos de marcadores de la morfología celular son el tamaño nuclear, la forma nuclear y el contenido de ADN, y
 - e. predecir un resultado clínico definido por combinaciones específicas de datos de marcadores de la morfología celular y datos de marcadores moleculares asociados estadísticamente con la progresión, incidencia y metástasis del cáncer u otro determinante de resultado clínico observado en el conjunto de datos de análisis multivariable de referencia.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la reorganización genética es una reorganización del gen ERG.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la célula única o población de células de un tejido es una única célula o población de células asociada a un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de leucemia, linfoma, cáncer de cerebro, cáncer cerebroespinal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de cervix, cáncer de útero, cáncer ovárico, cáncer de riñón, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer pancreático y melanoma.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que la reorganización del gen ERG se detecta mediante hibridación in situ.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la reorganización del gen ERG se detecta mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) utilizando ácido nucleicos marcados fluorescentemente.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se detecta el tamaño nuclear, la forma nuclear y el contenido de ADN utilizando una técnica de tinción de ADN fluorescente.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la técnica de tinción de ADN fluorescente es una tinción DAPI.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la reorganización del gen ERG y el tamaño nuclear, la forma nuclear y el contenido de ADN se cuantifican mediante obtención de imágenes espectrales fluorescentes con el fin de proporcionar datos de imágenes espectrales cuantitativas.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el conjunto de datos de análisis multivariable se crea utilizando los datos de imágenes espectrales cuantitativas.
10. Método según la reivindicación 9, en el que los datos de imágenes espectrales cuantitativas son la resolución de longitudes de onda, la resolución espacial y la resolución de intensidad de las señales de fluorescencia detectadas mediante la técnica de tinción de ADN fluorescente y la hibridación in situ fluorescente.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la reorganización del gen ERG es una inserción en el gen ERG, o la delección de la región 5' de ERG, y los datos de marcadores de la morfología celular son de redondez irregular de los núcleos celulares.

Adquisición espectral, procesamiento y visualización



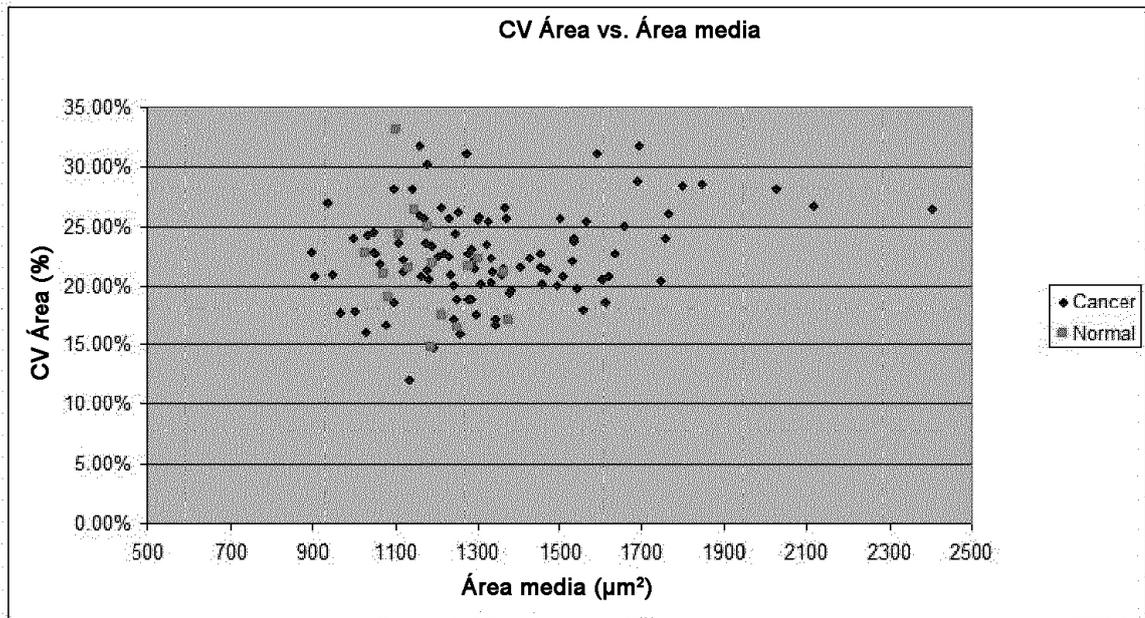
Medición del tamaño y forma del núcleo



- Adquisición: 150 núcleos (aprox. 4 campos por core) de matriz Rubin CTMA 17
- Adquisición espectral, exportación y medición de imagen (varios miles de núcleos de cáncer)
- Núcleos pobremente segmentados o irrelevantes se deselectan del recuento automático

Distribución de mediciones de área nuclear

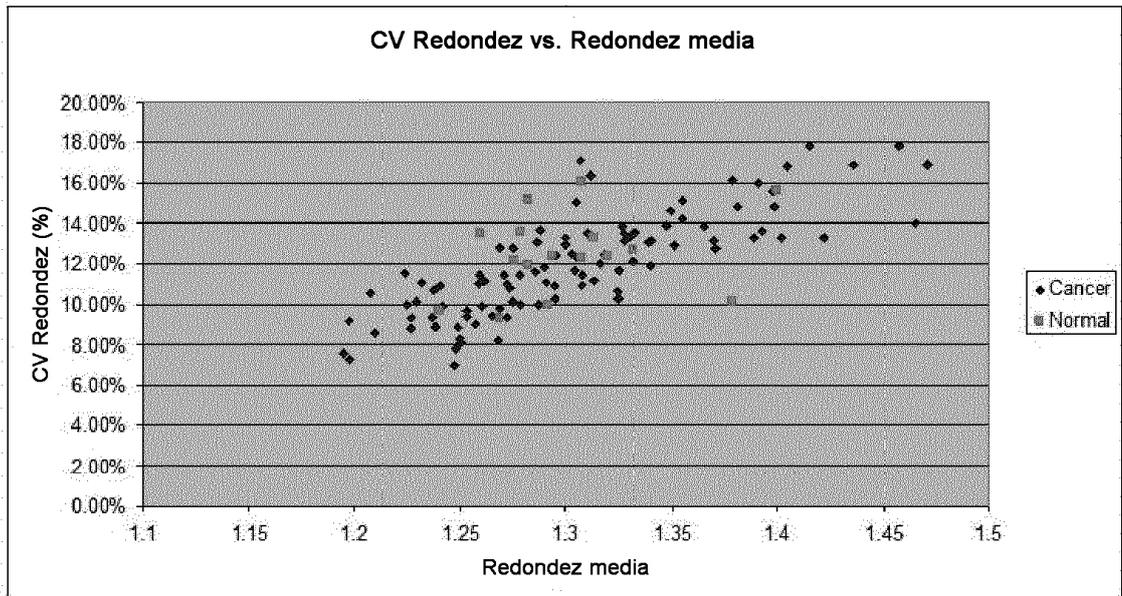
▪ Cada punto de datos representa ~200 núcleos medidos (1 core)



- Los puntos de datos de área media representan el tamaño de núcleos de cáncer de un core dado
- CV=Coficiente de varianza (%); es una medida de la dispersión de los valores en torno del tamaño medio para un core

Distribución de tamaños de núcleo

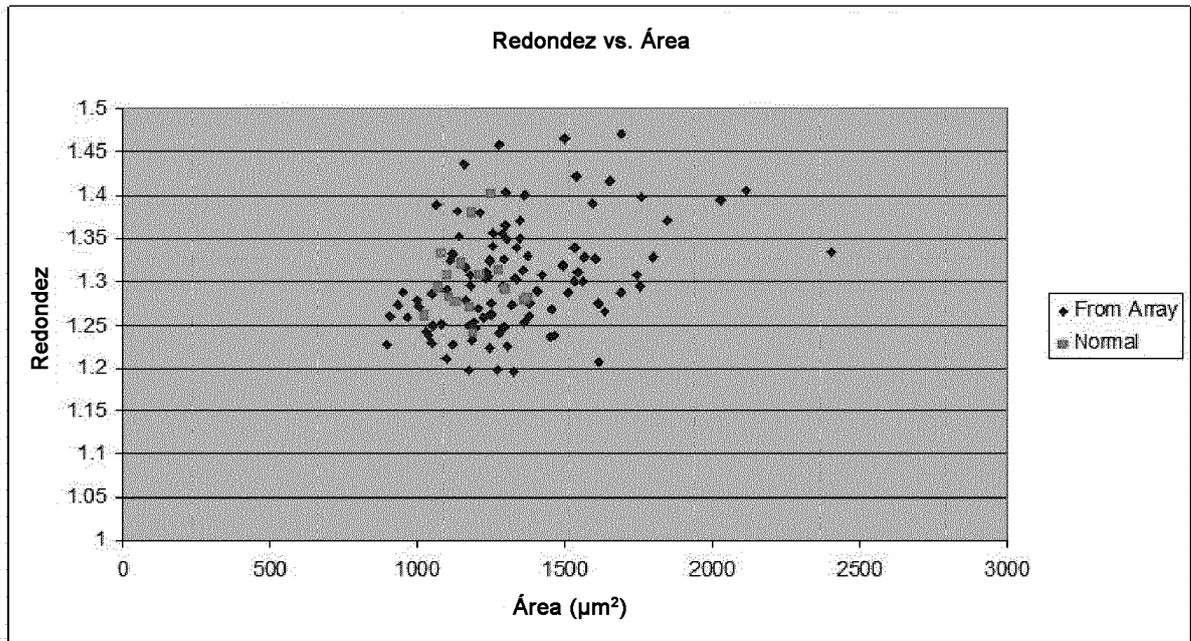
- Redondez informada como: $\frac{(\text{Perímetro})^2}{(4\pi) \text{ área}}$



- Los puntos de datos de 'forma' media representan la 'redondez' media de núcleos de cáncer para un core dado (1=círculo, >1 significa menos redondo)
- CV=Coficiente de varianza (%); es una medida de la dispersión de los valores de redondez en un core

Forma nuclear vs. Tamaño nuclear

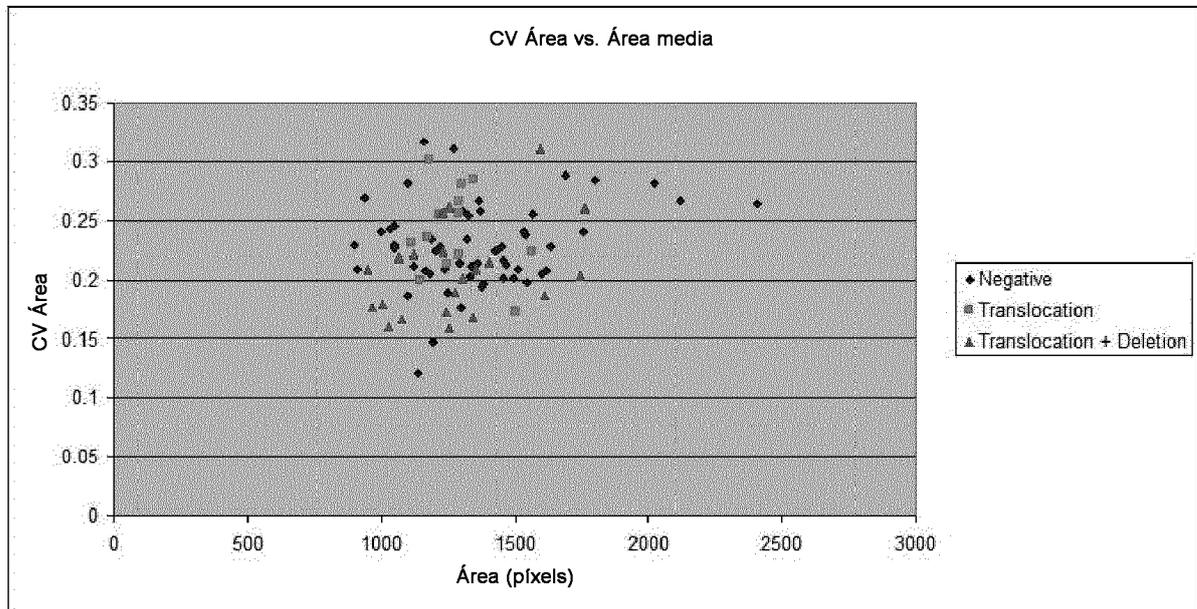
• Cada punto de datos representa ~200 núcleos medidos (1 core)



• Los núcleos de mayor tamaño aparentemente tienden a ser menos redondos

Medición del tamaño nuclear + estado de ERG

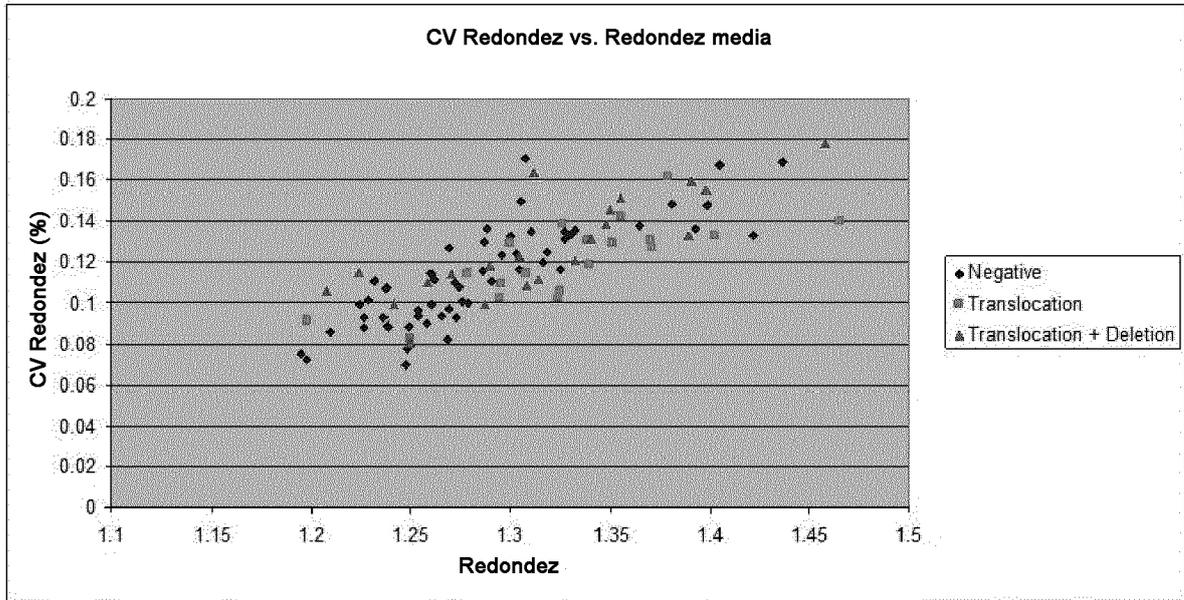
▪ Cada punto de datos representa ~200 núcleos medidos (1 core)



- Los puntos de datos de área media representan el tamaño de núcleos de cáncer para un core dado
- CV=Coficiente de varianza (%); es una medida de la dispersión de los valores en torno del tamaño medio para un core

Forma del núcleo + estado de ERG

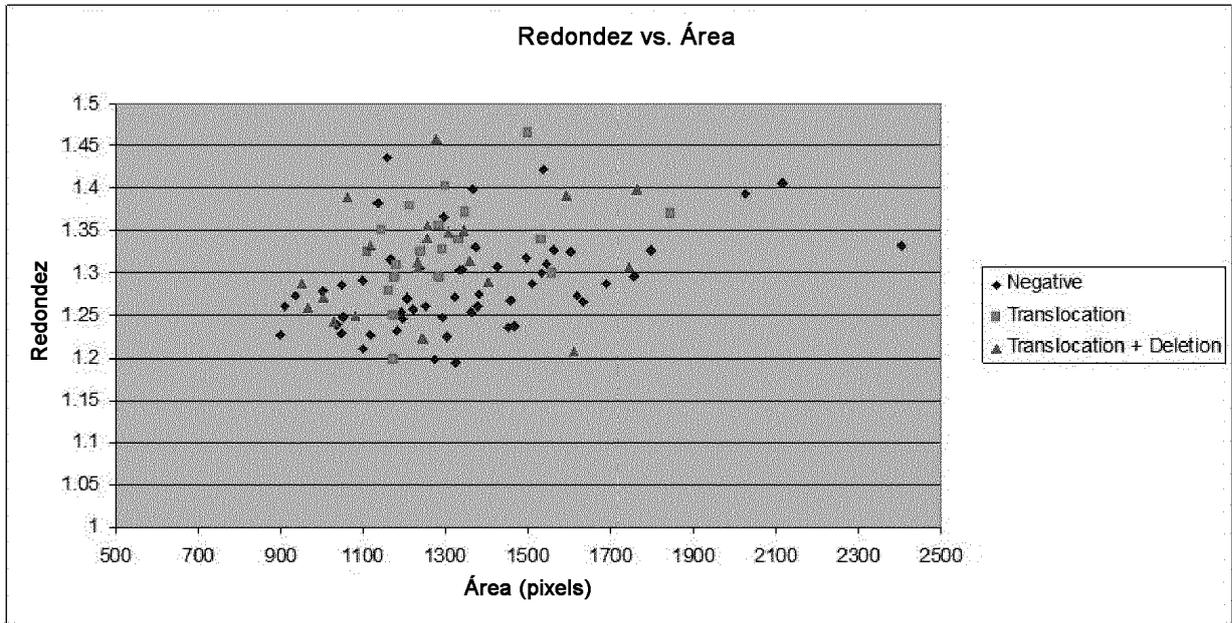
La redondez se informa como: $\frac{(\text{Perímetro})^2}{(4\pi)\text{área}}$



- Los puntos de datos de 'forma' media representan la 'redondez' media de los núcleos de cáncer para un core dado (1=círculo, >1 significa menos redondo)
- CV=Coficiente de varianza (%); es una medida de la dispersión de los valores de redondez en un core

Forma nuclear versus Tamaño nuclear + Estado de ERG

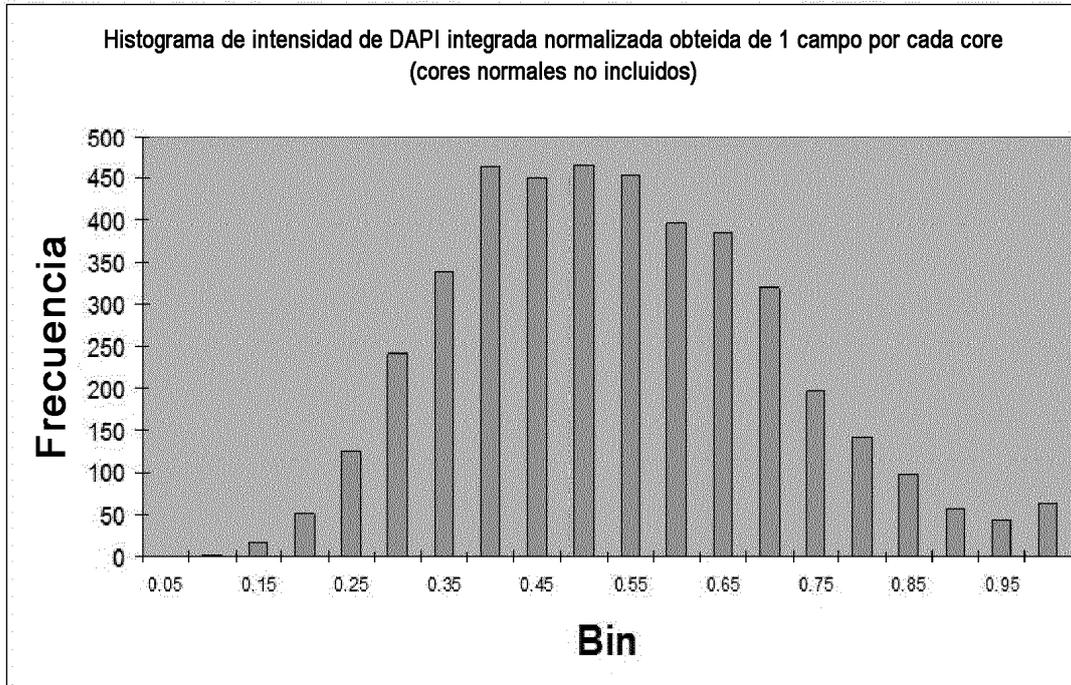
•Cada punto de datos representa ~200 núcleos medidos (1 core)



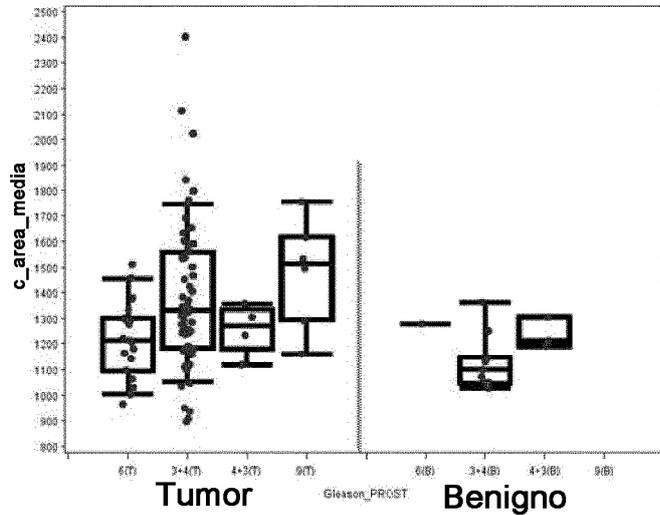
• Los núcleos de mayor tamaño aparentemente tiende a ser menos redondos

Distribución de frecuencias de contenido relativo de DAPI por núcleo

*Los bins' representan incrementos de 5%, es una muestra (campo único/core) de núcleos de cáncer únicamente



Nivel del core - Área según grado de Gleason



| Variable de análisis: c_area_media | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------|-------|---------|---------|---------|------------|---------|
| normal | Gleason PROST | N Obs | Mínimo | Máximo | Media | Desv. est. | Mediana |
| Tumor | 3+3 | 21 | 966.64 | 1519.32 | 1218.63 | 157.7 | 1214.17 |
| | 3+4 | 62 | 898.23 | 2403 | 1384.69 | 291.07 | 1329.8 |
| | 4+3 | 4 | 1119.71 | 1358.03 | 1254.46 | 103.13 | 1270.05 |
| | 4+5 | 6 | 1161.79 | 1754.71 | 1475.28 | 216.27 | 1513.6 |
| Benigno | 3+3 | 1 | 1278.66 | 1278.66 | 1278.66 | | 1278.66 |
| | 3+4 | 9 | 1026.95 | 1363.82 | 1132.41 | 110.39 | 1101.39 |
| | 4+3 | 3 | 1192.76 | 1305.46 | 1236.95 | 60.16 | 1212.6 |

| AREA | Grupo | media | min | max | N |
|-----------------|---------|--------|-------|--------|----------|
| 6&3+4 vs. otros | Tumor | 0.47 | 0.38 | 0.4 | 83 vs 10 |
| | Benigno | 0.2 | 0.55 | 0.93 | 10 vs 3 |
| 6 vs 7+9 | Tumor | 0.0094 | 0.036 | 0.0015 | 21 vs 72 |
| | Benigno | 0.35 | 0.5 | 0.5 | 1 vs 12 |

Análisis de regresión logística:

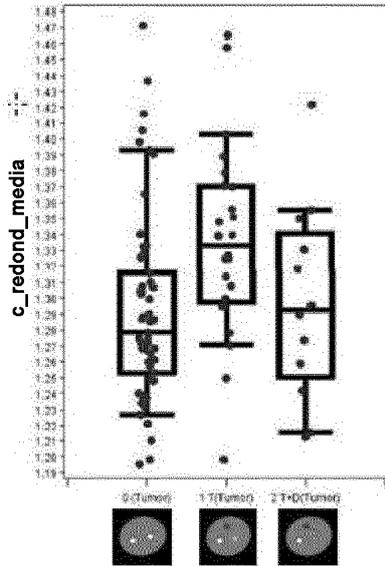
Para 6 vs. >6: OR=1,38 (1,07,1,79), p=0,01 (inc. 100 unidades)

Diferencias estadísticas para 6 vs. >6 al nivel de core*

Se pierde la significancia al nivel de bloque. ¿Pocos puntos de datos?

Redondez y estado de ERG

N de cores tumorales: 93
 N de cores utilizados para campos benignos: 13



| Variable de análisis: c_redond_media | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------------------|-------|--------|--------|-------|------------|---------|
| normal | estado_ERG_FISH_2 | N Obs | Mínimo | Máximo | Media | Desv. est. | Mediana |
| Tumor | 0 | 57 | 1.2 | 1.47 | 1.29 | 0.06 | 1.28 |
| | 1 | 24 | 1.2 | 1.47 | 1.34 | 0.06 | 1.33 |
| | 2 | 12 | 1.21 | 1.42 | 1.3 | 0.06 | 1.29 |
| Normal | 0 | 2 | 1.23 | 1.26 | 1.24 | 0.02 | 1.24 |
| | 1 | 4 | 1.23 | 1.31 | 1.28 | 0.04 | 1.28 |
| | 2 | 7 | 1.24 | 1.41 | 1.31 | 0.05 | 1.31 |

| Redondez | Grupo | media | min | max | N |
|----------|---------|-------|------|------|----------|
| 0+1 vs 2 | Tumor | 1.29 | 0.73 | 0.92 | 81 vs 12 |
| | Benigno | 0.07 | 0.1 | 0.63 | 6 vs 7 |
| 0+2 vs 1 | Tumor | 0.003 | 0.04 | 0.74 | 69 vs 24 |
| | Benigno | 0.59 | 0.08 | 0.94 | 9 vs 4 |
| 0 vs 1+2 | Tumor | 0.008 | 0.12 | 0.82 | 57 vs 36 |
| | Benigno | 0.09 | 0.39 | 0.37 | 2 vs 11 |

Análisis de regresión logística:

Para 0+2 vs. 1: OR=3,02 (1,37, 6,66), p=0,006 (para incr. 0,1 unid.)

Para 0 vs. 1+2: OR=2,26 (1,11, 4,60), p=0,02 (para incr. 0,1 unid.)