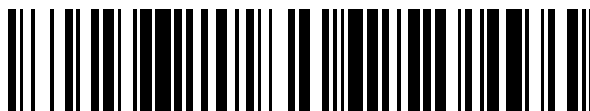


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 594**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2013 PCT/EP2013/060671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13724594 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2856153**

54 Título: **Procedimiento para diagnosticar un cáncer invasivo**

30 Prioridad:

24.05.2012 US 201261651437 P

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

07.05.2018

73 Titular/es:

**RARECELLS (16.7%)
101 rue de Sèvres
75280 Paris Cedex 06, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(16.7%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (16.7%);
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (16.7%);
UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS (16.7%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NICE
(16.7%)**

72 Inventor/es:

**LAGET, SOPHIE;
PATERLINI-BRECHOT, PATRIZIA;
HOFMAN, PAUL y
CAPIOD, THIERRY**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 666 594 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

Procedimiento para diagnosticar un cáncer invasivo

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad según 35 USC Section 119 (e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/651.437, presentada el 24 de mayo de 2012.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

15 [0002] La solicitud describe el aislamiento de células raras de muestras biológicas por filtración y el posterior análisis de estas células raras y sus componentes. Las células raras tienen características o aparecen en muestras biológicas a frecuencias que las distinguen de otros tipos de células. Los tipos de células raras incluyen tumores raros o células de cáncer raras, tipos raros de células endoteliales, células fetales raras y glóbulos blancos infectados raros (leucocitos).

Descripción de la técnica relacionada

20 [0003] Células raras. Las células raras están presentes en números bajos absolutos o relativos en muestras biológicas obtenidas de seres humanos o animales. La presencia de células raras con frecuencia se correlaciona con una enfermedad, trastorno o afección particular. Por ejemplo, las células tumorales raras se pueden encontrar en la sangre de sujetos que tienen tumores o cánceres.

25 [0004] Tipos de células raras. Hay muchos tipos diferentes de células raras y las células raras de forma no exclusiva pueden ser:

- células epiteliales y sus progenitores, células mesenquimales y sus progenitores, células endoteliales maduras e inmaduras y sus progenitores, fibroblastos y sus progenitores, y melanocitos y sus progenitores;
- 30 - monocitos y macrófagos y sus progenitores, linfocitos activados y sus progenitores, células plasmáticas y sus progenitores, eosinófilos y sus progenitores, basófilos y sus progenitores y megacariocitos y sus progenitores;
- células madre de cualquier subtipo;
- células fetales de cualquier origen y tipo incluyendo células linfoides, eritroides, mieloides, madre fetales, células trofoblásticas, tales como citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos y células embrionarias; y
- 35 - células tumorales de cualquier origen y tipo y de cualquier grado de diferenciación, incluyendo células madre tumorales, microémbolos tumorales, células tumorales, células tumorales agregadas, células tumorales colectivas de cualquier tipo, y células atípicas de cualquier origen y tipo.

40 [0005] Algunos tipos de células raras son células patológicas. Ejemplos de tales células patológicas incluyen células tumorales o cancerosas tales como células derivadas o procedentes de cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de esófago, y cualquier tipo de carcinoma, sarcoma, mielomas, melanomas, osteosarcomas, neuroblastomas, leucemias y linfomas.

45 [0006] Las células raras también se asocian con afecciones en las que se aumenta o disminuye el número de células raras en una muestra biológica por la patología. Éstas incluyen:

- células endoteliales presentes en números patológicamente más elevados en la sangre de pacientes con cáncer o pacientes con trastornos cardiovasculares como ataque al corazón;
- células que llevan virus, bacterias u otros agentes patógenos intracelulares, como el VIH, VHB, VHP, shigella, leishmania, bacilo de tuberculosis, monocitos infectados, macrófagos infectados, linfocitos infectados, linfocitos activados; y
- 50 - células que portan mutaciones que están asociadas con enfermedades genéticas, como células fetales de un feto afectado por un trastorno genético, como aneuploidía 21, 13, 18, XXY, XO, talasemia, fibrosis quística, atrofia muscular espinal, enfermedad de Duchenne, enfermedad de Huntington, etc., y las células que portan mutaciones genéticas o características moleculares asociadas con la susceptibilidad a patologías definidas como infecciones virales, inflamaciones, enfermedades degenerativas crónicas, Alzheimer, diabetes, trastornos metabólicos.

55 [0007] Las células raras también pueden estar asociados con condiciones no patológicas, como el embarazo.

60 [0008] Las células raras pueden típicamente representar una célula en de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^{10} células, de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} células, de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{10} células, de aproximadamente 10^6 a 10^{10} células, de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{10} células, o incluso de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} células de una población de células en un fluido biológico. Las células

raras típicamente pueden representar menos de 500 células en 1 ml de fluido biológico, menos de 200 células en 1 ml de fluido biológico, menos de 100 células en 1 ml de fluido biológico, menos de 50 células en 1 ml de fluido biológico o incluso menos de 10 células en 1 ml de fluido biológico. Por ejemplo, se sabe que las células tumorales circulantes (CTC) están presentes típicamente en 1-10 o 1 a 500 CTC entre aproximadamente 6×10^6 leucocitos, aproximadamente 2×10^8 plaquetas y aproximadamente 4×10^9 eritrocitos por ml de sangre [75].

Procedimientos anteriores para el aislamiento de células raras.

10 [0009] Las células raras se pueden extraer o aislar de muestras biológicas. Las células extraídas son células extraídas de una muestra líquida sin aislamiento de otras células. Las células raras aisladas son células raras aisladas de otros tipos de células presentes en una muestra líquida. La proporción de células raras frente a células no raras extraídas o aisladas de muestras biológicas varía, por lo tanto el grado de pureza de células raras extraídas o aisladas puede ser variable.

15 [0010] Se han propuesto varios procedimientos para extraer o aislar células raras de muestras biológicas; en particular, se han descrito varios procedimientos para aislar células tumorales o fetales de sangre. Sin embargo, estos procedimientos no abordan el triple desafío de extraer o aislar células raras con (i) mínima o ninguna pérdida, (ii) extracción o aislamiento de células raras con un mínimo o ningún sesgo de selección, y (iii) extracción o aislamiento de células raras en una forma que permite su uso fácil o simultánea en múltiples procedimientos analíticos.

20 [0011] Los procedimientos que sólo recuperan algunas de las células raras en una muestra deterioran cuantitativamente el uso de células raras aisladas o extraídas en procedimientos analíticos posteriores. Estos procedimientos también pueden introducir un sesgo de selección.

25 [0012] El sesgo de selección se produce cuando un procedimiento de extracción o aislamiento conduce a la pérdida de uno o varios tipos de células raras seleccionadas en una muestra. Por ejemplo, un procedimiento que aísla las células tumorales de una muestra de sangre mediante la unión de las células tumorales raras a anticuerpos contra células epiteliales da lugar a la pérdida de células de tumores raras que no expresan antígenos de células epiteliales que se unen al anticuerpo.

30 [0013] Procedimientos severos de extracción o aislamiento o procedimientos que cambian de otro modo las características detectables de las células raras aisladas o extraídas comprometen su uso en procedimientos analíticos posteriores.

35 [0014] La solicitud WO2005/047529 describió un procedimiento para el enriquecimiento de células raras mediante la filtración de una muestra a través de al menos un filtro microfabricado, de manera que los componentes de la muestra fluyen o son retenidos por dicho uno o más filtros microfabricados en función de su tamaño, forma o deformabilidad.

[0015] La solicitud de patente publicada de US-2009-0226957 describió la extracción y el enriquecimiento de células raras, incluyendo células tumorales, por filtración vertical.

40 [0016] Minseok S. Kim et al., LAB ON A CHIP, vol.12, no.16, 10 de Mayo de 2012, página 2874 describió un procedimiento que permitiera el aislamiento de células tumorales circulantes mediante el uso de amplificación de tamaño selectivo (SSA) y un filtro de arquitectura de múltiples obstáculos (MOA). El funcionamiento del dispositivo se evaluó mediante el aislamiento de células de cáncer recogidas de sangre completa.

45 [0017] Importancia diagnóstica de células raras. Se espera que la detección y caracterización de células raras y su uso en el diagnóstico y la terapia sea cada vez más importante en la práctica clínica humana y veterinaria y para la investigación. Las células raras son especialmente valiosas para uso en medicina personalizada o teranóstico, un proceso de terapia de diagnóstico individualizado para un paciente en base a sus características genéticas particulares y en las características de sus células raras. En este escenario, las células raras necesitan ser analizadas mediante múltiples enfoques que proporcionan su identificación de diagnóstico y extensa caracterización. Como ejemplo, las células raras aisladas de sangre de pacientes afectados por cáncer pueden caracterizarse mediante análisis moleculares dirigidos a detectar mutaciones de genes con valor de pronóstico y/o teranóstico. Sin embargo, si sólo los análisis moleculares dirigidos a mutaciones genéticas se realizan sin análisis con el objetivo de diagnosticar la presencia o ausencia de células tumorales en la sangre, el resultado de la prueba puede verse afectada por el sesgo. De hecho, si las células raras aisladas de la sangre de un paciente dado no comprenden células tumorales, la ausencia de mutación genética en las células raras aisladas no indicará ausencia de mutación genética en las células tumorales circulantes. Por lo tanto, se necesitan múltiples análisis realizados en células raras extraídas o aisladas a partir de muestras biológicas con el fin de obtener información fiable para ser utilizada para seleccionar tratamientos dirigidos, para seguir su eficacia y para detectar la posible resistencia a fármacos.

60 [0018] Además, las células raras extraídas o aisladas de sangre u otras muestras biológicas se pueden usar como una

alternativa a las muestras obtenidas a través de procedimientos quirúrgicos o semiquirúrgicos invasivos, que comprenden intervenciones de manera no exclusiva quirúrgicas y semiquirúrgicos, biopsia, laparocentesis, toracentesis, paracentesis, punción espinal, amniocentesis, muestreo de vellosidades coriónicas y cordocentesis. En este escenario, las células raras representan material precioso que necesita ser analizado mediante múltiples análisis para uso diagnóstico y/o terapéutico y para una amplia caracterización molecular y/o genética.

[0019] La solicitud WO2008/008515 dio a conocer que una recopilación de informes indican que las células tumorales circulantes (CTC) se pueden encontrar en pacientes incluso antes de que se detecte el tumor primario. Sin embargo, el documento WO2008/008515 describe que la selección de CTC basada en la selección positiva de anticuerpos sufre de disponibilidad limitada, sensibilidad y especificidad de anticuerpos, y que las estrategias alternativas, tales como filtración y lisis de los glóbulos rojos corren el riesgo de perder o dañar células diana.

[0020] Células raras derivadas de cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón es la neoplasia más frecuente y la principal causa de mortalidad relacionada con tumores en todo el mundo [1-5]. A pesar de los recientes avances en la gestión de los cánceres de pulmón resecaados y un tratamiento más eficaz de los tumores metastásicos, la tasa de curación de los pacientes con cáncer de pulmón sigue siendo baja. Sin embargo, el reciente descubrimiento de mutaciones oncogénicas impulsoras en los carcinomas de pulmón y el creciente desarrollo de terapias dirigidas muestran nuevos resultados alentadores en pacientes en etapa avanzada [6-8]. Entre estas terapias, se utilizan gefitinib y erlotinib, inhibidores de la tirosina quinasa dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que presentan una mutación activadora de la tirosina en 10 a 20% de los adenocarcinomas [7, 9]. Más recientemente, se identificó la alteración genómica que implica los genes de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK) (2p23) y la proteína asociada a microtúbulos de equinodermo de tipo 4 (EML4) (2p21) en un subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón que tiene una respuesta favorable excepcional a un inhibidor de molécula pequeña de ALK (crizotinib) [7, 10-13]. El reordenamiento del gen de ALK se encontró en 1 a 7% de cánceres de pulmón de células no pequeñas de (NSCLC) de acuerdo con la mayor parte de la serie sin mutaciones asociadas a *KRAS* y *EGFR* en la mayoría de los tumores [10, 12-14]. Las características histológicas específicas caracterizan a este subconjunto de adenocarcinomas de pulmón ALK-positivos, presentando un patrón de crecimiento sólido o acinar, una estructura cribiforme, la presencia de células de la mucosa (células en anillo de sello o células caliciformes), abundante mucosidad extracelular, una falta de crecimiento lepidico, y la falta de pleomorfismo nuclear significativo [14]. Por otra parte, los pacientes con tumores con reordenamiento de *ALK* eran más jóvenes, eran más frecuentemente varones, en la mayor parte de la serie, y nunca fueron fumadores/ex fumadores ligeros [12, 14].

[0021] Las células tumorales circulantes (CTC) se pueden aislar en más de 40% de pacientes con cáncer de pulmón de acuerdo con la serie y los procedimientos [15-17]. Además, el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón, tanto en fases finales como tempranas de la enfermedad, se correlaciona con la presencia y el número de CTC [15, 16]. Las CTC pueden aislarse por diferentes procedimientos directos e indirectos [18, 19]. Las alteraciones genómicas, en particular las mutaciones que se producen en el gen *EGFR*, se han demostrado en CTC aisladas en pacientes con NSCLC [20].

[0022] Los inventores demostraron previamente que las CTC se pueden aislar por procedimientos diferentes incluso en la enfermedad en la fase temprana en pacientes sometidos a cirugía para los carcinomas de pulmón [15, 21]. Además, la presencia y el número de CTC se asociaron con un peor pronóstico [15]. Curiosamente, mediante el uso de un procedimiento directo que aislaba las CTC de acuerdo a su tamaño (ISET, aislamiento por tamaño de las células tumorales epiteliales) los inventores definieron criterios citopatológicos malignos, lo que permitió una buena caracterización de CTC con características malignas [22, 23]. Además, mediante la aplicación de un enfoque inmunocitoquímico (ICC) para CTC aisladas por ISET de pacientes con NSCLC, nuestro grupo y otro grupo mostraron que un número variable de CTC muestran un fenotipo de transición epitelio-mesenquimal (EMT) [17, 21, 24, 25].

[0023] No se ha descrito la evaluación del reordenamiento del gen *ALK* en CTC aisladas de pacientes con cáncer de pulmón. Esta es una meta clínica relevante para la preselección no invasiva de pacientes con cáncer de pulmón para evitar la potencial morbilidad relacionada con la biopsia de pulmón y de extirpación de tejido tumoral.

[0024] Células raras trofoblásticas. Se han descrito procedimientos no invasivos para aislar células trofoblásticas de la sangre materna, por ejemplo, tal como se describe en la patente de Estados Unidos 7.651.838 concedida el 26 de enero de 2010. Sin embargo, hay una necesidad de procedimientos de obtención de células trofoblásticas de muestras cervicales a través de una estrategia completamente no invasiva y segura (por ejemplo, sin riesgo de inducir aborto involuntario). Tales procedimientos deberían recuperar consistentemente células trofoblásticas de mujeres embarazadas con el fin de que esta estrategia sea útil para el diagnóstico prenatal no invasivo de defectos, enfermedades o trastornos genéticos (Imudia AN, Kumar S, Diamond MP, DeCherney AH, Armant DR. Transcervical retrieval of fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future direction. *Fertil Steril* 2010; 93: 1725-1730). Por ejemplo, el diagnóstico de la trisomía fetal 21 en mujeres embarazadas puede lograrse mediante la extracción de ADN libre y el análisis de ADN fetal libre por secuenciación de próxima generación. Si la cantidad de ADN fetal libre es demasiado baja, no se pueden obtener resultados fiables sobre la presencia o ausencia de aneuploidía fetal, por lo tanto,

las células fetales circulantes pueden ser analizadas para llevar a cabo el diagnóstico prenatal no invasivo. La patente de Estados Unidos 7.651.838 describe el aislamiento de células trofoblásticas de sangre a través de un procedimiento no invasivo. Las células trofoblásticas podrían ser aisladas o extraídas de muestras cervicales, pero no se sabía cómo obtener consistentemente y de manera no invasiva (sin el riesgo de inducir aborto involuntario) células trofoblásticas de muestras cervicales, de la mucosa cervical, o a partir de muestras obtenidas a partir de la membrana mucosa (Imudia AN, et al Fertil Steril 2010: 93: 1725-1730).

[0025] Los inventores trataron de resolver los problemas descritos anteriormente mediante la extracción de células raras de muestras biológicas, tales como sangre y secreciones de la mucosa utilizando filtración y el otros procedimientos de aislamiento y analíticos descritos en el presente documento.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0026] La invención es tal como se define por las reivindicaciones.

[0027] Los procedimientos descritos en este documento resuelven estos problemas y retos mediante el uso de filtración como la forma más adecuada para extraer o aislar células raras a partir de muestras biológicas. Después de su extracción o aislamiento por filtración, las células raras están presentes en una condición adecuada para múltiples o incluso simultáneos procedimientos analíticos. Este procedimiento aísla o extrae eficazmente las células raras de una muestra biológica, se identifican las células raras, y a continuación se caracterizan molecularmente las células raras para fines de diagnóstico y para seleccionar, guiar, controlar los tratamientos y en particular para seleccionar tratamientos dirigidos y para controlar la respuesta y/o resistencia a ellos.

[0028] Los procedimientos descritos comprenden diversos modos de análisis o caracterización de células raras. Estos incluyen (i) el uso de análisis cuantitativo y cualitativo de células raras aisladas por filtración para fines de diagnóstico o teranóstico y para seleccionar posteriormente una terapia; (ii) "análisis cualitativo" incluye múltiples análisis realizados en las mismas células raras aisladas por filtración. Los múltiples análisis de la misma muestra evita los problemas asociados con las afecciones en las que las células raras no son abundantes o con muestras biológicas que contienen un bajo número de células raras; (iii) "análisis cualitativo", incluyendo el aislamiento de células raras no fijadas (frescas) por filtración que permite su cultivo y análisis de ARN; (iv) el uso de células tumorales circulantes aisladas por filtración para el diagnóstico precoz de los cánceres invasivos; y (v) el uso de células trofoblásticas aisladas de muestras de la mucosa cervical para el diagnóstico prenatal no invasivo de trastornos genéticos.

[0029] La invención es un procedimiento para diagnosticar un cáncer invasivo, que comprende (a) aislar o extraer células tumorales circulantes haciendo pasar una muestra de sangre anticoagulada o una muestra de sangre diluida anticoagulada obtenida de un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer, mediante filtración vertical a través un filtro y recuperar las células aisladas o extraídas que no pasan a través del filtro; en el que el filtro tiene un tamaño de poro comprendido entre 3 y 100 μm , y una densidad de poros de entre 3×10^3 y 5×10^6 poros/ cm^2 y en el que el filtro retiene las células tumorales circulantes, pero permite el paso de células sanguíneas más pequeñas que las células tumorales circulantes a través del filtro; (b) analizar las células de (a) utilizando un análisis citomorfológico y/o inmunomarcaje y/o análisis molecular in situ, y/o análisis molecular de ADN, y/o ARN, y/o microARN, y/o análisis molecular de moléculas de proteína para determinar si las células tumorales circulantes están presentes, determinando de esta manera el riesgo del sujeto de tener un cáncer. Este procedimiento puede ser utilizado para aislar, extraer, concentrar o de otro modo purificar células tumorales circulantes en una muestra biológica de interés. La muestra biológica es sangre.

[0030] La muestra biológica se obtiene de un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer o tumor.

[0031] En el procedimiento descrito anteriormente en la etapa (a) las células tumorales circulantes se pueden aislar, extraer, concentrar o de otra manera purificar haciendo pasar la muestra biológica a través de un filtro de policarbonato, PET (tereftalato de polietileno), u otro filtro o material poroso adecuado y recuperar las células tumorales circulantes en el filtro de policarbonato.

[0032] Una muestra biológica puede ser fresca, tal como una recientemente tomada de un sujeto, una muestra almacenada, tal como una muestra, conservada, refrigerada o congelada, o una muestra sometida a otro tratamiento, tal como la fijación. Dependiendo del tipo de muestra biológica, puede ser tratada con un agente mucolítico, anticoagulante, proteasa, o por tratamiento con un agente lítico que elimina selectivamente tipos particulares de células en la muestra biológica en condiciones que preserven las células raras en la muestra.

[0033] Antes del paso a través del filtro, la muestra biológica se puede diluir o procesar de otro modo para facilitar el aislamiento, extracción, concentración o purificación de las células tumorales circulantes.

[0034] Las células raras que se aíslan, extraen, concentran o de otra manera purifican por el proceso de filtración descrito en el presente documento pueden ser transferidas a un soporte antes de un análisis posterior como en (b) o para cultivo.

5 **[0035]** Las células raras pueden ser recogidas de forma individual para el análisis molecular después de su aislamiento o extracción por filtración o múltiples o todas las células raras aisladas o extraídas de la muestra biológica mediante filtración pueden ser recogidas para su análisis en (b). Además, las células raras aisladas o extraídas pueden cultivarse o expandirse antes del análisis en (b). Por ejemplo, las células raras pueden ser cultivadas en presencia y ausencia de un fármaco o agente específico, tal como un agente radiológico, biológico o químico, con el fin de determinar su respuesta al fármaco o agente en comparación con células raras que no fueron tratadas. Este proceso puede ser utilizado para
10 seleccionar los tratamientos dirigidos a células raras aisladas de un paciente específico y para controlar la respuesta del paciente a un tratamiento o controlar el desarrollo de resistencia al tratamiento con un fármaco o agente particular.

15 **[0036]** Antes del análisis en (b) las células raras aisladas o extraídas pueden ser fijadas o teñidas in situ en los filtros utilizados para aislarlas o después de la eliminación de los filtros. Por ejemplo, las células raras aisladas o extraídas pueden analizarse en (b) mediante análisis molecular in situ después o antes de la tinción o inmunotinción ya sea en el filtro o en otro sustrato; o (b) puede comprender análisis citomorfológico de las células raras aisladas o extraídas in situ en el filtro o en otro soporte al que se transfieren las células raras aisladas (o posteriormente cultivadas o células raras multiplicadas). Las células raras aisladas o extraídas también pueden ser analizadas o evaluadas por otros procedimientos que no requieren estar ancladas a un soporte.

20 **[0037]** En los procedimientos descritos en este documento, (b) puede comprender el análisis molecular de las proteínas, ácidos nucleicos, u otros componentes de las células raras aisladas o extraídas in situ sobre el filtro o en otro sustrato al que se aplican las células raras, o las células raras cultivadas. Por ejemplo, el análisis molecular de (b) puede comprender el análisis molecular de las proteínas, péptidos o polipéptidos de las células raras aisladas o extraídas; el ADN, ARN, o
25 microARN de las células raras aisladas o extraídas; u otros componentes de las células raras, además de polipéptidos o ácidos nucleicos.

30 **[0038]** Los procedimientos descritos en este documento también pueden comprender además (b1) visualizar las imágenes de las células raras aisladas o extraídas después del análisis citomorfológico, inmunomarcaje o en el análisis molecular in situ y/o (b2) registrar las imágenes de las células raras aisladas o extraídas después del análisis citomorfológico, inmunomarcaje o análisis molecular in situ.

35 **[0039]** Cuando las células raras aisladas o extraídas se lisan (b) puede comprender detectar proteína o proteínas mutadas y/o ARN mutado y/o mutación o mutaciones de ADN asociados con una afección, trastorno o enfermedad en las células raras lisadas. Por ejemplo, las células raras pueden ser lisadas para aislar polipéptidos u otros componentes inmunológicos contenidos dentro de las células raras, se pueden lisar con el fin de aislar, concentrar o de otro modo purificar los componentes a ser detectados, o se pueden lisar con el fin de aislar los ácidos nucleicos para el análisis molecular.

40 **[0040]** Este proceso puede implicar además seleccionar un tratamiento dirigido para medicina personalizada, para evaluar la eficacia del tratamiento o para detectar la posible resistencia al tratamiento basado en la detección del ADN mutado, y/o ARN mutado y/o proteína o proteínas mutadas en la células raras lisadas. Por ejemplo, después de la lisis de las células raras (b) puede implicar detectar la presencia o ausencia de mutaciones de ALK en las células raras lisadas; detectar la presencia o ausencia de mutaciones de ALK en las células raras lisadas, en el que dicho procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento para un sujeto, seguir la eficacia de un tratamiento, o detectar la resistencia al
45 tratamiento basado en la presencia o ausencia de la mutación de ALK; detectar la presencia o ausencia de una mutación de K-RAS y/o EGFR en las células raras lisadas, en el que dicho procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento para un sujeto, seguir la eficacia de un tratamiento, o detectar la resistencia al tratamiento basado en la presencia o ausencia de una mutación de K-RAS y/o EGFR; o detectar la presencia o ausencia de una mutación de B-RAF y/o HER2 en células raras lisadas, en el que dicho procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento para
50 un sujeto, seguir la eficacia de un tratamiento, o detectar la resistencia al tratamiento basado en la presencia o ausencia de las mutaciones de HER2 y/o B-RAF.

55 **[0041]** También se describe un tratamiento de medicina personalizada que comprende repetir los procedimientos descritos anteriormente usando muestras biológicas obtenidas a partir del mismo sujeto en diferentes momentos. Por ejemplo, las muestras de células raras pueden ser aisladas de un sujeto antes del tratamiento con un fármaco u otro agente, una vez más o varias veces durante el curso del tratamiento, y de nuevo después de que el tratamiento haya terminado. Esto permite una evaluación longitudinal de la eficacia del tratamiento.

60 **[0042]** De este modo, las muestras biológicas se obtienen del mismo paciente antes y después del tratamiento, en diferentes puntos de tiempo durante el tratamiento de una afección, o durante diferentes regímenes de tratamiento para una afección, trastorno o enfermedad asociados con las células raras. Este tratamiento de medicina personalizada también

puede implicar (c) y/o (d) que comprenden comparar adicionalmente el número de células raras entre las muestras obtenidas a diferentes puntos de tiempo para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento o para detectar la resistencia a un régimen de tratamiento, en donde una disminución en el número relativo de células raras detectado indica una eficacia relativa de un régimen de tratamiento, y en el que un aumento en el número relativo de células raras detectado indica la resistencia o ineficacia del régimen de tratamiento; y opcionalmente, (d) seleccionar un tratamiento dirigido personalizado eficaz para el sujeto basado en (c).

[0043] El tipo o la identidad o el origen de las células raras se pueden determinar, por ejemplo, inmunológicamente, por tinción, por la apariencia física, o por análisis molecular de sus proteínas, ácidos nucleicos, u otros componentes. Por ejemplo, (b) puede comprender analizar las células raras aisladas o extraídas que comprende determinar el estado de transición epitelial a mesenquimal de las células raras; puede comprender analizar las células raras aisladas o extraídas que comprende determinar el estado de las células madre raras; o puede comprender analizar las células raras aisladas o extraídas mediante la determinación de si las células raras tienen una firma de expresión génica asociada con células metastásicas o invasivas o si las células raras expresan determinantes asociados con metástasis o invasión.

[0044] El procedimiento descrito en este documento comprende hacer un diagnóstico de cáncer invasivo asociado con las células tumorales circulantes en base a (b); puede implicar hacer un diagnóstico del órgano en el que el cáncer invasivo se originó basado en (b).

[0045] Los procedimientos descritos en este documento pueden comprender, además, evaluar un efecto de un fármaco candidato o tratamiento candidato sobre las características moleculares de las células raras, y seleccionar un fármaco o tratamiento que reduce el número de células raras en un sujeto en comparación con un control no sin fármaco o tratamiento, y seleccionar un fármaco o tratamiento que reduce el número relativo de células raras o modifica las características moleculares o inmunológicas de las células raras en comparación con el control.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0046]

Figura 1A. A (Caso 1) y B (caso 2). A1 y B1. Células tumorales circulantes que muestran una tinción intensa y citoplásmica (puntuación 3+) con algunos refuerzos de membrana (flechas) (inmunotinción de ALK utilizando mAb 5A4, inmunoperoxidasa, aumento original x 1000; barra: 16 μ m). A2 y B2. Núcleos de células circulantes hibridados con una sonda de escisión específica de locus de *ALK* 2p23 LSI de doble color. Las dos sondas (3', rojo; 5', verde) muestran una separación diferenciada de las señales roja y verde (puntas de flecha) que indican un reordenamiento en el locus del gen *ALK* 2p23. Las sondas dan señales superpuestas en los núcleos sin el reordenamiento (flechas). También se observan señales 3' aisladas (rojo) (asteriscos) (aumento original x 1000; barra: 16 μ m). A3 y B3. Células circulantes que muestran criterios citomorfológicos malignos aisladas por el procedimiento ISET (aumento original x 1000; Tinción con MGG; Barra: 16 μ m). C. Un paciente con ALK FISH negativo e IHC ALK negativo en el tumor de tejido. C1. Células tumorales circulantes que no muestran tinción (puntuación 0) (inmunotinción de ALK utilizando mAb 5A4, inmunoperoxidasa, aumento original x 1000; barra: 16 μ m). C2. Núcleos de células circulantes hibridados con una sonda de escisión específica de locus de *ALK* 2p23 LSI de doble color. Las dos sondas (3', rojo; 5', verde) dieron señales superpuestas en los núcleos sin el reordenamiento (flechas). No se detectó señal dividida en estas células tumorales (aumento original x 1000; barra: μ m). C3. Células circulantes que muestran criterios citomorfológicos malignos aisladas por el procedimiento ISET (aumento original x 1000; Tinción con MGG; Barra: 16 μ m). D. Células H22213 aisladas por el procedimiento ISET. D1 Inmunotinción de ALK utilizando mAb 5A4 (inmunoperoxidasa, aumento original x 1000) que muestra una tinción intensa y citoplásmica (puntuación 3+) con algunos refuerzos de membrana (flechas). D2. FISH utilizando la sonda de escisión específica de locus de *ALK* 2p23 LSI de doble color en la línea celular de tumor H2228 enriquecida en sangre periférica y aislada por el procedimiento ISET. Las dos sondas (3', rojo; 5', verde) muestran una separación diferenciada de las señales roja y verde (puntas de flecha) que indica un reordenamiento en el locus del gen *ALK* 2p23. Las sondas dieron señales superpuestas en los núcleos sin el reordenamiento (flechas). También se observan señales 3' aisladas (rojo) (asteriscos) aumento original x 1000; barra: 16 μ m). D3. Células H2228 teñidas con MGG después de la filtración de la sangre (aumento original x 1000; Tinción con MGG; Barra: 16 μ m).

Figura 1B. A (Caso 3), B (Caso 4) y C (caso 5). A1-C1. Células tumorales circulantes que muestran una tinción intensa y citoplásmica (puntuación 3+) con algunos refuerzos de membrana (flechas) (inmunotinción de ALK utilizando mAb 5A4 inmunoperoxidasa, aumento original x 1000; barra: 16 μ m). A2-C2. Núcleos de células circulantes hibridados con una sonda de escisión específica de locus de *ALK* 2p23 LSI de doble color. Las dos sondas (3', rojo; 5', verde) muestran una separación diferenciada de las señales roja y verde (puntas de flecha) que indica un reordenamiento en el locus del gen *ALK* 2p23. Las sondas dan señales superpuestas en los núcleos sin el reordenamiento (flechas). También se observan señales 3' aisladas (rojo) (asteriscos) (aumento original x 1000; barra: 16 μ m). A3-C3. Células circulantes que muestran criterios citomorfológicos malignos aisladas por el procedimiento ISET (aumento original x 1000; tinción con MGG; Barra: 16 μ m).

Figura 2. Análisis citomorfológico de células no hematológicas circulantes con características malignas - células tumorales circulantes (CTC) detectadas utilizando el procedimiento ISET en pacientes con EPOC.

(A) y (B) CTC aisladas por el procedimiento ISET e identificadas por protocolo de tinción con MGG en pacientes con EPOC que han desarrollado cáncer de pulmón. (A) CTC aislada con características citomorfológicas malignas (flechas dobles: poros del filtro). (B) Cluster (CTM) compuesto de 9 CTC con características citomorfológicas malignas (Aumento original x 1000; barras: 8 μm ; flechas dobles: poros de los filtros).

(C) y (D) CTC inmunoteñidas observadas en sangre filtrada utilizando el procedimiento ISET para los pacientes con EPOC. (C) CTC expresa fuertemente el antígeno de pan-citoqueratina sólo en paciente con EPOC. (D) CTC que coexpresa antígenos de pan-citoqueratina y vimentina en paciente con EPOC (aumento original x 400; barras: 16 μm ; tinción con inmunofosfatasa con un anticuerpo pan-citoqueratina (KL1) y tinción con inmuno-peroxidasa con un anti anticuerpo anti-vimentina; flechas dobles: poros de los filtros).

Figura 3. Detección de células citotrofoblastos (A) y sincitiotrofoblastos (B) en muestras cervicales utilizando ISET. La naturaleza fetal de células aisladas se confirmó por genotipado con STR con marcadores informativos D5S615 (A) y D21S11 (B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

[0047] Muestras. Las muestras biológicas comprenden sangre venosa y arterial.

[0048] Filtros y filtración. Los filtros que se pueden usar para aislar o extraer células raras comprenden de manera no exclusiva una membrana de policarbonato, PET (tereftalato de polietileno) u otro material, que tiene el espesor y el tamaño de poro y la densidad adaptados para la extracción o aislamiento de células raras definidas. Los filtros, aparato de filtración, procedimientos de filtración, tampones y otros equipos y suministros han sido descritos por Paterlini-Brechot en la solicitud publicada de patente US 2009/0226957.

[0049] Estos incluyen (i) un procedimiento que implica el uso de un filtro que comprende al menos una zona de filtración básica, por lo que cada zona de filtración básica tiene un área de superficie limitada; y (ii) el área de superficie de cada zona de filtración básica y el número de zonas de filtración básicas se seleccionan en función del tipo de líquido a filtrar, el tipo de partículas biológicas a separar y el volumen de líquido a filtrar.

[0050] Por consiguiente, la solicitud describe un procedimiento para separar partículas biológicas y el fluido que las contiene para los fines de purificación o análisis y, posiblemente, para el diagnóstico, que comprende al menos una etapa de filtración vertical a través de un filtro, la porosidad del cual es adecuada para la naturaleza de las partículas biológicas a separar, de manera que dichas partículas biológicas son retenidas por el filtro, caracterizado porque se utiliza un filtro que comprende al menos un área de filtración elemental, teniendo cada área de filtración elemental una superficie limitada, y porque la superficie de cada área de filtración elemental y el número de áreas de filtración elementales se eligen según la naturaleza del fluido a filtrar, la naturaleza de las partículas biológicas a separar y el volumen de fluido a filtrar.

[0051] Cada área de filtración elemental de dicho procedimiento tiene una superficie igual a la de un disco con un diámetro de entre 0,6 cm y 3 cm, y el número de área de filtración elemental se elige de manera que la relación del volumen de fluido filtrado con respecto a la superficie de filtración es de menos de 40 ml/cm², y preferiblemente mayor que 0,14 ml/cm².

[0052] Preferiblemente, cada área de filtración elemental tiene una superficie igual a la de un disco con un diámetro mayor que o igual a 0,8 cm.

[0053] Preferiblemente, el filtro tiene poros calibrados a un tamaño de entre 3 μm y 100 μm y una densidad de poros de entre 3×10^3 y 5×10^6 poros/cm².

[0054] Preferiblemente, la filtración se lleva a cabo mediante una reducción de la presión de entre 0,05 bar y 1 bar con, posiblemente, un aumento de la presión de menos de 1 bar.

[0055] Para llevar a cabo la filtración, es preferible utilizar un filtro que forma una placa adecuada para asociarse con un medio para analizar los residuos de filtración mediante la localización de las áreas de filtración elemental.

[0056] Preferiblemente, la placa que forma el filtro se incorpora en un módulo de filtración de un solo uso que comprende al menos una cámara para contener el fluido a filtrar, y que puede ser tratado antes de su uso para esterilizarlo o para liberarlo de enzimas que digieren ADN, ARN o proteínas.

[0057] Las partículas biológicas a separar son, por ejemplo, células. En este caso, antes de filtrar el fluido que contiene las células, puede prepararse una muestra de fluido para el filtrado a partir de una muestra de fluido que contiene células, tal como un fluido biológico o cultivo celular mediante su preenriquecimiento con las células a separar y/o mediante su

dilución.

- 5 **[0058]** El fluido que contiene las células puede ser sangre y, preferiblemente, el filtro en este caso tiene poros calibrados de entre 5 μm y 25 μm . El proceso se puede utilizar para la detección de células con fines de diagnóstico, tales como tumor, fetal, endotelial, fibroblástica, músculo, nervio o células monocitales, cepas de células, células de órganos, precursores o células hematopoyéticas, en un fluido biológico, tal como sangre, orina, ascitis, líquido cefalorraquídeo, leche, extravasación pleural, fluido para el lavado del cuello del útero, fluido de suspensión celular obtenido por biopsia, por un procedimiento quirúrgico o por lavado de boca, o para la detección de células animales o vegetales.
- 10 **[0059]** La solicitud también describe un módulo de filtración para la aplicación del proceso, dicho módulo comprende: un bloque de cámara que comprende al menos un compartimento cerrado en su parte inferior por una base que comprende al menos una abertura; un cajón de soporte de filtro que comprende al menos un orificio, cada orificio está dispuesto frente a una abertura en el bloque de cámara; un filtro ajustado entre la cara inferior del bloque de la cámara y el cajón de soporte.
- 15 **[0060]** En este módulo, las dimensiones de cada abertura en la base del bloque de cámara y las dimensiones de cada orificio en el cajón de soporte de filtro son tales que cada par formado por una abertura en la base del bloque de la cámara y el asociado orificio en el cajón de soporte de filtro, definen un área de filtración elemental de superficie limitada y en que el volumen útil de cada compartimento es proporcional al número de áreas de filtración elemental situadas en la base del compartimento.
- 20 **[0061]** Preferiblemente, la superficie de un área de filtración elemental es igual a la de un disco con un diámetro equivalente de entre 0,6 cm y 3 cm, y la relación entre el volumen útil de cada compartimento con respecto a la suma de las superficies de las aberturas comprendidas en la base del compartimento es menor que 40 ml/cm², y preferiblemente mayor que 0,14 ml/cm², así como todos los valores intermedios y subintervalos de los intervalos mencionados anteriormente.
- 25 **[0062]** Preferiblemente, las dimensiones de al menos una abertura en la base del bloque de la cámara y de un orificio correspondiente en el cajón de soporte de filtro son tales que la superficie de la correspondiente área de filtración elemental es mayor que o igual a la de un disco de 0,8 cm de diámetro.
- 30 **[0063]** Preferiblemente, al menos un compartimento se puede dividir en compartimentos en secciones por al menos una pared de separación extraíble, de tal manera que al menos un compartimento en sección comprende en su base al menos una abertura y que la relación del volumen de dicho compartimento en sección con respecto a la suma de las superficies de las aberturas en la base del compartimento en sección es de menos de 40 ml/cm², y preferiblemente mayor que 0,14 ml/cm², así como todos los valores intermedios y subintervalos de los intervalos anteriormente mencionados.
- 35 **[0064]** Preferiblemente, el módulo de filtración comprende una junta de estanqueidad ranurada dispuesta entre la base del bloque de la cámara y el filtro, que comprende al menos un orificio que corresponde a un orificio en la base del bloque de cámara, estando el orificio rodeado por al menos un borde saliente.
- 40 **[0065]** Además, el módulo de filtración comprende también preferiblemente una junta de placa entre el filtro y el soporte del filtro, que comprende al menos una abertura enfrente de un orificio en el soporte de filtro.
- 45 **[0066]** El filtro puede formar una placa, la porción central de la cual, comprende al menos un área porosa y la periferia de la cual forma un marco que comprende medios para la indexación de su posición en el soporte de filtro.
- 50 **[0067]** Los medios de indexación son, por ejemplo, al menos dos orificios de diferente diámetro diseñados para cooperar con los tacos del diámetro correspondiente proporcionados en el soporte de filtro.
- 55 **[0068]** Preferiblemente, al menos una porción porosa central del filtro comprende entre 3×10^3 y 5×10^6 poros por cm² de entre 3 μm y 100 μm . Todos los valores de tamaño de poro intermedios y los subintervalos que se contemplan dentro de este intervalo incluyen 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27,5, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5 y 100 μm . Todos los intervalos y subintervalos de densidad de poros intermedia también se contemplan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^3 , 10^4 , 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^4 , 10^5 , 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^5 , 10^6 y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^6 poros/cm².
- 60 **[0069]** Preferiblemente, el módulo de filtración comprende también al menos un tapón para cerrar la abertura superior de un compartimento.
- [0070]** Preferiblemente, el bloque de cámara comprende, en su parte inferior, un borde que se extiende hacia el exterior y que coopera con al menos un pasador del ensamblaje permitiendo que el filtro esté agarrado entre el soporte del filtro y el bloque de cámara, comprendiendo el pasador del ensamblaje un extremo rompible que se extiende por encima del borde

del bloque de cámara.

[0071] Preferiblemente, todas sus partes están hechas de materiales adecuados para una operación de esterilización o diseñados para hacerlos libres de ARNasas, ADNasas o proteinasas.

5

[0072] Por último, la solicitud describe un soporte de módulo de filtración para retener un módulo de filtración en una máquina de filtración, que comprende al menos una leva que puede moverse entre una posición abierta y una posición de agarre, diseñada para ejercer presión sobre el filtro entre el soporte de filtro y el bloque de cámara.

[0073] Preferiblemente, se diseña al menos una leva de modo que, si el módulo de filtración comprende al menos un pasador de fijación, un extremo del cual es rompible, se corta el extremo de al menos un pasador de fijación cuando se aplica presión al filtro mediante al menos una leva.

[0074] El bloque de soporte forma parte de una máquina de filtración.

[0075] Preferiblemente, el módulo de filtración comprende también un medio diseñado para cooperar con un medio complementario en un bloque de soporte, a fin de imponer la orientación del módulo de filtración en relación con el bloque de soporte, y el bloque de soporte comprende un medio diseñado para cooperar con un medio en un módulo de filtración, a fin de indexar la orientación del módulo de filtración en relación con el bloque de soporte.

[0076] El procedimiento para aislar partículas biológicas contenidas en un fluido consiste en filtrar el fluido en un filtro con características adecuadas para la naturaleza de las partículas a aislar. Las partículas biológicas pueden ser células, glóbulos rojos, agregados de plaquetas, fibrinas o residuos de tejido. El fluido filtrado es en particular un fluido obtenido a partir de una muestra de fluido biológico que puede haber sido sometido a tratamiento previo para facilitar el aislamiento mediante el filtrado de operación. Esta operación previa, que se describirá en más detalle más adelante, comprende, en general, en particular, cuando las partículas a aislar son células, una o una pluralidad de las siguientes operaciones: tratamiento químico diseñado para preenriquecer la célula a aislar, dilución, tratamiento químico diseñado para facilitar la separación mediante filtración de las células a aislar.

[0077] Además de estas condiciones de preparación de muestras de fluido para el filtrado, los inventores observaron que, para lograr una buena fiabilidad en el proceso de aislamiento de células para ser detectadas, era necesario adaptar ciertas características del filtro al volumen de fluido filtrado. En particular, el filtro debe dividirse en áreas de filtración elemental que tienen cada una una superficie igual a la de un disco de diámetro de entre 0,6 cm y 3 cm, y preferiblemente mayor que 0,8 cm y aún mejor entre 0,8 cm y 1,5 cm, así como todos los valores intermedios y subintervalo de los intervalos mencionados anteriormente. Las áreas de filtración elementales pueden estar en forma de un disco, por ejemplo.

[0078] Además, la cantidad de fluido a filtrar, que debe pasar a través de cada una de las áreas de filtración elemental, debe estar entre 1 ml y 100 ml, y preferiblemente, este volumen debería ser de entre 8 ml y 15 ml. Estos intervalos incluyen todos los valores intermedios y los subintervalos de los intervalos mencionados anteriormente.

[0079] Por lo tanto, para filtrar una muestra en particular, debe usarse un dispositivo para definir un número de áreas de filtración elementales en el filtro en proporción al volumen de la muestra a ser filtrada.

[0080] En general, el volumen de la muestra a ser filtrada depende por una parte del volumen de fluido biológico que se podría tomar inicialmente, y por otra parte de una posible dilución que depende en particular de la naturaleza de las partículas biológicas a separar. El volumen tomado depende en particular de la naturaleza del fluido tomado y la edad del paciente del cual se toma el líquido. Una persona experta en la técnica sabe cómo determinar los volúmenes que deben tomarse, en función de la naturaleza del líquido tomado y del paciente del cual se toma.

[0081] La dilución depende en particular del número de partículas por unidad de volumen que se pueden encontrar en el fluido tomado. En efecto, si la filtración se lleva a cabo en condiciones satisfactorias, el número de partículas a aislar por unidad de volumen de fluido a filtrar no debe ser demasiado grande para evitar la obstrucción del filtro. Por otra parte, si el proceso está destinado a detectar células raras particulares mezcladas con un número mucho mayor de células, el número de células por unidad de volumen no debe ser demasiado pequeña, a fin de lograr una probabilidad razonable de encontrar las células buscadas en el filtro. Un experto en la técnica también sabe cómo determinar estas tasas de dilución en función de la naturaleza del fluido en cuestión y el tipo de célula buscada.

[0082] Si el fluido biológico tomado es la sangre, la cantidad tomada es generalmente de entre 1 ml y 20 ml, y la sangre se diluye en una proporción que varía de 1 en 5 a 1 en 20 para obtener una muestra de fluido para filtrar que, en estas condiciones, se filtra sobre una a 20 áreas de filtración elemental. Estos valores incluyen todos los valores intermedios y subintervalo de los intervalos mencionados anteriormente.

60

- [0083] Las células que pueden ser buscadas son en particular células raras, tales como las células tumorales.
- 5 [0084] Antes de la filtración, las células pueden preenriquecerse mediante tratamiento del tipo de gradiente de densidad o por lisis de las células que no son de interés, o mediante procedimientos inmunomediados, mediante cribado positivo o negativo, mediante la estimulación de las células buscadas para proliferar, etcétera
- 10 [0085] Esta lista no es limitativa, y un experto en la materia sabe cómo elegir un proceso de preenriquecimiento adecuado a la naturaleza de las células que él o ella busca aislar.
- [0086] Al igual que el tratamiento de preenriquecimiento, la muestra de fluido que contiene células se pueden tratar mediante un reactivo de acuerdo con la naturaleza de las células buscadas para facilitar la separación mediante operación de filtración.
- 15 [0087] El objetivo del tratamiento puede ser para lisar glóbulos rojos y anticoagular la sangre si la muestra biológica contiene sangre, y consiste, por ejemplo, en la adición de saponina y EDTA.
- [0088] El objetivo del tratamiento también puede ser para fijar las células nucleadas, por ejemplo mediante la adición de formaldehído, si la filtración pretende aislar células fijadas. En este caso, el objetivo del tratamiento es hacer posible el enriquecimiento.
- 20 [0089] Si la filtración está destinada a aislar las células no fijadas, la muestra biológica puede tratarse con un reactivo y en condiciones adecuadas para hacer temporalmente que las membranas biológicas sean rígidas (por ejemplo, por la adición de polisacárido, DMSO, por el frío, etc...).
- 25 [0090] Un experto en la materia sabe cómo elegir el procedimiento más adecuado, de acuerdo con la naturaleza de las células buscadas.
- [0091] La muestra biológica que puede haber sido diluida, preenriquecida o tratada con un reactivo para permitir la filtración adaptada a la fin que se persigue, se filtra luego a través de un filtro de policarbonato o un material equivalente que tiene poros calibrados de un tamaño entre 1 μm y 100 μm y adaptados a la naturaleza de las partículas a separar. Todos los valores intermedios y los subintervalos se contemplan dentro de este intervalo que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 27,5, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5 y 100 μm . Este tamaño es preferiblemente de entre 3 μm y 25 μm , y es de aproximadamente 8 μm , por ejemplo, particularmente si se aíslan células tumorales o células epiteliales.
- 30 [0092] La densidad de poros se adapta a la naturaleza de las partículas a separar. Preferiblemente, la densidad de poros del filtro es de entre 5×10^3 y 5×10^6 poros/cm² y aún mejor entre 5×10^4 y 5×10^5 poros/cm². Todos los valores intermedios y los subintervalos dentro de estos intervalos se contemplan, así como los siguientes valores específicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^3 , 10^4 , 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^4 , 10^5 , 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^5 , 10^6 y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9×10^6 poros/cm².
- 35 [0093] La filtración se lleva a cabo preferiblemente mediante reducción en la presión de entre 0,05 bar y 1 bar, y preferiblemente de aproximadamente 0,1 bar. Todos los valores intermedios y los subintervalos de este intervalo se contemplan incluyendo 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90 y 1,0 bar. La filtración puede estar asistida por un ligero aumento de la presión sobre el fluido situado por encima del filtro. Sin embargo, este aumento de la presión debe ser inferior a 1 bar. Estas condiciones son particularmente adecuadas para la separación de células.
- 40 [0094] El procedimiento se puede usar para diferentes objetivos, por ejemplo para buscar células raras en suspensión en un fluido biológico, a fin de permitir el diagnóstico o para purificar un fluido para permitir el análisis en buenas condiciones de los elementos en solución.
- 45 [0095] Si el proceso se utiliza para buscar células y analizarlas, después de la filtración, el filtro que se ha utilizado para filtrar el fluido se recupera asegurando que las áreas de filtración están claramente identificadas y que se pueden relacionar estas áreas de filtración y la muestra que se filtró. El filtro se utiliza a continuación para analizar las células que pueden haberse recuperado en las áreas de filtración.
- 50 [0096] Estos procedimientos de análisis, que son conocidos per se, son, por ejemplo de los siguientes tipos: tinción citológica (hematoxilina, eosina, etc.), inmunomarcaje (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia) PNA, FISH, PRINS, PCR in situ u otro técnica molecular, espectrofotometría, microdissección por láser seguido por análisis moleculares
- 55
- 60

dirigidas en el ADN (extracción de ADN, genotipificación, PCR cuantitativa, análisis de mutación, CGH (hibridación genómica comparativa)) ARN (extracción y análisis por PCR de los transcritos, PCR cuantitativa) y proteínas (extracción de proteínas, microsecuenciación, etc.).

5 **[0097]** Los análisis moleculares se pueden realizar en células enriquecidas mantenidas en el filtro y transpuestas sobre un portaobjetos por una técnica similar a la técnica de Southern, microdisecionadas individualmente del filtro o del portaobjetos de acuerdo con criterios definidos (características morfológicas de la las células con o sin marcado de diferentes naturalezas) y sometidas a análisis molecular individual o agrupadas.

10 **[0098]** Las células también pueden ser separadas del filtro por lavado con un tampón apropiado para extraer y analizar su ADN, ARN y proteínas.

[0099] Los elementos aislados por filtración se examinan a continuación con un microscopio y el análisis de las imágenes obtenidas en el filtro puede llevarse a cabo manualmente o por medios automatizados, en particular mediante el uso de
15 equipos de análisis de imágenes.

[0100] El proceso puede también usarse para purificar un fluido biológico, tal como la orina que contiene en solución el ADN, ARN o proteínas que se van a analizar. El propósito de purificar el fluido es eliminar todas las partículas biológicas presentes en el fluido que podrían interferir con el análisis. En este caso, los filtros no se mantienen y es el fluido filtrado el que se analiza.
20

[0101] Este procedimiento de filtración y los procedimientos de preparación y análisis de muestras pueden usarse como se ha indicado anteriormente, en particular, para fines de diagnóstico para detectar patologías asociadas con la presencia de células particulares posiblemente en cantidades extremadamente pequeñas. En particular, el proceso se puede utilizar
25 para detectar células cancerosas que pueden haber sido liberadas en la sangre de un paciente durante una operación quirúrgica. Una persona experta en la técnica sabe qué células se pueden buscar para detectar una patología particular.

[0102] Soporte. Un soporte puede representar un soporte sólido no poroso, tal como un portaobjetos o una placa de Petri o un pocillo de cultivo o cualquier otro soporte de vidrio o de plástico o cualquier material sólido que pueda ser utilizado como un soporte de células para el cultivo, el tratamiento o análisis de cualquier tipo: análisis citomorfológico, inmunomarcaje, análisis moleculares in situ, que comprende análisis de proteína, ARN o ADN, y la recogida de las células para los análisis moleculares, que comprenden análisis de proteínas, ARN o ADN.
30

[0103] Filtración. La filtración de una muestra biológica para extraer, aislar, purificar o concentrar células raras, se lleva a cabo mediante el uso de manera no exclusiva de una membrana de policarbonato, PET (tereftalato de polietileno) o de otro material, que tiene el tamaño y la densidad de poros adaptados a la extracción o aislamiento de células raras definidas y mediante el uso de la depresión aplicada debajo del filtro para aislar o extraer células raras.
35

[0104] La extracción de las células por filtración vertical de una muestra biológica permite ponerlas en capas y que estén disponibles para análisis posteriores, tales como para la detección y la caracterización y el diagnóstico de células raras. El aislamiento de células por filtración vertical de una muestra biológica permite aislar células raras de células más pequeñas con el fin de enriquecerlas y hacerlas disponibles para análisis posteriores, tales como para la detección, caracterización y/o el diagnóstico de células raras. Típicamente el aislamiento de células raras por filtración de la sangre permite separar la mayor parte de los neutrófilos y linfocitos maduros y eritrocitos (eritrocitos que no contienen núcleo, por tanto no se consideran verdaderas células y generalmente se lisan antes de la filtración) que son las células más pequeñas del cuerpo, ya que su tamaño es de 6 a 9 µm, y retener en el filtro células más grandes que los neutrófilos y los linfocitos maduros incluyendo linfocitos activados, monocitos, macrófagos, células madre, células tumorales, células cancerosas, microémbolos tumorales, células endoteliales maduras e inmaduras, células epiteliales, células mesenquimáticas distintas de los neutrófilos y linfocitos maduros, melanocitos mieloblastos, promielocitos, megacarioblastos, megacariocitos y en general todas las células del cuerpo que no son neutrófilos y linfocitos maduros. Además, el aislamiento de células raras por filtración de la sangre también permite recoger, en el otro lado del filtro, el plasma y los leucocitos u otros componentes de una muestra biológica distinta de las células raras aisladas por filtración. El plasma contiene ADN y ARN libre, y proteínas incluyendo ADN tumoral y ARN tumoral libre, y microARN tumoral y proteínas en pacientes con cáncer, e incluyendo ADN libre fetal, ARN fetal y proteínas en mujeres embarazadas. El término "libre" indica "fuera de las células", por lo tanto, los ácidos nucleicos libres en plasma. El ADN tumoral libre se utiliza para el diagnóstico de mutaciones tumorales en pacientes con cáncer y ADN fetal libre se utiliza para el diagnóstico prenatal de aneuploidías y otros trastornos genéticos, sexo fetal, estado de RhD, pruebas de paternidad. La recogida de los leucocitos al mismo tiempo que las células raras y el plasma puede ser útil para analizar y obtener información acerca de los antecedentes genéticos del individuo. Se espera que el ADN y/o ARN tumoral libre y/o proteínas derive de células tumorales probablemente apoptóticas lisadas de la masa tumoral y/o metástasis tumorales y/o compartimiento de células tumorales circulantes. El análisis de ADN y/o ARN tumoral libre y/o proteínas se lleva a cabo mediante la extracción de ADN y/o ARN
40
45
50
55
60

- y/o proteínas a partir de plasma y la busca de mutaciones mediante análisis moleculares. Por ejemplo, un rápido análisis de la presencia de mutaciones K-Ras en pacientes con cáncer de pulmón se puede realizar mediante la extracción de ADN libre de plasma y la búsqueda de moléculas mutadas de K-Ras por PCR, CastPCR, PCR en frío, PCR digital y otras pruebas moleculares dirigidas. Así, el análisis de mutaciones de K-ras en las células tumorales circulantes puede asociarse con el análisis de mutación de KRas en el ADN de plasma. Además, el estudio puede comenzar con la búsqueda de la mutación de KRas en el plasma, que es menos costoso, y si no se encuentra la mutación, se puede seguir con la búsqueda de la mutación de KRas en las células tumorales circulantes, que es más caro.
- [0105]** En casos específicos, también puede ser útil obtener al mismo tiempo la información sobre las moléculas mutadas o infecciosas en células raras, moléculas mutadas o infecciosas en plasma, y sobre la característica genómica del individuo. En este caso, la recolección de plasma y los leucocitos después de la filtración para aislar células raras circulantes es extremadamente útil. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de origen genético, será útil buscar una mutación, tal como BRCA1 o BRCA2, en las células tumorales circulantes, en el plasma y en los leucocitos.
- [0106]** Estos ejemplos no son excluyentes. En general, la posibilidad de aislar células raras circulantes y al mismo tiempo recoger plasma y leucocitos para el análisis inmediato o para almacenamiento y análisis futuro tiene un alto potencial y valor en la medicina personalizada no invasiva.
- [0107]** La adaptación del tamaño de los poros del filtro a las muestras biológicas a filtrar permite aislar selectivamente las células de tamaño discriminante, por ejemplo, microémbolos tumorales y sincitiotrofoblastos, grupos de células y células multinucleadas, y el material celular que tiene un tamaño más grande que las células individuales, por lo tanto aislar eficientemente dicho material a partir de sangre con alta pureza (contaminación baja o ausente de leucocitos y otras células más pequeñas) por filtración utilizando poros más grandes de 20-25 μm de diámetro, eliminando así por filtración todos los leucocitos y eritrocitos.
- [0108]** Por analogía, mediante el estudio del tamaño particular de células tumorales de un tipo de tumor determinado y/o en un paciente determinado, y/o mediante el estudio del tamaño particular de ciertas células raras a aislar, es posible adaptar el tamaño de poro, densidad de poros y otras características químicas o físicas del filtro para maximizar la recuperación y la pureza del tumor aislado y/o células raras. Por ejemplo, el tamaño de las células fetales puede variar de 10 a 30 micras. El tamaño de los sincitiotrofoblastos es generalmente mayor que 100 micras. El tamaño de las células endoteliales maduras, que no son células redondas, sino alargadas, es de alrededor de 40 o 50 micras por 10 a 20 micras. Por lo tanto, el intervalo de tamaño de poros de interés es entre 5 micras y 30 micras y el tamaño de los poros más grande permite la eliminación de todos los leucocitos. De hecho, los leucocitos de mayor tamaño, que son los macrófagos y monocitos, tienen un tamaño que generalmente no es mayor que 20 micras. El tamaño de los poros tiene que ser adaptado muy de cerca a la densidad de los poros, y estar en un intervalo de 0,5 a 2,0 E5 poros por cm^2 ya que el material de filtro suficiente tiene que estar entre los poros para permitir la recogida de células raras.
- [0109]** Tamaño de células tumorales. Las células tumorales, por definición, no son "células en reposo", ya que producen proteínas y pueden proliferar, así su cromatina está abierta y nunca compactada como la cromatina de leucocitos maduros como los linfocitos maduros y neutrófilos maduros, que son los leucocitos mayoritarios (en número) y son por lo tanto más pequeños que las células tumorales. El tamaño de las células tumorales individuales puede variar de 10 micras a 50 micras o más, dependiendo del tipo de células tumorales. Ej. Tamaño de las células tumorales de carcinoma de células pequeñas de pulmón (SCLC): 1,5 a 3 veces el tamaño de los linfocitos (12 a 24 micras), el tamaño de las células tumorales de carcinoma de células no pequeñas de pulmón (NSCLC): más de 3 veces el tamaño de linfocitos (24 micras). Tamaño de microémbolos tumorales es generalmente mayor que 100 micras.
- [0110]** Ventajas de filtración. La extracción o aislamiento de células raras mediante filtración tiene varias ventajas sobre otros procedimientos de extracción/aislamiento:
- [0111]** Se permite el aislamiento de células raras con muy alta sensibilidad, incluyendo la recolección de una célula rara individual que puede ser enriquecida antes de la filtración en un ml de sangre, de este modo se mezcla con varios millones de leucocitos y varios billones de eritrocitos.
- [0112]** Se permite la extracción o aislamiento de células raras independientemente de los antígenos expresados por las células raras, evitando así el sesgo de aislamiento que conduce a la pérdida de células raras.
- [0113]** Se facilita el multianálisis de células raras, incluyendo análisis morfológico, inmunomarcaje, análisis moleculares in situ y análisis moleculares sin interferencia de otras células no raras.
- [0114]** Se permite modular la pureza de las células raras aisladas, que hace más fáciles sus múltiples análisis, incluyendo análisis morfológico, inmunomarcaje, análisis moleculares in situ y análisis moleculares sin interferencia de otras células

no raras.

[0115] Se permite recoger las células raras individualmente, como células individuales o grupos de células individuales, o como células mezcladas con células raras no residuales para análisis moleculares adicionales.

[0116] Se acelera la detección y recuento de las células raras mediante la eliminación de los millones de pequeños leucocitos y billones de eritrocitos

[0117] Se permite extraer o aislar células fijadas o frescas para otros análisis.

[0118] Otros modos de filtración. Se pueden emplear varios modos de filtración, siempre que se permita el aislamiento de células raras de otros tipos de células y/o en capas sobre el filtro para su posterior análisis. Por ejemplo, la fuerza para separar células raras de otros tipos de células que pasan a través de un filtro puede ser la gravedad, presión positiva o negativa, o la fuerza centrífuga.

[0119] Tratamiento previo de las muestras. Las muestras biológicas se pueden diluir y/o tratar antes y/o después de la filtración mediante los agentes utilizados para lisar los eritrocitos como saponina, cloruro de amonio, anticuerpos líticos, soluciones hipotónicas, anticoagulantes como EDTA, heparina, coumadina y otros antagonistas de la vitamina K, antagonistas del factor Xa, inhibidores de trombina; aspirina (ácido salicílico) y otros agentes que impiden la agregación de plaquetas (http://en.wikipedia.org/wiki/Antiplatelet_drug, consultado el 21 de mayo de, 2013), fármacos mucolíticos, y agentes de fijación (véase más adelante).

[0120] Las células raras extraídas o aisladas de muestras biológicas por filtración pueden ser células fijadas o células frescas. Las células raras fijadas o frescas extraídas o aisladas de muestras biológicas por filtración pueden ser transferidas a un soporte que comprende de manera no exclusiva portaobjetos, placa de Petri, pocillo o micropocillo o tubo de ensayo u otro soporte para el análisis, análisis moleculares o cultivo. La transferencia de células desde el filtro a un soporte se puede obtener mediante el uso de medios de recolección y/o separación y/o tampones. Por ejemplo, a fin de transferir todas las células desde el filtro a un portaobjetos o a un soporte sólido y evitar la pérdida de células raras, es posible utilizar portaobjetos adhesivos disponibles comercialmente, tales como SuperFrost Ultra Plus® slidesor Clearcell® y Adcell® BioAdhesion Slides y/o para tratar el filtro antes de la filtración con agentes que evitar que se adhieran las células al filtro con agentes de siliconado, como Sigmacote® o similar. Con el fin de transferir todas las células recogidas en el filtro a un portaobjetos o a cualquier otro soporte y para evitar la pérdida de células raras, también es posible ayudar a la transferencia con soluciones que han de aplicarse a la parte posterior del filtro, de este modo la cara que no se adhiere a las células, y creando un flujo de tampón a través de los poros hacia la superficie sólida que separará las células del filtro, de modo que puedan adherirse al portaobjetos u otro soporte sólido. Este proceso de transferencia de células y células raras recogidas en un filtro a un portaobjetos u otro soporte sólido también se puede mejorar mediante el uso de aire positivo y/o presión de líquido aplicada a la parte posterior del filtro: aire y/o líquido pasarán a través de los poros y ayudarán a las células a ser transferidas al portaobjetos u otro soporte sólido. Todos estos protocolos para separar las células y las células raras del filtro y transferirlas a un portaobjetos o soporte sólido funcionarán mejor si no se secan las células en el filtro, por lo tanto si la transferencia se lleva a cabo poco después de la filtración.

[0121] La extracción o aislamiento de células fijadas por filtración se lleva a cabo mediante la fijación de éstas antes de la filtración usando agentes de fijación que comprenden de manera no exclusiva formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído, RCL2, mercuriales como B5 y fijador de Zenker, alcohol metílico y alcohol etílico, picratos como solución de Bouin, fijador de Rigaud etc.

[0122] Las células raras frescas extraídas o aisladas de muestras biológicas por filtración se pueden fijar después de la filtración usando agentes de fijación que comprenden de manera no exclusiva formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído, RCL2, mercuriales como B5 y fijador de Zenker, alcohol metílico y alcohol etílico, picratos como solución de Bouin, fijador de Rigaud, etc.

[0123] Cultivo de células raras. Las células raras extraídas o aisladas de muestras biológicas pueden cultivarse a fin de aumentar su número y facilitar su detección y/o diagnóstico y/o caracterización. El protocolo de cultivo puede incluir medios para estimular preferentemente el crecimiento o células raras en comparación con el crecimiento de células no raras con el fin de aumentar la pureza de las células raras. Los medios para estimular preferentemente el crecimiento de células raras en comparación con el crecimiento de células no raras comprenden de manera exclusiva factores de crecimiento específicos y/o agentes estimulantes del crecimiento de células raras, cocultivo de células raras con otros tipos de células y/o el uso de capas de alimentación que ayudan al crecimiento de células raras, y medios para bloquear el crecimiento y/o supervivencia de las células no raras, tales como anticuerpos inhibidores, bloqueadores del ciclo celular, factores proapoptóticos, siARN, y fármacos de cualquier tipo que reconocen específicamente células no raras con el fin de obtener el bloque de su crecimiento y/o su eliminación.

5 **[0124] Caracterización de células raras.** La detección y/o diagnóstico y/o caracterización de células raras pueden obtenerse a través de análisis citomorfológico y/o inmunomarcaje y/o análisis moleculares. El análisis citomorfológico y/o inmunomarcaje se llevan a cabo in situ en células intactas, es decir, en células cuya membrana plasmática y/o límite citoplásmico y/o límite nuclear es reconocible.

10 **[0125]** El análisis citomorfológico de manera no exclusiva comprende tinción con hematoxilina y/o eosina, tinción de May Grunwald y/o Giemsa, tinción de Papanicolau, tinción de Feulgen y todo tipo de coloración y tinción estequiométrica con el objetivo de analizar detalles morfológicos celulares y analizar y/o cuantificar componentes celulares. El análisis citomorfológico de manera no exclusiva comprende análisis citoquímicos que de manera no exclusiva comprenden PAS, Sudán, tinción con azul Alcian, procedimientos enzimáticos y no enzimáticos capaces de revelar componentes celulares que de manera no exclusiva comprenden calcio, lípidos, polisacáridos, enzimas y otras moléculas. El inmunomarcaje de manera no exclusiva comprende componentes celulares de marcaje con anticuerpos que de manera no exclusiva comprenden anticuerpos dirigidos a antígenos epiteliales, a antígenos mesenquimales, a los antígenos específicos de órganos, a los antígenos específicos de tumores, a los antígenos específicos fetales, a antígenos específicos de células madre, a factores de transcripción, a proteínas mutadas y a cualquier proteína y/o péptido y/o componente celular cuya detección puede ayudar a la identificación celular y/o diagnóstico y/o caracterización. El inmunomarcaje comprende también de manera no exclusiva inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, PCR inmunitaria, y todos los tipos de marcaje de la estructura celular a través de anticuerpos unidos a un medio utilizado para revelar el enlace inmunológico y la diana celular.

25 **[0126]** Pueden llevarse a cabo in situ o en células intactas análisis moleculares comprenden de manera no exclusiva FISH (Hibridación Fluorescente In Situ), PRINS (marcaje imprimado in situ), TUNEL (marcaje del extremo libre por dUTP desoxinucleotidil transferasa) immunoPCR, PNA (ácido nucleico peptídico), PCR in situ y otros procedimientos que utilizan de manera no exclusiva sondas moleculares.

30 **[0127]** Se pueden realizar análisis de imágenes de células raras después de la tinción in situ y/o inmunomarcaje y/o análisis moleculares in situ y las imágenes pueden almacenarse y/o transferirse informáticamente antes de más análisis moleculares de células raras que implican la lisis celular.

35 **[0128]** Los análisis moleculares que comprenden de manera no exclusiva PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, PCR digital, Whole Genomic Amplification, secuenciación, secuenciación de alto rendimiento, Cast-PCR, PCR fría, hibridación genómica comparada (CGH), array de CGH, microarrays, análisis de metilación, análisis de polimorfismo, etc pueden realizarse en células cuya estructura ha sido alterada y/o lisada con el fin de analizar los componentes moleculares que comprenden de manera no exclusiva moléculas de ADN, ARN, microARN y proteína.

40 **[0129]** Los análisis moleculares que comprenden de manera no exclusiva PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, PCR digital, Whole Genomic Amplification, secuenciación, secuenciación de alto rendimiento, Cast-PCR, PCR fría, hibridación genómica comparada (CGH), array de CGH, microarrays, análisis de metilación, análisis de polimorfismo, etc pueden ser dirigidos a células individuales, o a grupos de células individuales o a todas las células extraídas o aisladas a través de filtración de una muestra biológica.

45 **[0130]** Los análisis dirigidos a células individuales o grupos de células identificadas de acuerdo con criterios morfológicas y/o inmunomarcaje se pueden realizar mediante el uso de microdissección por láser de la parte de filtro que contiene las células de interés, o de las células después de la transferencia a un soporte, seguido de lisis de las proteínas celulares y análisis molecular de ADN celular (ADN genómico y/o mitocondrial), ARN, microARN y moléculas de proteína. Alternativamente, las células raras extraídas o aisladas por filtración se pueden separar del filtro y las células individuales o grupos de células identificados de acuerdo con criterios morfológicos y/o inmunomarcaje pueden aislarse mediante el campo magnético (Biosistema de silicio u otros procedimientos basados en el campo magnético), o mediante micropipeteado capilar manual o automatizado. Alternativamente, todas las células extraídas o aisladas por filtración se pueden lisar en el filtro, o después de la transferencia a un soporte, mediante el uso de un tampón apropiado para llevar a cabo su análisis molecular de ADN (ADN genómico y/o mitocondrial), ARN, microARN o proteínas mediante el uso no exclusivo de PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real, PCR digital, Whole Genomic Amplification, secuenciación, secuenciación de alto rendimiento, Cast-PCR, PCR fría, hibridación genómica comparada (CGH), array de CGH, microarrays, análisis de metilación, análisis de polimorfismo, etc ..

60 **[0131] Teranóstico no invasivo.** Entre sus otros aspectos, la invención hace que sea posible aislar células tumorales circulantes de la sangre y utilizarlas para teranóstico no invasivo. Teranóstico es el uso de un resultado de diagnóstico para guiar en la prescripción de un tratamiento "dirigido" específico. Estos procedimientos aprovechan un biomarcador molecular particular que puede estar presente en células tumorales para predecir su susceptibilidad a responder o no una terapia determinada. Como las terapias contra el cáncer son costosas y a menudo tóxicas, el teranóstico es de este modo

importante para reducir al mínimo los costes de atención de la salud y la carga debido a los efectos adversos a los pacientes. Ahora se buscan biomarcadores teranósticos en tumores primarios y tejidos de metástasis. Sin embargo, se ha demostrado que las células tumorales en el tumor primario son genéticamente heterogéneas y las biopsias pueden carecer de grupos de células tumorales que llevan información genética útil para establecer tratamientos dirigidos óptimos. Las metástasis son consideradas como una mejor referencia, pero la biopsia es difícil de obtener. De hecho, las condiciones físicas de los pacientes de cáncer a menudo impiden obtener muestras de tumor primario o metástasis a través de un enfoque invasivo (cirugía o biopsia) debido a la elevada tasa de morbilidad unida a estos procedimientos invasivos. Además, las características genéticas de células tumorales pueden cambiar bajo la presión del tratamiento dirigido haciendo importante seguirlas durante el tratamiento con el fin de detectar nuevas "células tumorales mutantes" que escapan a los tratamientos dirigidos. Sin embargo, un seguimiento invasivo de las características genéticas de células cancerosas es inviable en la práctica clínica debido a la morbilidad relacionada. Por último, sería útil estudiar de forma no invasiva las características genéticas de células tumorales en ciertos pacientes con el fin de aplicar terapias dirigidas antes de la operación con la finalidad de disminuir la carga tumoral antes de la intervención y extirpar mejor el tumor.

[0132] Actualmente hay terapias dirigidas disponibles para un número de cánceres comunes (cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal etc ...) y han demostrado su eficacia en una proporción de casos. Sin embargo, en ausencia de factores predictivos demostrados de la respuesta del tumor, estas terapias costosas dirigidas se prescribirán para la gran mayoría de los pacientes con un enorme aumento de los costes relacionados sin un beneficio proporcional, o no serán prescritos, evitando que los pacientes se aprovechen de ellos.

[0133] De este modo, se espera que la implementación de biomarcadores teranósticos conduzca a mejoras terapéuticas impresionantes. Sin embargo, los análisis teranósticos dirigidos a tejidos tumorales (tumor primario, metástasis) implican procedimientos invasivos (quirúrgicos o semiquirúrgicos) que no se pueden realizar en pacientes debilitados, son muy costosos, y con frecuencia proporcionan datos incompletos. En consecuencia, el análisis de las células tumorales y microémbolos tumorales obtenidas de forma no invasiva es de suma importancia en oncología clínica.

[0134] Caracterización genética de células raras. La información sobre las características genéticas de las células tumorales se puede obtener de forma no invasiva de células tumorales circulantes (CTC), microémbolos tumorales circulantes (CTM), y células tumorales recogidas de fluidos biológicos (orinas, ascitis, esperma, líquido cefalorraquídeo (LCR), esputo, expectoración, etc.).

[0135] Los procedimientos para estudiar las características genéticas de las células tumorales varían de acuerdo a las anomalías genéticas a detectar. Pueden basarse en análisis citológico, análisis citoquímico, inmunocitoquímica, FISH, PRINS, immunoPCR, extracción de ADN y ARN y análisis específicos para genes o secuencias de interés y/o todo el exoma o toda la secuencia del genoma/transcriptoma.

[0136] Se han validado varios biomarcadores teranósticos en particular para carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de colon. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una tirosina quinasa de receptor de membrana. La sobreexpresión o hiperactividad de EGFR se encuentra en muchos tipos de cáncer. Las mutaciones de EGFR se detectan en 10% a 15% de todos los pacientes con NSCLC y en el 80% de los pacientes que clínicamente responden a los inhibidores de tirosina quinasa EGFR, tales como gefitinib (AstraZeneca) o erlotinib (Roche). Las mutaciones de EGFR conocidas incluyen mutaciones localizadas en los exones 18 a 21 del dominio de tirosina quinasa de EGFR. Estas mutaciones están bien descritas en particular en el cáncer de pulmón. Los pacientes que tienen un tumor primario con la mutación L858R o la mutación por delección del exón 19 tienen una mejor respuesta a los inhibidores de EGFR que los pacientes con tumores KRAS de tipo natural [13]. La mutación L858R y la mutación por delección del exón 19 se encuentran entre las mutaciones de EGFR más frecuentes en los tumores de pulmón con una frecuencia de aproximadamente 43% y 48% de todas las mutaciones de EGFR, respectivamente (<http://www.mycancergenome.org>, consultado el 21 de mayo de , 2013).

[0137] KRAS (también conocido como homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-ras2) codifica una GTPasa de 21 kDa localizada en la membrana interna. Esta proteína es un componente central de la vía de transducción de señal en dirección 5' del EGFR. Las mutaciones de KRAS ocurren en el 15-25% de adenocarcinoma de pulmón (<http://www.mycancergenome.org>, consultado el 21 de mayo de, 2013). Las mutaciones más frecuentes de KRAS más frecuentes mutaciones dan lugar a una activación constitutiva de la actividad quinasa de KRAS. Las mutaciones puntuales se producen en el codón 12 (82% de todas las mutaciones KRAS) y 13 (17% de todas las mutaciones KRAS) en el exón 2 del gen KRAS. Las secuenciación estándar detecta en una prueba de todas las mutaciones en los codones 12 y 13 (G12C: c34G> T, G12R: c34G> C, G12A: c35G> C, G12D: c35G> A, G12V: c35G> A, G12S: c34G> A, G13C: c37G> T, G13D: c38G> A).

[0138] Se requiere KRAS de tipo natural para la eficacia inhibitoria de EGFR en pacientes con NSCLC [13]. También se requiere KRAS de tipo natural para la eficacia de anticuerpos terapéuticos anti-EGFR (Eli Lilly, Bristol-Myers Squibb, Merck

Serono) en pacientes con cáncer colorrectal metastásico [14,15]. Las mutaciones en los codones 61 y 146 también se han descrito, pero representan una proporción menor de mutaciones de KRAS (1-4%) y su relevancia clínica sigue siendo oscura [15].

5 **[0139]** En la actualidad, los pacientes con NSCLC con mutaciones KRAS no tienen ninguna estrategia de tratamiento eficaz. Ganetespib (Synta Pharmaceuticals) es un inhibidor de molécula pequeña de la chaperona Hsp90 que está actualmente en un ensayo clínico de fase III. Un ensayo de fase 2 mostró la reducción del tumor en más del 60 por ciento de los pacientes con NSCLC con mutación de KRAS a las ocho semanas después del tratamiento con ganetespib administrado una vez por semana como una monoterapia (Asociación Internacional para el Estudio de Cáncer de pulmón, 14a Conferencia Mundial sobre el cáncer de pulmón).

10 **[0140]** Más recientemente, una alteración genómica implica los genes de la quinasa de linfoma anaplásico (ALK) (2p23) y de la proteína asociada a microtúbulos de equinodermo de tipo 4 (EML4) (2p21) se identificó en un subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón. Estos pacientes tienen una respuesta favorable excepcional a un inhibidor de ALK de molécula pequeña, Crizotinib (Pfizer) [16,17,18,19]. De hecho, Crizotinib se prueba actualmente en un ensayo clínico de fase III y los resultados preliminares de los ensayos de fase II demuestran una impresionante tasa de control de la enfermedad del 90% en tumores de pulmón con ALK reordenado [20]. Este reordenamiento se ha encontrado en 1 a 7% de NSCLC de acuerdo con la mayor parte de la serie, particularmente en adenocarcinomas de etapa tardía, sin mutaciones de EGFR y KRAS asociadas [21].

20 **[0141]** Se han validado otros dos biomarcadores teranósticos pendientes en otros tipos de cáncer. El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) es un receptor tirosina quinasa unido a la superficie de la membrana celular y normalmente está implicado en las vías de transducción de señales que conducen a crecimiento y diferenciación celular. El locus HER2 se amplifica en el 20-30% de los tumores de mama y la presencia de esta amplificación es una indicación de la respuesta del tumor a la terapia dirigida con trastuzumab (anti-HER2, Roche) [22].

30 **[0142]** Zelboraf (Roche) es un fármaco muy eficaz que ha sido recientemente aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con melanoma cuyos tumores albergan la mutación V600E del gen del homólogo B1 de oncogén viral de sarcoma murino V-raf (BRAF). Como esta mutación también está presente en el 1% de los pacientes con cáncer de pulmón, los pacientes con cáncer de pulmón pueden ser elegibles para este fármaco en el futuro. Otros biomarcadores teranósticos validados o en ensayos clínicos en curso incluyen:

- Cáncer de mama y de ovario: ER, PR, BRCA1, BRCA2
- Cáncer Gastrointestinal: c-Kit, CDC4, p53
- Cáncer de pulmón de células no pequeñas: ROS1, HER2, FGFR, PDGFRA, VEGFR, PI3K
- 35 - mTOR, MEK, STAT3, AKT, fusiones RET
- Cáncer de próstata: la recombinación TMPRSS2/ERG.

40 **[0143]** En cuanto a los análisis teranósticos no invasivos de las células tumorales, los actuales problemas no resueltos abordados por la presente invención son los siguientes:

[0144] Las células tumorales tienen que ser extraídas o aisladas a partir de muestras biológicas de una manera muy sensible, para evitar su pérdida, y con la máxima pureza, es decir, con el mínimo de contaminación de células no tumorales (para evitar resultados de falsos negativos obtenidos mediante análisis moleculares).

45 **[0145]** Además, las células tumorales obtenidas de forma no invasiva son un material raro poco representado; aún necesitan ser objeto de varios análisis y análisis moleculares con el fin de ser utilizado como prueba teranóstica no invasiva. Estos problemas no resueltos impiden el desarrollo y la aplicación generalizada de pruebas teranósticas no invasivas en oncología clínica. La presente solicitud describe una solución a los problemas mencionados anteriormente a través del proceso que implica las siguientes etapas:

- 50 (i) Filtración de la muestra biológica mediante el uso de una membrana cuyas características de material (policarbonato, PET, etc), el grosor, los tamaño de poro y la densidad de los poros están diseñados específicamente para el tipo y el número de células tumorales a aislar y al líquido biológico a tratar para aislar las células tumorales y microémbolos tumorales de forma no invasiva.
- 55 (ii) Tinción/marcaje de las células aisladas por tinción citológica, inmunotinción, FISH, Tunel, PRINS, immunoPCR, y cualquier tipo de análisis realizado sin lisis celular como prueba teranóstica
- (iii) Análisis de imágenes de células teñidas/marcadas que incluyen el rastreo y registro de alta densidad de las imágenes de células. Las imágenes pueden ser analizadas para fines de diagnóstico, almacenadas y/o transferidas informáticamente a los especialistas que ayudan en el proceso de diagnóstico.
- 60 (iv) Lisis de células frescas o fijadas redirigidas a células tumorales recogidas de forma no invasiva. La estrategia dirigida incluye una etapa de microdissección por captura láser (LCM). La LCM permite el aislamiento de células tumorales individuales (o grupo de células tumorales) después del aislamiento por filtración. Este procedimiento permite abordar el

análisis genético de ADN tumoral puro. Como las células tumorales son heterogéneas y se mezclan con células normales (en tejidos, así como en los filtros), la LCM es actualmente un procedimiento disponible para evaluar el porcentaje de CTC mutantes entre la población de los CTC. Como alternativa a LCM están los sistemas de micromanipulación, DEPArray (Silicon Biosystem) o CellCelector (ALS). Después de la lisis, las células se someten a análisis de ADN y/o ARN y/o proteínas.

(v) Lisis no dirigida de todas las células fijadas o frescas extraídas o aisladas por filtración para su análisis molecular (ARN, ADN y/o proteínas) que comprende análisis moleculares que reconocen secuencias mutadas mezcladas con secuencias no mutadas (PCR en frío, Cast PCR, etc.)

(vi) Análisis moleculares terapéuticos dirigidos a ARN, ADN y/o proteínas dirigidos a uno o varios biomarcadores o aplicados a toda la secuencia exógena o genómica.

[0146] Las ventajas de esta estrategia son las siguientes:

(a) enfoque optimizado para aislar células raras de muestras biológicas con la máxima sensibilidad y la pureza y la ausencia de sesgo de selección de células raras que pudiera derivarse de sistemas de captura a base de inmunomarcaje y/o marcadores.

(b) Posibilidad de realizar varios análisis de diagnóstico y/o pronóstico y/o terapéutico sobre las mismas células raras recogidas de forma no invasiva. Por ejemplo, en pacientes con cáncer de pulmón, será posible obtener de las mismas células tumorales recogidas de forma no invasiva los resultados del análisis ALK (FISH) y de análisis molecular KRAS y EGFR (análisis de ADN después de la lisis celular). Por ejemplo, en pacientes con enfermedades infecciosas, será posible obtener, a partir de células del sistema inmunitario, tales como linfocitos o monocitos activados y macrófagos, los resultados de análisis FISH específicos a los virus intracelulares (VIH, etc.) o agentes microbiológicos (Shigella, bacillus TBC, Leishmania, etc ..) y los resultados de ADN y/o ARN y/o el análisis de proteínas específicas para el agente infeccioso.

[0147] Por ejemplo, en mujeres embarazadas, será posible obtener de forma no invasiva, a partir de células fetales raras aisladas, los resultados de análisis citopatológico y/o inmunomarcaje y/o molecular in situ (FISH o PRINS con sondas específicas de Y) con el fin de diagnosticar la presencia de células fetales masculinas y obtener el análisis de mutaciones de ADN y/o ARN y/o proteínas realizado en células lisadas que demuestran la presencia o ausencia de moléculas mutadas, de este modo la presencia o ausencia de trastornos genéticos fetales.

(c) Posibilidad de obtener información de diagnóstico y/o pronóstico y/o terapéutico de la presencia, o ausencia, y el número de células tumorales u otras células raras extraídas o aisladas por filtración y para almacenar las imágenes de análisis citopatológico y/o inmunomarcaje y/o moleculares in situ antes de proceder a la lisis de células que permite obtener información de diagnóstico y/o pronóstico y/o terapéutico acerca de la presencia, o ausencia de mutaciones en ADN y/o ARN y/o proteínas y sobre la presencia o ausencia de moléculas de ADN y/o ARN y/o proteínas patológicas en las células raras de la muestra biológica analizada.

[0148] Por ejemplo, en pacientes con cáncer, será posible obtener a partir de las mismas células tumorales recogidas de forma no invasiva las imágenes almacenadas de los resultados de análisis citopatológico y/o inmunomarcaje y/o moleculares in situ con el fin de diagnosticar la presencia de células tumorales y caracterizarlas mediante análisis inmunológico in situ y molecular in situ y para obtener el análisis de mutaciones en ADN y/o ARN y/o proteínas realizado en células lisadas.

[0149] Estas ventajas no se proporcionan en la actualidad por ningún proceso que reconozca células raras y que comprende procesos para análisis terapéutico no invasivo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Multianálisis de células tumorales frescas, no fijadas, enriquecidas de la sangre por filtración

[0150] Filtración. Se extrajeron células tumorales frescas y enriquecidas a partir de sangre por filtración tal como se describe en la solicitud de patente publicada US-2009-0226957.

[0151] Las células extraídas, no fijadas se tiñeron para determinar su morfología y sus ácidos nucleicos se extrajeron y analizaron por RT-PCR o PCR después de la amplificación genómica completa.

[0152] Para extraer y enriquecer las células tumorales raras a partir de sangre, se diluye 20 veces una muestra de sangre usando un tampón para la lisis de glóbulos rojos. La lisis se dejó proceder durante 5 minutos a temperatura ambiente con una agitación suave.

[0153] La muestra de sangre tratada se filtró inmediatamente a una depresión de -6 mbar. La filtración se detiene antes de que sea totalmente completa de una manera en que aproximadamente 200 µl de solución permanecen en el pocillo.

- 5 [0154] El material de células tumorales frescas enriquecidas se recoge pipeteando suavemente 3 veces 1 ml de medio de cultivo celular (DMEM HEPES 1% de suero de ternero fetal).
- 10 [0155] El material recogido se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se retiró cuidadosamente. El sedimento se volvió a suspender en medio de cultivo celular.
- 15 [0156] Las células extraídas se pueden entonces cultivar usando suero de ternero fetal al 105 en DMEM. Las células extraídas o cultivadas a continuación se pueden utilizar para llevar a cabo ensayos funcionales, tales como para la prueba de proteínas secretadas, en ensayos de proliferación, o en ensayos de adhesión.
- 20 [0157] Las células tumorales individuales se pueden aislar (i) usando una (micro)pipeta en un microscopio basado en un simple criterio de tamaño de células o inmunomarcaje; o (ii) utilizando el clasificador de células, tal como el DEParray (Silicon Biosystems).
- 25 [0158] Después de aislar una sola célula, se puede proceder con el análisis molecular de los ácidos nucleicos en el nivel de ADN y/o el nivel de ARN.
- 30 [0159] Análisis de ADN. Para el análisis de ADN de células individuales frescas, la célula se lisa durante 15 minutos usando 3-10 μ l de tampón de lisis (100 mmol/L de Tris-HCl, pH 8; 400 μ g/ml de proteinasa K). La proteinasa K se inactiva a 94°C durante 15 min.
- 35 [0160] Alternativamente, la célula puede lisarse utilizando una proteinasa termoestable, tal como prepGem (ZyGEM) y su tampón asociado (tampón Gold) durante 5 min a 75°C, seguido de la inactivación durante 5 minutos a 95°C. El procesamiento aguas abajo del ADN de una célula individual fresca es idéntico al de células microdisecionadas fijadas descrito en el ejemplo X.
- 40 [0161] Análisis de ARN. Para el análisis de ARN, las células frescas o fijadas o una célula individual fresca o fijada se lisaron en un tampón que contenía Tris-HCl 400 mM pH 8, 1000 μ g/ml de proteinasa K y 2,5 U de inhibidor de ARNasa. Para la transcripción inversa, el ARN de la célula lisada se desnaturaliza durante 10 minutos a 70°C. La transcripción inversa se realiza en un volumen total de 40 μ l usando 10 unidades de MMLV, 10 unidades de inhibidor, cebadores aleatorios, dNTPs y la concentración 1X del tampón de transcripción inversa suministrado con la enzima. La reacción se incuba típicamente durante 15 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a 42°C. La enzima se inactiva a continuación durante 10 minutos a 70°C y se enfría en hielo antes de la amplificación específica de transcripción por PCR o amplificación de ADNc completo usando un kit comercial (Life Technologies, Illumina).
- 45 [0162] En un ejemplo específico, la recombinación génica de ALK se puede detectar usando ensayos Taqman (hs03654556, Hs03654557, Hs03654558, Hs03654560, Hs03654559, Life Technologies) o por PCR estándar. Para la detección de las variantes 3a y 3b del transcrito de recombinación EML4-ALK, se pueden usar los siguientes cebadores:
Cebador directo: 5'-GCATAAAGATGTCATCATCAACCAAG-3' (SEQ ID NO: 1)
Cebador inverso: 5'-TCTTGCCAGCAAAGCAGTAGTTGG-3' (SEQ ID NO: 2)
- 50 [0163] Las células tumorales se identifican mediante inmunomarcaje múltiple utilizando anticuerpos contra el marcador epitelial y/o anticuerpos contra proteínas importantes para teranóstico (HER2, ALK etc.). El análisis molecular dirigido a células tumorales circulantes se permite después de la microdisección por captura láser de una sola célula (LCM) usando una Nikon TE 2000 U (Nikon París, Francia) equipada con un módulo de corte de células (MMI, Zurich, Suiza).
- 55 [0164] Cada célula microdisecionada puede lisarse en 2 a 15 μ l de tampón de lisis (100 mmol/L de Tris-HCl, pH 8; 400 μ g/ml de proteinasa K). La proteinasa K se inactiva a 94°C durante 15 min. Alternativamente, la célula puede lisarse utilizando una proteinasa termoestable, tal como prepGem (ZyGEM) y su tampón asociado (tampón Gold) durante 15 minutos a 75°C seguido de la inactivación durante 5 minutos a 95°C.
- 60 [0165] WGA se puede realizar utilizando preamplificación de extensión del cebador (PEP) o kits comerciales (Rubicon Genomics, Sigma, Qiagen, silicio Biosystems).
- [0166] Para preamplificación de extensión del cebador (PEP) 5 μ l de una solución de 400 μ M de cebadores aleatorios (genPEP), 10 μ l de tampón de PCR 10X que contiene 15 mM de MgCl₂ (Life Technologies), 0,6 μ l de una mezcla de cuatro dNTP (cada uno a 2 mM) y 1 μ l (5 U) de Taq polimerasa (Life Technologies) en un volumen final de 60 μ l, se añaden a la célula lisada.
- [0167] Para WGA usando PicoPlex de Rubicon Genomics, se añaden primero 5 μ l de cóctel de preamplificación a la célula

lisada (volumen total 15 µl) y la preamplificación se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 **[0168]** A continuación, se añaden 60 µl de cóctel de amplificación y la amplificación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos WGA pueden ser purificados utilizando el kit Zymo Research D4014 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 **[0169]** Las amplificaciones específicas de genes se realizan en 60 µl que contiene 6 µl de Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, 1,5 a 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleótido, 0,5 µl de cebador y 2 U de Taq Gold (Life Technologies). Dos microlitros de producto PCRouter fueron reamplificados en 20 µl usando cebadores específicos de gen 'interior' y el mismo protocolo de PCR.

[0170] Utilizando productos WGA de PicoPlex, la PCR anidada puede no ser necesaria para todos los genes. Además, estos productos WGA son compatibles con secuenciación de alto rendimiento y análisis de microarrays CGH

15 **[0171]** Las secuencias de cebador y las condiciones de ciclado se indican en la siguiente Tabla 1:

Cebador	Secuencia	Condiciones específicas
KRAS OUT directo	AAAAGGTTACTGGTGGAGTATTTGA (SEQ ID NO: 3)	Hibridación a 58°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2 mM
KRAS OUT inverso	TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC (SEQ ID NO: 4)	
KRAS IN directo	GTATTAACCTTATGTGTGACA (SEQ ID NO: 5)	Hibridación a 58°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2 mM
KRAS IN inverso	GTCCTGCACCAGTAATATGC (SEQ ID NO: 6)	
BRAF OUT directo	TTAGATCTCTTACCTAACTCTTCA (SEQ ID NO: 7)	Hibridación a 55°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,5 mM
BRAF OUT inverso	TCAGGGCCAAAAA TTT AATC A (SEQ ID NO: 8)	
BRAF IN directo	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG (SEQ ID NO: 9)	Hibridación a 60°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,2 mM
BRAF IN inverso	CCACAAAATGGATCCAGACA (SEQ ID NO: 10)	
Exón de EGFR 19 directo	TGC CAG TTA ACG TCT TCC TT (SEQ ID NO: 11)	Hibridación a 61°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,2 mM
Exón de EGFR 19 inverso	CAG GGT CTA GAG CAG AGC AG (SEQ ID NO: 12)	
Exón de EGFR 20 directo	CAT TCA TGC GTC TTC ACC TG (SEQ ID NO: 13)	Hibridación a 55°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,2 mM
Exón de EGFR 20 inverso	TTA TCT CCC CTC CCC GTA TC (SEQ ID NO: 14)	
Exón de EGFR 21 directo	CTT CCC ATG ATG ATC TGT CC (SEQ ID NO: 15)	Hibridación a 60°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,2 mM
Exón de EGFR 21 inverso	GCTGCGAGCTGACCCAGAATGTCTGG (SEQ ID NO: 16)	
VHL-Exón 1 parte 1 directo	GCGCGTTCCATCCTCTAC (SEQ ID NO: 17)	Hibridación a 55°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,5 mM
VHL-Exón 1 parte 1 inverso	GGCCTCCATCTCCTCCTC (SEQ ID NO: 18)	
VHL-Exón 1 parte 2 directo	GAGTACGGCCCTGAAGAAGA (SEQ ID NO: 19)	Hibridación por "touch down" (65-60°C) durante 30 segundos MgCl ₂ 2,5 mM
VHL-Exón 1 parte 2 inverso	CCGTGGAAGTTGAGCCATAC (SEQ ID NO: 20)	
VHL-Exón 1 parte 3 directo	GCCGAGGAGGAGATGGAG (SEQ ID NO: 21)	Hibridación a 54°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,5 mM
VHL-Exón 1 parte 3 inverso	GCTTCAGACCGTGCTATCGT (SEQ ID NO: 22)	
VHL-Exón 2 directo	ACCGGTGTGGCTCTTTAACA (SEQ ID NO: 23)	Hibridación a 56°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,5 mM
VHL-Exón 2 inverso	TCCTGTACTTACCACAACAACCTT (SEQ ID NO: 24)	
VHL-Exón 3 directo	GCCACTGAGGATTTGGTTTT (SEQ ID NO 25)	Hibridación a 58°C durante 30 segundos MgCl ₂ 2,5 mM
VHL-Exón 3 inverso	CAAAGCTGAGATGAAACAGTG (SEQ ID NO: 26)	

20 **[0172]** Después de la PCR específica de gen, el estado mutacional del gen se determina mediante secuenciación tradicional, análisis de fragmentos, ensayos de SNP (ensayos Taqman), PCR en frío, cast-PCR o análisis HRM.

[0173] El análisis molecular también se puede realizar sin microdissección por captura láser después de la lisis de todas

las células presentes en un punto de filtración. El enriquecimiento en células raras y la pureza se pueden mejorar usando filtros con tamaño de poros y densidad de poros adaptados para aumentar la pureza de las células raras definidas.

5 [0174] El ADN de la célula tumoral mezclado con ADN de tipo natural de leucocitos se recoge después de la lisis de proteínas en un volumen de al menos 45 µl. El ADN extraído se puede dividir en varias reacciones WGA o purificarse y utilizarse para una reacción WGA.

10 [0175] En cuanto a las células individuales, WGA se puede realizar utilizando Primer Extension Preamplication (PEP) o kits comerciales (Rubicon Genomics, Sigma, Qiagen, Silicon Biosystems).

[0176] Después de WGA, los ensayos específicos de mutación de genes sensibles se pueden utilizar para evaluar la presencia de ADN mutado entre ADN no mutado. Esto se puede conseguir utilizando diferentes procedimientos, tales como PCR digital, PCR en frío o cast-PCR.

15 [0177] En el caso de Cast-PCR, se pueden utilizar 2 µl de ADN de WGA purificada (aproximadamente 20 ng de ADN) en una reacción típica de fundido con 20 µl.

Ejemplo 2: Caracterización genética de células tumorales circulantes y detección de una mutación teranóstica en las células tumorales circulantes:

20 [0178] Cáncer de pulmón. Según un modo preferido de ejecución, las células raras se pueden aislar de sangre de pacientes con cáncer de pulmón mediante filtración, las células tumorales se pueden identificar entre las células raras aisladas mediante análisis citomorfológico y se caracterizan mediante anticuerpos específicos de ALK y sondas moleculares.

25 [0179] Reordenamiento de gen *ALK*, un análisis comparativo de las células tumorales circulantes y tejido tumoral de pacientes con adenocarcinoma de pulmón

30 [0180] El objetivo de este trabajo descrito a continuación es 1) para evaluar el estado de ALK en CTC con criterios citopatológicos malignos aislados por ISET en 87 pacientes con adenocarcinomas de pulmón y, 2) para comparar el estado de ALK encontrado en CTC y en el tejido tumoral correspondiente. Para este propósito, se utilizó un ensayo basado en una doble estrategia de inmunquímica y FISH para reordenamiento del gen *ALK* y se aplicó a las CTC y las correspondientes muestras de tejido tumoral.

35 Pacientes y muestras

[0181] En un estudio anterior utilizando el procedimiento ISET para los pacientes sometidos a cirugía para el NSCLC, se detectaron CTC con características malignas citomorfológicas en 76/208 (37%) de los casos [15].

40 [0182] Para el presente trabajo los inventores seleccionaron de esta última población 40 casos con un adenocarcinoma primario. Además, 47 pacientes con adenocarcinoma de pulmón incluidos en el estudio entre mayo y diciembre de 2011 tenían CTC con características malignas. Entre estos 87 pacientes, 34 tenían muestras de sangre (10 ml) recogidas y tratadas por ISET mediante el uso de un tampón de fijación (que contiene un agente de fijación de células) y como se describe en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos 2009-0226957 en diferentes momentos: antes de la cirugía, y a los 7 y 15 días después de la cirugía. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en este estudio. Las principales características clinicopatológicas de los 87 pacientes seleccionados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Datos clinicopatológicos principales de los 87 casos incluidos en este estudio

<u>Parámetros clínicos y patológicos</u>	<u>Número de pacientes (%)</u>
Global	65 (100)
Edad (años)	
Promedio	66
Intervalo	37-85
Género	
Masculino	41(63)
Femenino	24 (37)
Exposición a tabaco	

(PY)		
	Número	53 (81)
Promedio		38,2
Intervalo		0-152
Tamaño del tumor		
	Promedio	3,9
	Intervalo	0,4-18
Histología		
	Adenocarcinoma invasivo (ADC)	65 (100)
	ADC predominante acinar	33 (51)
	ADC predominante papilar	21 (32)
	ADC predominante micropapilar	4 (6)
	ADC predominante lepidico	4 (6)
	ADC predominante sólido con producción de mucina	3 (5)
Número de CTC		
	> 50 CNHC-MF (intervalo 51-500)	28 (43)
	< 50 CNHC-MF (intervalo 51-500)	37 (57)
Fase de pTNM		
	I	30 (46)
	IA	12
	IB	18
	II	16 (25)
	IIA	9
	IIB	7
	III	14 (21)
	IIIA	12
	IIIB	2
	IV	5 (8)
Expresión de antígeno de TTF1		44 (67)
Terapia con neoadyuvante		14 (21)
TNM: Metástasis de nódulo tumoral PY: paquetes al año CNHC-MF: células no hematológicas circulantes con características malignas		

5 **[0183]** Los tumores se clasificaron según la clasificación de 7ª pTNM y la última clasificación histológica de los adenocarcinomas de pulmón [26, 27]. El análisis FISH se realizó en las muestras tumorales utilizando una sonda de rotura para el gen *ALK* (Vysis LSI *ALK* Dual Color, Abbott Molecular, Abbott Park, IL) (datos complementarios). Para interpretarse adecuadamente, los núcleos de las células tumorales deben tener al menos una señal de colocalización. Para ser considerado como reordenado en *ALK*, al menos el 15% de los núcleos de las células tumorales interpretables debe albergar un patrón de hibridación de sonda anormal [28]. La inmunohistoquímica (IHC) se realizó sobre secciones desparafinizadas utilizando un anticuerpo primario contra la proteína *ALK* (1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, Reino Unido) incubado durante 45 minutos a temperatura ambiente (datos complementarios). El análisis de la mutación dirigida de, i) los puntos claves de mutación de *EGFR*, ii) puntos claves de mutación de *KRAS*, y iii) mutaciones de *BRAF*, se llevó a cabo a partir de ADN extraído de secciones de tejido congeladas de tumores mediante pirosecuenciación, tal como se describe anteriormente [29, 30] (datos complementarios).

15 Inmunocitoquímica (ICC) e hibridación fluorescente in situ (FISH) en los filtros ISET.

20 **[0184]** ICC y FISH se realizaron sobre CTC aisladas por el procedimiento ISET en puntos sin teñir de los filtros correspondientes que contienen CTC con características malignas detectadas por tinción con MGG en 6 puntos [15]. Dos puntos se utilizaron para ICC y dos puntos se utilizaron para FISH por filtro. Para ICC, los puntos se incubaron con un anticuerpo primario contra la proteína *ALK* (1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se visualizaron con 3,3'-diaminobenzidina, seguido de contratinción con hematoxilina. La tinción citoplasmática se consideró positiva para *ALK* [30] (datos complementarios). La FISH realizada en dos o más puntos utilizó una sonda de separación por rotura para el gen *ALK* (Vysis LSI *ALK* Dual Color, Abbott Molecular, Abbott Park, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células que muestran señales de división o señales 3' solas se consideraron positivas para reordenamiento de *ALK* [31]. Los filtros se examinaron de forma independiente y cegados a

datos clínicos, IHC, ICC y genotipo del tejido. Hemos probado la reproducibilidad de los resultados de ICC y FISH para la detección de ALK en las CTC de 102 filtros de 34 pacientes que se sometieron a muestreo de sangre antes de la cirugía, y 7 y 15 días después de la cirugía.

5 **[0185]** 14 a 500 núcleos de las células tumorales interpretables se analizaron para cada paciente. Para ser interpretado correctamente, los núcleos de las células tumorales deben tener al menos una señal de colocalización. Para ser considerado como reordenamiento de ALK, al menos el 15% de los núcleos de las células tumorales interpretables debe albergar un patrón de sondas de hibridación anormal.

10 **[0186]** La línea celular de NSCLC humano H2228 obtenida a partir de ATCC (Manassas, VA) se usó como un control positivo de reordenamiento de ALK [32]. Las células fueron cultivadas y mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, como se describe anteriormente [32]. Alrededor de 50 células se mezclaron en 10 ml de una muestra de sangre tomada de voluntarios sanos. Las muestras fueron luego filtradas utilizando el procedimiento ISET, como se describe anteriormente [23]. Se realizaron entonces FISH utilizando una sonda de rotura e ICC con anticuerpos anti-ALK como se describe anteriormente.

15 **[0187]** La inmunotinción positiva ALK se encontró en cinco tumores correspondientes a los adenocarcinomas con una estructura predominante sólida con producción de mucina. Estos cinco casos mostraron una fuerte tinción citoplasmática positiva (puntuación 3+) para todas las células tumorales, tal como se define anteriormente, con refuerzo de membrana en un par de células [31]. El análisis FISH realizado en el mismo bloque de parafina en secciones en serie, mostró adenocarcinomas reordenados de ALK. Los otros 82 tumores fueron negativos para la inmunotinción de ALK y para reordenamiento de ALK utilizando análisis de FISH. Diez tumores (12%) estaban mutados en EGFR (mutaciones 1 exón 18, 6 exón 19, y 3 exón 21) y 20 casos (24%) mutados en KRAS (18 codón 12 del exón 2 y 2 codón 13 del exón 2). La mutación BRAF no se detectó. Los cinco tumores reordenados de ALK eran EGFR, KRAS y BRAF de tipo natural.

20 **[0188]** Se halló inmunotinción positiva de ALK en las CTC aisladas en cinco pacientes, correspondientes a los pacientes que tenía una reordenamiento de ALK en los tumores (Figura 1A, A1 y B1, y Figura 1B). Los datos clinicopatológicos de estos cinco pacientes se detallan en la tabla 3.

25 **Tabla 3.** Datos clinicopatológicos de los casos con reordenamiento de gen ALK de FISH e inmunocitoquímica positiva utilizando un anticuerpo anti-ALK en CTC aisladas mediante el procedimiento de aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales (ISET).

NÚMERO DE CASO	1	2	3	4	5
Sexo	Masculino	Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
Edad	45 años	48 años	47 años	52 años	43 años
Estado de fumar	Nunca fumó	Nunca fumó	Nunca fumó	Nunca fumó	Nunca fumó
Etnia	Caucásica	Caucásica	Caucásica	Caucásica	Caucásica
Fase de pTNM	IIA	IIA	IIIB	IV	IV
Histología	Adenocarcinoma con arquitectura sólida	Adenocarcinoma con arquitectura sólida	Adenocarcinoma con arquitectura sólida	Adenocarcinoma con arquitectura sólida	Adenocarcinoma con arquitectura sólida
Estado para mutaciones de EGFR, KRAS, BRAF	Tipo natural	Tipo natural	Tipo natural	Tipo natural	Tipo natural
ALK FISH (tumor)	Positivo (40% de las células)	Positivo (50% de las células)	Positivo (60% de las células)	Positivo (40% de las células)	Positivo (50% de las células)
ALK IHC (tumor)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)
Número de CNHC-MF	≥ 50 células (70-90 células)	≥ 50 células (60-150 células)	≥ 50 células (70-100 células)	≥ 50 células (60-100 células)	≥ 50 células (80-120 células)
ALK-FISH (CTC)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)
ALK ICC CTC)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)	Positivo (100% de las células)
Seguimiento (5 años)	vivo (sin recaída)	vivo (sin recaída)	Fallecido	Fallecido	Fallecido
Abreviaturas: FNM = metástasis de nódulos tumorales; CNHC-MF: células no hematológicas circulantes con tumor					

5 [0189] El ICC anti-ALK utilizando el clon 5A4 mostraron una fuerte tinción citoplásmica (puntuación 3+) del 100% de las CTC con refuerzos de membrana en la mayoría de las células (Figura 1, A1 y B1, y la Fig. Figura 1B). ALK FISH era informativo en estos cinco casos (Figura 1, A2 y B2 y Figura 1B). Todas las CTC tenían patrones de señales anormales con al menos 3 señales observadas por célula en cada caso, de conformidad con la amplificación de genes o aneuploidía (Figura 1, A2 y B2, y la Figura 1B). Además, FISH confirmó la presencia de una translocación *ALK*, teniendo todos los casos una rotura de sondas 5' y 3' y múltiples señales por las células (Figura 1, A2 y B2, y la Figura 1B). Ninguno de los cinco casos tuvo pérdida de ninguna parte de la sonda de FISH. Por último, para estos cinco pacientes, las CTC teñidas con MGG mostraron CTC con características malignas, como se describió anteriormente (Figura 1, A3 y B3, y la Figura 1B) [22]. La positividad de ALK-ICC y *ALK*-FISH fue controlada para cada paciente con CNHC-MF aislado utilizando ISET a los 7 y 15 días después de la primera detección.

15 [0190] No se demostró inmunotinción positiva con el anticuerpo anti-ALK ni reordenamiento de *ALK* utilizando análisis FISH en los otros 82 seleccionados de pacientes con cáncer de pulmón que muestran CTC con características malignas en la tinción de MGG (figura 1, C1-C3). Las células H2228 reordenadas en *ALK* diluidas en muestras de sangre, filtradas por el procedimiento ISET demostraron una fuerte inmunotinción ALK positiva y translocación de *ALK* (Figura 1, D1-D3).

20 [0191] La reproducibilidad de los resultados para la detección de ALK por ICC y FISH fue probado en CTC de 102 filtros de muestras de sangre de 34 pacientes que se sometieron a muestreo de sangre antes de la cirugía, y 7 y 15 días después de la cirugía. De los 34 pacientes incluidos, 5 pacientes tenían tejido tumoral ALK positivo y 29 pacientes tenían tejido tumoral ALK negativo. Se obtuvieron consistentemente resultados positivos mediante ICC y FISH para CTC de las tres diferentes muestras de sangre obtenidas de cada uno de los 5 pacientes con tumores positivos para ALK. Los resultados negativos para ALK se obtuvieron consistentemente mediante ICC y FISH en CTC de las tres diferentes muestras de sangre obtenidas de cada uno de los 29 pacientes con tumores negativos en ALK.

25 Datos complementarios: Pacientes y muestras

30 [0192] El análisis FISH se realizó en las muestras tumorales utilizando una sonda de rotura para el gen *ALK* (Vysis LSI ALK Dual Color, Abbott Molecular, Abbott Park, IL) (datos suplementarios). Los portaobjetos se leyeron (MI, EL, CB) en un microscopio de epifluorescencia (BX51, Olympus, Tokio, Japón) usando un objetivo de 63 aumentos y las imágenes fueron analizadas utilizando el software del sistema Soft Imaging (Cell, Olympus). Los resultados se evaluaron de forma independiente cegados a los datos clínicos e inmunohistoquímicos y el genotipo. Cuando se observó una discrepancia entre los tres patólogos, los portaobjetos fueron revisados con el fin de obtener un consenso. Al menos 50 núcleos de células tumorales interpretables se analizaron para cada tumor. Para ser interpretados adecuadamente, los núcleos de las células tumorales deben tener al menos una señal de colocalización.

40 [0193] La inmunohistoquímica (IHC) se realizó en secciones desparafinizadas utilizando un anticuerpo primario contra la proteína ALK (1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, Reino Unido) incubado durante 45 minutos a temperatura ambiente. La intensidad de la tinción, así como porcentajes de células positivas se evaluó semicuantitativamente de la siguiente manera: 0 = no o tinción débil en <10% de las células tumorales; 1+ = tinción débil en > 10% de las células tumorales; 2+ = tinción moderada; 3+ = fuerte tinción. La expresión de ALK positiva se considera entre 1+ y 3+. La tinción inmunohistoquímica en muestras se evaluó de forma independiente por tres patólogos (MI, VH y PH) cegados a los datos clínicos y genotipo. Cuando se observó una discrepancia entre los tres patólogos, los portaobjetos fueron revisados con el fin de obtener un consenso.

45 [0194] El análisis de mutaciones dirigidas para, i) los puntos claves de mutación de *EGFR* en los codones 719, 768, 790, y 858 a 861, así como deleciones y mutaciones complejas en el exón 19, ii) los puntos claves de mutación de *KRAS* en los codones 12, 13 y 61, y iii) las mutaciones de *BRAF* en los codones 600 y 464-469, se llevó a cabo a partir de ADN extraído de secciones de tejido congeladas de tumores mediante pirosecuenciación, tal como se describe anteriormente [29, 30]. La amplificación por PCR se realizó utilizando los correspondientes kits TheraScreen® Pyro (kit Therascreen® EGFR Pyro®, CE-IVD, Ref 971480; kit TheraScreen® KRAS Pyro®, CE-IVD, Ref. 971460; kit TheraScreen® BRAF Pyro®, CE-IVD, Ref 971470; Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo los protocolos del fabricante. Los productos de PCR (10 µl) se procesaron en un formato de 24 pocillos para análisis por pirosecuenciación usando la PyroMark Q24 MDx Vacuum Workstation (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante estándar. La placa se transfirió directamente al sistema Q24 PyroMark (Qiagen) para la determinación de la secuencia. Los datos se analizaron de forma automática con software PyroMark Q24 (Qiagen).

50 Datos suplementarios: Inmunocitoquímica (ICC) e hibridación fluorescente in situ (FISH) en los filtros ISET

60 [0195] Para ICC, la recuperación del epítipo inducida por calor se realizó con una solución de recuperación dirigida (pH 9) (Dako, Carpintería, CA) para ALK. Los puntos se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos para

- 5 bloquear la actividad de peroxidasa endógena, seguido por lavado en agua desionizada durante 2-4 minutos. Los puntos fueron incubados con un anticuerpo primario contra la proteína ALK (1:50, 5A4; Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se visualizaron con 3,3'-diaminobenzidina, seguido de contratinción con hematoxilina. La tinción citoplasmática se consideró positiva para ALK [30]. La intensidad de la tinción, así como porcentajes de células positivas se evaluó por tres patólogos (MI, VH y PH) semicuantitativamente como se describe anteriormente. Los filtros se examinaron de forma independiente y cegados a datos clínicos, IHC y el genotipo de tejidos y células. Cuando se observó una discrepancia entre los tres patólogos, los portaobjetos fueron revisados con el fin de obtener un consenso.
- 10 **[0196]** Los inventores han demostrado, usando un ensayo de doble ICC-FISH, que el estado de ALK se puede detectar de manera no invasiva en CTC caracterizadas por un enfoque citomorfológico en un subconjunto de pacientes con cáncer de pulmón. Además, estos resultados demostraron una correlación estricta entre el estado de ALK determinado en CTC y en las correspondientes muestras de tejido tumoral en una serie de 87 pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Cinco de estos pacientes tenían características clinicopatológicas reportadas anteriormente por estar asociadas con reordenamiento del gen ALK en la población occidental y se demostró un reordenamiento del gen ALK tanto en CTC y en correspondientes muestras de tumores resecados [28]. A la inversa, las CTC con un reordenamiento de gen ALK nunca se encontraron en pacientes con un tumor sin reordenamiento de gen ALK, tal como se demuestra mediante FISH. Estudios recientes centraron su interés en la relevancia para el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón ALK-positivos, independientemente de la terapia dirigida de ALK [33-35]. Algunos de estos estudios demostraron que en pacientes no tratados con inhibidores pre-ALK, los pacientes ALK-positivos tenían una supervivencia más corta, y estaban asociados con un mayor riesgo de metástasis [33, 35]. Además, los pacientes ALK-positivos fueron más resistentes al tratamiento con inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR que los pacientes ALK-negativos [33]. Por el contrario, un estudio reciente demostró que los pacientes con adenocarcinoma de pulmón de EGFR de tipo natural ALK-positivos tenían un mejor resultado [34]. En el presente trabajo, los 5 años de seguimiento de los cinco pacientes con EGFR de tipo natural ALK positivo no mostró recurrencia para los dos pacientes en estadio II que se sometieron a la cirugía, mientras que los tres pacientes en estadio IIIB/IV murieron dentro de los 6 meses después del diagnóstico. No existe una terapia adyuvante, en particular, no se administró terapia dirigida contra reordenamiento ALK en estos pacientes.
- 15 **[0197]** Un ensayo no invasivo para detectar reordenamiento de gen ALK a través del aislamiento y caracterización de CTC se basa en consideraciones clínicas. El tratamiento con crizotinib tiene que estar restringido a los tumores con un probado reordenamiento del gen ALK, lo que implica una preselección sistemática de muestras tumorales con enfoques técnicos fiables. Sin embargo, el tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón no siempre está disponible o en una cantidad suficiente para llevar a cabo tanto el examen patológico como una lista creciente de análisis inmuno/moleculares destinados a la estratificación de pacientes para el uso de terapias dirigidas. En desacuerdo con el ADN/ARN tumoral libre en el plasma, que se puede derivar de células apoptóticas y carece de las propiedades invasivas de células tumorales, las CTC pueden representar una "biopsia líquida" y constituyen el objetivo ideal para pruebas teranósticas no invasivas.
- 20 **[0198]** Los inventores utilizaron el enfoque ISET para aislar CTC, ya que ellos y otros han demostrado que este procedimiento muestra alta sensibilidad para el aislamiento de CTC en pacientes con NSCLC [15-17]. Como se señaló anteriormente, el aislamiento de CTC por ISET depende del tamaño celular e independiente de cualquier marcador celular. Así, las células tumorales que expresan marcadores epiteliales, así como las que tienen antígenos epiteliales perdidos, debido a EMT, se aíslan eficientemente mediante ISET [17, 21, 24, 25]. Por otra parte, ICC y análisis moleculares, incluyendo FISH, se pueden desarrollar en las CTC aisladas y caracterizadas usando ISET [17, 18, 21, 23-25]. Curiosamente, se ha demostrado la reproducibilidad de los resultados para la detección de ALK por ICC y FISH en un subgrupo de 34 pacientes probados antes de la cirugía y, 7 días y 15 días después de la cirugía, e incluyendo 5 pacientes ALK-positivos para el tejido tumoral. Se obtuvieron resultados consistentes a ciegas en las tres muestras obtenidas de cada paciente. Estos resultados confirman la reproducibilidad técnica del análisis con ICC y FISH para ALK en los filtros y muestran la viabilidad de un seguimiento de la cinética en tiempo real de los pacientes mediante el análisis de CTC.
- 25 **[0199]** La evaluación fiable de reordenamiento del gen ALK en los tejidos tumorales de pulmón es reconocido como un reto diagnóstico y técnico [31, 36]. El estado de ALK en muestras de tumor puede evaluarse utilizando FISH, inmunohistoquímica y/o la reacción cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa- (RT-PCR) [31, 35-39]. FISH es el procedimiento diagnóstico utilizado como criterio de elegibilidad en los ensayos clínicos actuales con crizotinib [38]. HC con anticuerpos específicos para la proteína ALK humana (clon de anticuerpo ALK1) es de diagnóstico para un reordenamiento de ALK en un subconjunto de linfomas de células grandes anaplásico, que tiene tal sensibilidad y especificidad que las pruebas genéticas se consideran innecesarias [38]. En NSCLC, la expresión de la proteína ALK a partir del gen de ALK reordenado es menor. Sin embargo, el desarrollo y la utilización de nuevos anticuerpos específicos de ALK ha proporcionado resultados muy interesantes.
- 30 **[0200]** Los inventores han utilizado el anticuerpo anti-ALK, clon 5A4, que se ha demostrado recientemente tipifica con precisión 20/20 tejidos tumorales NSCLC [36]. En los cinco casos de ALK reordenado, se observó que no más del 50% de

5 las células tumorales era ALK-FISH positivo en el tumor, mientras que el 100% de estas células eran ALK positivo por IHC. Sin embargo, IHC para ALK fue heterogénea en ciertas áreas de los tumores, y algunas células se tiñeron solamente débilmente (1+) mientras que otras fueron fuertemente teñidas (3+). Por lo tanto, tal como se describe en un estudio reciente, una correlación entre IHC y FISH para el reordenamiento del gen ALK se puede observar en sólo algunas áreas de tumores [40], surgiendo la cuestión de una comparación mejor y más adecuada entre FISH positivo y células positivas "IHC 3+ sólo". Como datos preliminares, el presente estudio muestra que ICC realizado en CTC puede ser una herramienta prometedoras para detectar el reordenamiento de ALK, así como otras alteraciones genómicas, tales como mutaciones de EGFR. En este sentido, algunas mutaciones de EGFR se pueden demostrar mediante IHC en un subconjunto de adenocarcinomas de pulmón utilizando anticuerpos específicos [31, 41]. Podemos especular que tales mutaciones de EGFR también se podían demostrar utilizando el enfoque de CCI sobre las CTC en este subgrupo de cánceres de pulmón. Es de destacar que todas las CTC detectadas en el presente estudio fueron ALK-FISH positivo y fuertemente positivas por ICC usando un anticuerpo específico contra ALK. Las CTC que albergan esta alteración genómica específica pueden haber facilitado la migración y representan un conjunto agresivo de las células tumorales. El reordenamiento del gen ALK también puede ser detectado por RT-PCR [30, 36]. La RT-PCR es un enfoque desafiante que requiere ARN de alta calidad para proporcionar la amplificación de múltiples transcripciones con tamaños variables [36]. Por último, un enfoque de PCR cuantitativo en tiempo real ha sido recientemente desarrollado para cuantificar las transcripciones de ALK y se han obtenido resultados alentadores [36]. Los inventores no tratan de buscar el reordenamiento de ALK usando un enfoque de RT-PCR, ya que se pensaba que la cantidad y calidad del ARN que se podría extraer potencialmente de CTC aisladas por ISET no sería suficiente para la prueba, ya que el tampón comercial utilizado para la dilución de la sangre antes de la filtración contiene formaldehído. Sin embargo, esta estrategia se puede probar usando un nuevo tampón ISET desarrollado para aislar CTC frescas con sensibilidad invariable en comparación con las CTC fijadas.

10
15
20
25
30 **[0201]** El uso de pruebas basadas en CTC no invasivas puede permitir la aplicación de seguimiento teranóstico molecular a tiempo real de los pacientes para identificar potenciales nuevas alteraciones genómicas implicadas en la resistencia a las terapias dirigidas [42]. En este sentido, la aparición de la resistencia adquirida a crizotinib es un nuevo reto en la atención clínica de los pacientes con cáncer de pulmón ALK positivos [11, 43, 44]. De hecho, la nueva alteración o alternaciones genómicas se pueden producir durante la terapia con crizotinib y puede hacer que el tratamiento dirigido inicial sea ineficiente. Por lo tanto, la monitorización en tiempo real podría desarrollarse con el objetivo de detectar posibles alteraciones genómicas adicionales a través de pruebas moleculares para CTC aisladas por ISET y diagnósticamente caracterizadas por un enfoque morfológico.

35
40 **[0202]** Los inventores han demostrado la viabilidad de la detección de reordenamiento del gen de ALK en CTC aisladas por ISET y caracterizadas como las CTC con características malignas. Se encontraron resultados consistentes utilizando los enfoques moleculares ICC y FISH y, de forma importante, también se encontraron resultados consistentes en las CTC en comparación con los tejidos tumorales en los 87 pacientes ensayados. Estos resultados proporcionan un enfoque teranóstico basado en CTC para la evaluación del precribado del estado de ALK no invasivo de los pacientes con cáncer de pulmón.

40 **Ejemplo 3: Aplicación de la presente invención para el diagnóstico precoz de cánceres invasivos**

45 **[0203]** Células tumorales circulantes "centinela" permiten el diagnóstico precoz de carcinoma de pulmón en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

50 **[0204]** Se cree que las células tumorales circulantes (CTC) circulan en una etapa muy temprana en cánceres invasivos; sin embargo, nunca han sido descritos como marca distintiva de cánceres invasivos. Presentamos aproximadamente tres de cada 168 pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una afección pretumoral de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que se encontró que tenían CTC detectada por ISET (Aislamiento por tamaño de las células tumorales), una plataforma de CTC de alta sensibilidad "basada en citopatología". Un rastreo TC, realizado anualmente, detecta un nódulo pulmonar solo de 1 a 4 años después de que CTC apareciera en la sangre, lo que lleva a su resección quirúrgica y el diagnóstico patológico de NSCLC de etapa temprana. A continuación, ISET se repitió 9 o 12 meses después de la cirugía y mostró la desaparición de CTC. Estos 3 casos muestran, como una prueba de concepto, el potencial de las CTC para ser utilizadas como un indicador precoz de cáncer de pulmón invasivo en pacientes "de riesgo".

55 **[0205]** Las células tumorales circulantes (CTC) pertenecen al grupo de las "células raras circulantes" (CRC) en sangre, cuya detección puede abrir nuevos caminos en la medicina predictiva no invasiva. Las CRC no son detectables mediante los análisis detectables de sangre, ya que su nivel puede ser tan bajo como una por ml de sangre (o inferior), por lo que una célula se mezcla con un promedio de 10 millones de leucocitos y 5 billones de eritrocitos. Además, las CRC son de diferentes tipos, incluyendo CTC tanto epiteliales como mesenquimales, células epiteliales no tumorales, que se extienden mediante enfermedades inflamatorias e intervenciones iatrogénicas, células endoteliales, células madre y células fetales (en mujeres embarazadas). Por lo tanto, la detección específica de CTC implica su diagnóstico diferencial de otras CRC y

un doble desafío técnico de sensibilidad y especificidad de diagnóstico [45].

5 **[0206]** Debido a estas dificultades técnicas, los procedimientos de detección de células epiteliales circulantes, pero no de diagnóstico para CTC, se han utilizado para desarrollar marcadores de pronóstico/predictivo sobre todo en pacientes con cánceres metastásicos [46]. Sin embargo, una combinación de datos de los estudios clínicos, moleculares y en animales han demostrado recientemente que los cánceres invasivos propagan células tumorales en una etapa muy temprana de su desarrollo, lo que sugiere que un enfoque sensible y de diagnóstico para la detección de CTC podría ser de ayuda para su diagnóstico precoz [47, 48].

10 **[0207]** El cáncer de pulmón es una enfermedad agresiva y altamente invasiva. Su diagnóstico precoz es una cuestión crítica, ya que 94 millones de fumadores tienen un riesgo elevado de la enfermedad que sigue siendo la causa principal de muerte en los Estados Unidos [49]. El National Lung Screening Trial, que estudió 53.454 personas con alto riesgo de cáncer de pulmón, ha demostrado recientemente que el cribado a bajas dosis de CT se asocia con una disminución de la mortalidad por cáncer de pulmón, del 20% [49]. Sin embargo, este resultado se asoció con un impresionante 96,4% de resultados falsos positivos, ya que de los 26.309 pacientes seleccionados, 7.191 se encontraron positivos pero sólo 649 revelaron posteriormente tener cáncer de pulmón. Además, el número total de pacientes con cáncer de pulmón fue de 1.060, incluyendo 411 falsos negativos que se perdieron por el cribado de CT.

15 **[0208]** En este escenario, los inventores razonaron que el carácter altamente invasivo del cáncer de pulmón podría ser utilizado como su talón de Aquiles y permitir su diagnóstico precoz a través de la detección sensible y de diagnóstico de CTC. Por lo tanto, se utilizó ISET (Aislamiento por tamaño de las células tumorales), que es un enfoque sencillo para el aislamiento muy sensible de CTC intactas, permitiendo su diagnóstico histopatológico [46, 50, 51].

20 **[0209]** Se describen tres pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una patología que se considera un factor de riesgo para el cáncer de pulmón, que se encontró que tiene CTC en sangre años antes de la detección de tumores de pulmón mediante formación de imágenes.

25 **[0210]** Este informe muestra por primera vez en humanos que la identificación sensible y de diagnóstico de CTC proporciona una prueba prometedora para el diagnóstico precoz de cánceres invasivos

30 Informes de casos

Caso 1

35 **[0211]** En 1995, el Paciente XB, varón, 49 años de edad, se diagnosticó con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) moderada (GOLD2) basándose en pruebas de función pulmonar, FEV1 (volumen espiratorio forzado en un segundo) entre 50 y 79%, y radiografía de tórax. Él había estado fumando 45 PY (paquetes/año: 1 paquete diario de cigarrillos por cada 45 años). Catorce años más tarde (octubre de 2009), fue analizado por ISET y se encontró que tenía 67 CTC y 3 CTM (microémbolos tumorales circulantes) en 10 ml de sangre identificadas por análisis histopatológico. Un rastreo CT en espiral a baja dosis realizado en la misma fecha confirmó el diagnóstico de EPOC, pero no se presentaban nódulos pulmonares. A continuación, se planificó cada año un rastreo CT y, un año más tarde (octubre de 2010), mostró por primera vez la presencia de un nódulo pulmonar de diámetro 1,5 cm en el lóbulo inferior derecho pulmonar. La cirugía se realizó un mes después. El análisis patológico y la estadificación del cáncer revelaron una etapa de adenocarcinoma tubulopapilar IA sin diseminación a los ganglios linfáticos o metástasis a distancia (pT1aN0M0). El genotipado del tumor 40 mostró una mutación de K-Ras en el codón 12. El paciente no recibió ningún tratamiento adicional. Fue analizado mediante ISET 9 meses después de la cirugía y no se encontró ninguna CTC en su sangre.

Caso 2

50 **[0212]** Al paciente AC, varón, se le diagnosticó EPOC en 1998, a la edad de 54, basándose en pruebas de función pulmonar, FEV1 entre 30 y 49%, y radiografía de tórax. Él había estado fumando 60 PY. Once años más tarde (mayo de 2009), fue analizado por ISET y se encontró que tenía 43 CTC y 1 CTM en 10 ml de sangre, identificadas por análisis histopatológico. Un rastreo CT en espiral a baja dosis realizado en la misma fecha mostró los signos de la EPOC pero fue incapaz de detectar ningún nódulo pulmonar. A continuación, la tomografía axial computarizada se repitió cada año y 3 55 años más tarde, en septiembre de 2012, mostró por primera vez la presencia de un nódulo pulmonar de diámetro de 2,4 cm de tamaño en el lóbulo pulmonar superior izquierdo. El paciente fue sometido a una cirugía un mes más tarde. El análisis patológico y estadificación del cáncer revelaron una etapa de adenocarcinoma tubulopapilar IA sin diseminación a los ganglios linfáticos o metástasis a distancia (pT1bN0M0). El análisis del ADN del tumor mostró una mutación de K-Ras en el codón 12. El paciente no recibió ningún tratamiento adicional. Fue analizado mediante ISET 12 meses después 60 de la cirugía y no se encontró ninguna CTC en su sangre.

Caso 3

5 [0213] Al paciente BM, varón, se diagnosticó EPOC moderada (gold2) en 1999, a los 47 años, basándose en las pruebas de función pulmonar, FEV1 entre 50 y 79%, y una radiografía de tórax. Él había estado fumando 35 PY. Nueve años más tarde (febrero de 2008), fue analizado por ISET y se encontró que tenía 32 CTC y 1 CTM en 10 ml de sangre. Una tomografía axial computarizada realizada en la misma fecha confirmó el diagnóstico de EPOC, pero no presentaba ningún nódulo pulmonar. A continuación, la tomografía axial computarizada se llevó a cabo cada año y reveló 4 años más tarde, en agosto de 2012, un nódulo de 1,4 cm de diámetro en el lóbulo pulmonar superior derecho. La cirugía se realizó un mes después. El análisis patológico y la estadificación del cáncer revelaron una etapa de adenocarcinoma acinar IA sin diseminación a los ganglios linfáticos o metástasis a distancia (pT1aN0M0). El genotipado del tumor mostró una mutación de K-Ras en el codón 12. El paciente no recibió ningún tratamiento adicional. Fue analizado mediante ISET 12 meses después de la cirugía y no se encontró ninguna CTC en su sangre.

Procedimientos

15 [0214] El procedimiento ISET es un enfoque basado en la filtración de la sangre impulsada con motor, que enriquece las CTC y CTM circulantes en una membrana de policarbonato con poros de 8 micras [50, 51]. La sangre periférica (10 ml) se recogió en EDTA tamponado, se mantuvo a 4°C y se procesó en 1 hora de la recogida. Se procesaron siete puntos en la membrana para inmunocitoquímica y 3 puntos para tinción con May Grünwald Giemsa (MGG) para el análisis citológico. La inmunocitoquímica se realizó como se ha descrito previamente, usando doble inmunomarcaje con un anticuerpo pan-citoqueratina (ratón, clon KL-1, Immunotech, Marsella) y anti-vimentina (ratón, clon V9, Dako, Paris) aplicados a filtros durante 45 min a temperatura ambiente.

20 [0215] Usando ISET, los pacientes se consideraron positivos para CTC basándose en el análisis histopatológico de las células aisladas en la tinción con MGG, y la detección de las células con características malignas características de acuerdo con criterios previamente definidos [51] (Figura 2).

Resultados

25 [0216] Usando ISET, 3 de 168 (1,8%) de los pacientes con EPOC fueron positivos para CTC basándose en el aislamiento por ISET y análisis histopatológico de las células aisladas por tinción MGG, permitiendo la detección de células con características malignas características según criterios definidos previamente [51].

30 [0217] Se encontró que los tres pacientes con EPOC que tenían CTC iniciales detectadas por análisis de citopatología en ISET que desarrollaron un cáncer de pulmón en su seguimiento, tenían entre 32 y 67 CTC que se aislaron o agruparon en láminas (Figura 2). Las CTC revelaron grandes núcleos, con ranuras nucleares dispersas, acumulación de heterocromatina, y una cantidad moderada de citoplasma con alta relación núcleo/citoplasma (Figura 2). Además, estos pacientes demostraron CTM ocasional de la siguiente manera: paciente 1 tenía 3 CTM compuesto de 3, 9 y 15 CTC; paciente 2 tenía 1 CTM con 20 células, y el paciente 3 tenía 1 CTM con 12 CTC. Las agrupaciones ocasionales revelaron láminas cohesivas tridimensionales de CTC ovoides o poligonales que muestran atipia nuclear, anisonucleosis moderada a prominente, con múltiples nucleolos frecuentes y superposición nuclear. Las células inmunoteñidas correspondientes expresan principalmente pan-citoqueratina sola (Figura 2). Sin embargo, un pequeño número de CTC expresa fuertemente vimentina con una expresión de citoqueratina asociada débil (Figura 2).

35 [0218] Las células aisladas con características citomorfológicas más benignas también se detectaron mediante ISET en 3 de 168 (1,8%) pacientes con EPOC. Sin embargo, ni estos 3 pacientes ni los otros 162 pacientes con EPOC, desarrollaron un nódulo pulmonar durante el seguimiento posterior (tiempo de seguimiento promedio: 48 meses). No se detectaron CTC en 42 fumadores de control sin patología detectable y en 35 no fumadores individuos sanos.

Discusión

40 [0219] El cáncer de pulmón es conocido por ser un cáncer altamente invasivo, con más de 75% de los pacientes no elegibles para la cirugía en el diagnóstico [52]. Debido a su alta velocidad y el carácter altamente invasivo, es la causa principal de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo [53]. En este campo, el descubrimiento de un biomarcador de diagnóstico y no invasivo podría ser crucial para desenrollar las siguientes etapas de cribado por rastreo con CT de espiral a bajas dosis y la intervención quirúrgica temprana. Dado que el comportamiento altamente maligno del cáncer de pulmón está unido a su potencial invasivo, se pensó que el uso de una detección altamente sensible y de diagnóstico de CTC podría complementar las investigaciones con rastreo de TC y ayudar a reducir los resultados falsos positivos y negativos relacionados con el cribado con rastreo con CT. Los inventores de este modo se dirigieron a una población de 168 pacientes con EPOC. La EPOC es la tercera causa principal de muerte en los EE.UU., y se proyecta que se convierta en la cuarta causa de muerte en el mundo en 2030, debido a un aumento en las tasas de tabaquismo. La EPOC se

5 considera como una afección preneoplásica de cáncer de pulmón y se ha calculado que, en general, el 2,2% de los pacientes con EPOC desarrollan cáncer de pulmón por año. Sin embargo, la progresión de la EPOC aumenta la susceptibilidad a la carcinogénesis de pulmón en hasta 4-6 veces, una observación que se piensa que es debido a los mecanismos compartidos tanto en EPOC y cáncer de pulmón. Por lo tanto, el diagnóstico precoz de la EPOC es importante porque dejar de fumar al principio del proceso de la enfermedad EPOC disminuye la progresión de la enfermedad y disminuye la morbilidad y la mortalidad [54].

10 [0220] Se han aplicado varios procedimientos al aislamiento y la detección de células tumorales circulantes, con una sensibilidad y especificidad variables [45]. Sin embargo, los inventores pensaron que, en el contexto de diagnóstico precoz del cáncer de pulmón, sólo un enfoque de diagnóstico histopatológico podría ser adecuado para revelar "CTC/CTM centinela" a usar en un enfoque combinado para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón incluyendo también el cribado con rastreo con CT.

15 [0221] ISET es un tratamiento rápido y directo de muestras de sangre que aísla las CTC intactas de la sangre de una manera altamente sensible que también permite su análisis inmunocitopatológico y molecular.

20 [0222] Los tres casos aquí descritos revelaron un número relevante de CTC/CTM 1 a 4 años antes de la detección de un nódulo pulmonar por tomografía axial computarizada. Desafortunadamente, los filtros ISET no se almacenaron a - 20°C haciendo imposible estudiar las mutaciones del ADN en CTC/CTM. Sin embargo, por primera vez, estos datos validan en los seres humanos los resultados obtenidos en modelos animales que muestran que las CTC se propagan mediante cánceres invasivos tan temprano como en la etapa de carcinoma "in situ". En este contexto, también es importante tener en cuenta que ni las CTC ni CTM fueron encontrados mediante ISET en 42 fumadores sin una patología detectable y en 35 individuos sanos no fumadores. En general, 562 sujetos sin cáncer han sido estudiados mediante ISET por diferentes grupos y se ha demostrado que no tienen CTC en la sangre.

25 [0223] Como se muestra en el presente documento por primera vez sobre tres pacientes en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que se encontró que tenían CTC detectadas mediante ISET y citopatología 1 a 4 años antes, un nódulo pulmonar fue identificado por formación de imágenes. En estos tres pacientes el cáncer de pulmón se ha diagnosticado en una etapa temprana (IA) que permite la resección quirúrgica rápida; a continuación, se observó que estaban sin CTC varios meses después de la cirugía. Ahora se necesitan estudios más amplios para evaluar el potencial de la identificación de diagnóstico de CTC como herramienta fiable para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón en pacientes de riesgo.

Ejemplo 4: Aplicación al aislamiento y caracterización de trofoblastos cervicales de muestras transcervical

35 [0224] Trofoblastos. Según un modo preferido de implementación, las células trofoblásticas se pueden extraer por filtración de muestras transcervicales, identificarse mediante análisis citomorfológica y su genoma se puede caracterizar individualmente mediante PCR después de la microdissección por láser y amplificación genómica completa.

40 [0225] Se recogen muestras transcervicales de mujer embarazada entre la quinta y 15ª semana de gestación utilizando una herramienta de citocepillado girada en la abertura central de la cervix. Las muestras transcervicales se transfieren a solución de PBS complementado con un reactivo fijador. La muestra se puede almacenar a 4°C durante meses antes de la filtración.

45 [0226] Las muestras transcervicales se diluyen con agua destilada estéril de acuerdo con su celularidad antes de la filtración y se analizan mediante tinción citomorfológica.

50 [0227] Las células trofoblásticas individuales se recogen entonces por microdissección por captura láser y el análisis molecular se lleva a cabo para el genotipado y análisis genéticos según lo descrito por publicaciones (Saker et al, Prenatal Diagnosis 2006).

[0228] Un nuevo enfoque para el aislamiento no invasivo de trofoblastos cervicales en mujeres embarazadas en una fase temprana del embarazo.

55 [0229] Un objetivo importante de la atención prenatal moderna es reemplazar el diagnóstico prenatal invasivo, que está ligado a un riesgo del 1 a 2% de pérdida fetal [55] con pruebas "no invasivas" completamente seguras. El ADN fetal puede ser recuperada de forma no invasiva de tres fuentes: células fetales circulantes en la sangre materna, en particular células eritroides y trofoblásticas, que no persisten en la sangre después del parto o aborto involuntario de circulación; trofoblastos transcervicales, en tránsito desde la cavidad uterina al cuello del útero, y el ADN fetal libre que es parte del ADN libre total de células circulantes en la sangre materna. Se espera que la recuperación no invasiva de células fetales proporcione ADN fetal puro (sin mezcla de ADN materno), lo que permite desarrollar una alternativa no invasiva y completamente fiable de la amniocentesis y la CVS. Sin embargo, las células fetales circulantes y los trofoblastos cervicales son muy raros y su

aislamiento es un desafío técnico. Ahora están disponibles enfoques de secuenciación de próxima generación altamente potentes que reconocen ADN fetal libre de células y se ha demostrado que proporcionan una detección de aneuploidía prenatal fiable y no invasiva [56, 57, 58, 59, 60]. Sin embargo, estos procedimientos no pueden sustituir a la amniocentesis y la CVS, ya que no reconocen un ADN fetal puro. Además, estos enfoques no pueden aplicarse a principio del embarazo y requieren una tecnología sofisticada y cara.

[0230] Nuestro equipo ha demostrado que las células trofoblásticas circulantes se puede extraer fácilmente de la sangre materna mediante ISET (Aislamiento por tamaño de las células epiteliales tumorales/Trofoblastos) porque los trofoblastos son más grandes que los leucocitos de sangre periférica. Además, las células aisladas se analizaron genéticamente y su utilidad en el diagnóstico prenatal no invasivo (NI-PND) se demostró por dos trastornos recesivos, atrofia muscular espinal y la fibrosis quística [61, 62].

[0231] La presencia de células fetales en la endocérvix se demostró por primera vez por Shettles en 1971. Las células trofoblásticas se cree que son desprendidas de la regresión de vellosidades coriónicas en la cavidad uterina y de ahí hacia el cuello del útero [63, 64]. La cavidad uterina desaparece entre las semanas 11 y 12 de gestación (WG), tras la fusión de la decidua basal y parietalis, por lo tanto, se espera que la posibilidad de recoger esas células raras sea transitoria y se limite a los principios del embarazo. La recogida de células fetales del cuello uterino y el polo inferior de la cavidad uterina, llamado muestreo de células transcervicales (TCC), es una alternativa al aislamiento de células fetales de la sangre materna y proporciona una fuente adicional de ADN fetal puro para NI-PND. De gran ventaja es el hecho de que las TCC son solamente trofoblastos (citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos) que son desprendidos y no persisten más allá del embarazo actual. Se desarrollaron diferentes enfoques de muestreo de TCC e incluyen los siguientes: lavado intrauterino, lavado endocervical, aspiración del moco endocervical, así como el muestreo endocervical usando un citocepillo. Numerosos estudios dirigidos a determinar el mejor procedimiento de muestreo de TCC han establecido que el lavado uterino y el lavado endocervical son los procedimientos más eficaces para producir consistentemente células fetales como máxima a las 5 semanas de gestación [65, 66, 67, 68, 69, 70]. Sin embargo, a pesar de que se han descrito como mínimamente o semiinvasivo, la mayor preocupación con respecto a estos procedimientos es el riesgo de pérdida fetal [71, 72]. En la mayoría de los estudios, las muestras se recogieron inmediatamente antes de la interrupción del embarazo, por lo tanto, el efecto sobre embarazos en curso no ha sido suficientemente estudiado.

[0232] Un procedimiento de muestreo ideal no debe causar ninguna complicación, no debe tener ningún impacto negativo sobre el embarazo en curso, debe ser fácil de realizar fuera de un hospital y ser rentable. Se adoptó un procedimiento seguro como se describe en la sección de Material y Procedimientos (recogida de muestras). Lo más importante, la seguridad de este procedimiento se demuestra por el hecho de que se lleva a cabo de forma rutinaria durante el primer trimestre del embarazo.

[0233] En este estudio, un enfoque de muestreo seguro para recoger muestras cervicales se combinó con ISET, un procedimiento muy práctico para estudiar las células raras, no sólo debido a que elimina elementos de acuerdo con el tamaño, tales como espermatozoides y leucocitos, sino también debido a que forma una capa óptima de las células para ayudar a la microdissección por láser y cualquier otro tipo de análisis celular. Mediante la utilización de un procedimiento de tinción única, que facilita el reconocimiento de las células fetales, era posible microdisseccionar citotrofoblastos y sincitiotrofoblastos individuales y demostrar su naturaleza fetal mediante genotipo. También se muestra en este documento, como fue el caso de los trofoblastos aisladas de la sangre, que las células son susceptibles de ser utilizadas para NI-PND. Se proporciona un nuevo enfoque para recuperar de manera consistente y no invasiva células fetales que pueden utilizarse como parte de una verdadera alternativa no invasiva a la amniocentesis y CVS para el diagnóstico prenatal no invasivo de enfermedades genéticas.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Recogida de muestras:

[0234] Las muestras de TCC se recogieron de mujeres embarazadas en riesgo de tener un feto con una enfermedad monogénica (Hospital Necker-Enfants Malades) inmediatamente antes del muestreo de vellosidades coriónicas, así como de mujeres sometidas a la interrupción voluntaria del embarazo (TOP) (Antoine Béclère). Todas las mujeres estaban entre 7 y 12 semanas de gestación. Las células se obtuvieron con el uso de un citocepillo, pero a diferencia del procedimiento de muestreo TCC convencional, en nuestro estudio el cepillo no se insertó en el canal endocervical, sino más bien se hizo girar en el orificio externo. Los cepillados se transfirieron a 10 ml de una solución conservante que contenía metanol.

[0235] La tinción y fijación de las muestras con azul Alcian:

[0236] Se mezclaron 1 ml de cada muestra con 1 ml de una solución en ácido acético glacial al 3% de azul Alcian 8GX del 1,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y se incubaron durante 30 - 50 minutos. Las muestras se diluyeron

a continuación 25 veces en agua, lo que deja con un volumen total de 50 ml. Cada muestra se mezcló a fondo y se incubó durante 5 minutos.

Filtración de las muestras con ISET:

5

[0237] ISET se llevó a cabo como se describió previamente con sólo modificaciones menores [61]. Brevemente, las muestras diluidas (50 ml) se filtraron a través de filtros de policarbonato con poros cilíndricos calibrados de 8 µm. Las células de 1 ml de la muestra se concentraron en diez puntos de 0,6 cm de diámetro en el filtro.

Tinción de núcleos de células con tinción nuclear rojo:

10

[0238] Con el fin de teñir los núcleos de las células concentradas en el filtro, cada punto se cubrió con una solución de tinción roja fast nuclear al 0,1%/ulfato de aluminio al 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), se incubó durante 2 minutos y después se aclaró a fondo con agua. Los filtros se secaron al aire.

15

Análisis de los filtros y microdissección por láser:

15

[0239] Típicamente, se hicieron 2 filtros por muestra, y así, se procesó un promedio de 2 ml de cada muestra. Las células individuales no teñidas con azul Alcian y que mostraron una morfología de tipo citotrofoblasto o sincitiotrofoblasto fueron recuperadas de los filtros mediante microdissección por captura láser usando microscopio equipado con láser Nikon TE 2000-U (Nikon Paris, Francia y MMI Zurich, Suiza). Cada célula individual fue catapultada sobre la tapa de un tubo de microcentrífuga adecuado para PCR.

20

Análisis molecular:

25

[0240] Cada célula microdisseccionada se lisó en 15 µl de tampón de lisis (100 mmol/l de Tris-HCl, pH 8; 400 µg/ml de proteinasa K) durante 2 horas a 60°C, seguido de inactivación con proteinasa K a 94°C durante 15 min. Para la preamplificación con extensión del cebador (PEP) [73], a la células lisadas se añadieron 5 µl de una solución de 400 µM de cebadores aleatorios (Kit genPEP 75 OD, Genetix, Boston, EE.UU.), 6 µl de tampón de PCR (25 mM de MgCl₂/gelatina (1 mg/ml), 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, KCl 500 mM), 3 µl de una mezcla de cuatro dNTP (cada uno a 2 mM) y 1 µl (5 U) de Taq polimerasa (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE.UU.) en un volumen final de 60 µl. Se realizó un genotipado de células individuales para identificar células que tienen un genoma fetal mediante el uso de cebadores STR que se encontraron que eran informativos a través del análisis del ADN genómico paterno y materno. La amplificación se realizó en 60 µl que contenían 6 µl del producto PEP, 10 mM Tris-HCl, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de cada desoxinucleótido, 0,5 µM de cada cebador STR "exterior" y 2 U de Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Se reamplificaron 2 µl de un producto exterior de PCR diluido 1:10 en 20 µl de volumen final usando cebadores STR "interiores" fluoresceinados y el mismo protocolo de PCR. Un µl del producto de PCR interno diluido 1:20 se mezcló después con 13,5 µl de formamida desionizada Hi-Di y 0,5 µl de marcador Genescan 400 HD (ROX) (Applied Biosystems) y se cargó en un secuenciador automatizado ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Los perfiles se analizaron utilizando los programas de software GeneScan y Genotyper (Applied Biosystems).

30

35

35

40

40

[0241] Se realizaron diagnósticos prenatales no invasivos de SMA y fibrosis quística, tal como se describe anteriormente [62].

45

[0242] Los diagnósticos invasivos se llevaron a cabo en el Hospital Necker-Enfants Malades, Laboratorio de Genética Médica, París.

RESULTADOS

50

[0243] Se cribaron un total de 21 muestras cervicales, en el que se utilizó un citocepillo para recuperar las células únicamente a nivel del orificio externo de mujeres embarazadas entre 7-12 semanas de gestación. Entre éstas 14 programadas para el muestreo de vellosidades coriónicas (CVS), ya que presentaban un riesgo de llevar un feto con una enfermedad monogénica y 7 mujeres estaban a punto de someterse a una interrupción voluntaria del embarazo (TOP).

55

[0244] Las muestras cervicales contienen típicamente una variedad de células maternas. Como se muestra en la Figura 3, las células epiteliales escamosas exocervicales se reconocen fácilmente en imágenes microscópicas. Sin embargo, las células endocervicales y citotrofoblastos fetales pueden tener una morfología similar y por tanto son mucho más difíciles de discriminar. El azul Alcian reacciona con el moco que producen las células epiteliales columnares de la endocérvix, y por lo tanto se usó para facilitar el reconocimiento de las células fetales que deben permanecer sin teñir. Se buscaron células que muestran una morfología de tipo citotrofoblasto: células redondas con núcleos hiper cromáticos grandes,

60

irregulares (figura 3). De esta manera, hemos sido capaces de aislar citotroblastos individuales, cuyos genotipos fetales fueron verificados por análisis de PCR de fluorescencia de marcadores STR informativos (Figura 3, Tabla 4).

Tabla 4. Aislamiento de células fetales (citotroblastos/sincitiotroblastos) de 21 muestras cervicales y diagnóstico no invasivo de ejemplo para fibrosis quística

Pareja	Finalización del embarazo	Marcador STR informativo	Citotroblastos/ Sincitiotroblastos	Células fetales /ml de muestra	Diagnóstico no invasivo	Diagnóstico invasivo
1(CF)	12 semanas + 1 día	D5S816/D21S1437	3	3	Sin DelF508	Confirmado
2(CF)	12 semanas + 4 días	D7S486/D7S523	2	2	Portador DelF508	Confirmado
3(CF)	12 semanas + 1 día	D21S1435	5	5	Portador DelF508	Confirmado
4(CF)	12 semanas + 6 días	D7S523	3	3	Portador DelF508	Confirmado
5(CF)	12 semanas + 2 días	D16S539/D7S523	5	5	Portador DelF508	Confirmado
6(CF)	12 semanas + 4 días	D16S539/D7S523	3	3	Sin DelF508	Confirmado
7		D5S816/D21S1437	5	2,5		
8		D16S539	1/2	1,5		
9		D16S539/D5S816	4/2	2		
10		D21S1435	5	5		
11		D21S1435	2	3		
12		D16S3018	10	3,3		
13		D21S1435-7/D7S523	3	3		
14		D16S539/D5S816	2	0,5		
15(TOP)		D21S11	7/2	4,5		
16(TOP)		D16S539/D21S1435	6	6		
17(TOP)		D16S3018/D5S615	6	3		
18(TOP)		D5S615/D16S539	4	2		
19(TOP)		D16S539/D5S816	4	2		
20(TOP)		D16S539/D21S11	3	1,5		
21(TOP)		D5S615/D5S816	2/1	1,5		

TOP: Interrupción voluntaria del embarazo, CF: Fibrosis quística

[0245] Los sincitiotrofoblastos tienen núcleos densos y son multinucleadas y por lo tanto se dice que son menos susceptibles de análisis molecular. Además, los sincitiotrofoblastos pueden ser fragmentos bastante grandes, por lo tanto, la probabilidad de poblaciones de células mixtas (fetales y maternas) debe ser aumentada. Con el fin de aumentar el número de células fetales recuperadas por muestra, sin embargo, empezamos también a microdisecionar fragmentos polinucleados cuyos genotipos se determinaron de nuevo por análisis de STR (Figura 3, Tabla 4). Si bien hemos sido capaces de aislar sincitiotrofoblastos cuya naturaleza pura fetal fue confirmada (Tabla 4), la mayoría de los fragmentos contenía elementos fetales, así como maternos, tal como se esperaba, y por lo tanto fueron excluidos de este estudio.

[0246] Se identificaron células fetales (ya sea citotrofoblastos o sincitiotrofoblastos) en todas las 21 muestras, con una frecuencia de 0,5 a 6 células fetales por ml de muestra procesada (Tabla 4).

[0247] Con el fin de demostrar que nuestro protocolo previamente publicado para el diagnóstico no invasivo de la fibrosis quística (CF) puede aplicarse con éxito a las células fetales aisladas de cuello del útero, se hicieron diagnósticos de ejemplo para seis familias de CF (Tabla 4). El diagnóstico no invasivo de CF se basó en la presencia de la mutación Δ elF508 [62]. Se determinó que todos los fetos carecían de la mutación Δ elF508 por completo o sólo eran portadores (Tabla 4). Nuestros resultados fueron confirmados por el muestreo de vellosidades coriónicas.

DISCUSIÓN

[0248] La carrera para desarrollar técnicas adecuadas para el aislamiento de células fetales circulantes raras no se ha limitado al torrente sanguíneo materno. Mientras que los enfoques de secuenciación del genoma completo de la siguiente generación que reconocen el ADN fetal libre en el suero materno parecen prometedores, especialmente en la detección de aneuploidía, la gama de trastornos hereditarios que pueden ser detectados está limitada simplemente porque el ADN fetal se mezcla con ADN materno. La obtención de células fetales del cuello uterino proporciona una fuente alternativa y tiene ventajas, tales como el único tipo de célula fetal que se encuentra en el cuello del útero son trofoblastos que se sabe que no persisten más allá del embarazo actual. El principal reto sigue siendo la recuperación y el aislamiento de estas células raras, ya sea en el torrente sanguíneo de la madre o el cuello uterino. El muestreo de células transcervicales (TCC) combina diferentes procedimientos desarrollados para recuperar células fetales de la endocérnix y el polo inferior de la cavidad uterina. Un inconveniente importante, sin embargo, es el hecho de que estas técnicas son mínimamente o semiinvasivas y conllevan el riesgo de pérdida fetal. El procedimiento de muestreo TCC menos invasivo utiliza un citocepillo que típicamente se inserta unos 2 cm en el canal endocervical para recuperar moco cervical. Sin embargo, deben llevarse a cabo estudios más amplios en los embarazos en curso normales, incluyendo seguimientos a largo plazo, antes de que este procedimiento pueda ser considerado seguro. Es de destacar también el hecho de que los autores identificaron las células fetales mediante el uso de microscopía de inmunofluorescencia con marcadores antigénicos, pero no verificaron su naturaleza fetal mediante el genotipado. Un procedimiento de muestreo completamente no invasivo y seguro que se administra de forma rutinaria durante el primer trimestre del embarazo, toma células del ectocérnix (espátula) y un citocepillo se gira entonces en la abertura central del cuello del útero para recuperar las células de la zona de transformación donde se encuentran la ectocérnix y la endocérnix. Elegimos adoptar este enfoque para aislar las células trofoblásticas en nuestro estudio y combinamos con ISET, una técnica desarrollada en nuestro laboratorio, que simplemente pone las células en capas sobre una membrana y por lo tanto, las estabiliza para la microdissección. Hemos sido capaces de detectar células fetales en todas nuestras muestras analizadas, y por lo tanto una fuente de ADN fetal pura para las pruebas genéticas. Se demuestra que como fue el caso para la sangre materna, las células son susceptibles de análisis genético y diagnóstico y por lo tanto, demuestran el potencial para una variedad de pruebas genéticas. El aislamiento de células fetales a partir de dos fuentes totalmente no invasivas y con procedimientos de muestreo clínicamente aprobados (extracción de sangre y nuestra prueba cervical segura) probados como seguros durante el embarazo, podría allanar el camino para el desarrollo de pruebas de diagnóstico precoz, seguras y fiables para las enfermedades genéticas.

[0249] La solicitud describe las siguientes formas de realización específicas:

1. Un proceso para la identificación, diagnóstico, o para proporcionar un pronóstico para una afección, trastorno o enfermedad asociada con células raras que comprende:

(a) aislar o extraer células raras haciendo pasar una muestra biológica a través de un filtro y recuperar las células raras aisladas en el filtro; en el que el filtro tiene un tamaño de poro, densidad de poros u otras características físicas que retienen células raras pero que permiten el paso de otros tipos de células;

(b) determinar la citomorfología de las células raras aisladas o extraídas, y/o inmunomarcaje de las células raras aisladas, y/o la realización de análisis molecular sobre las células raras aisladas;

(c) identificar, diagnosticar o proporcionar un pronóstico para una afección, trastorno o enfermedad y/o una etapa de una afección, trastorno o enfermedad asociada con la presencia de células raras y/o número y/o características basadas en la citomorfología, y/o inmunomarcaje, y/o el análisis molecular de las células raras aisladas o extraídas.

2. El procedimiento de la realización 1, en el que la muestra biológica es sangre que puede estar opcionalmente filtrada de una manera que permite la separación y recuperación de las células raras, así como los leucocitos y el plasma sanguíneo separado de las células raras para el análisis molecular.
- 5 3. El procedimiento de la realización 1 o 2, en el que la muestra biológica es un fluido biológico distinto de la sangre.
4. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que la muestra biológica es mucosa o se obtiene de una membrana mucosa.
- 10 5. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto que tiene cáncer o un tumor, o que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener un tumor o cáncer.
6. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto que tiene cáncer o una afección, trastorno o enfermedad proliferativa no cancerosa, o que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una afección, trastorno o enfermedad proliferativa no cancerosa.
- 15 7. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto que tiene una afección, trastorno o enfermedad inflamatoria y/o degenerativa, o que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una afección, trastorno o enfermedad inflamatoria y/o degenerativa.
- 20 8. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto que tiene una afección, trastorno o enfermedad cardiovascular, o que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una afección, trastorno o enfermedad cardiovascular.
- 25 9. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto que tiene una afección, trastorno o enfermedad infecciosa, o que se sospecha que tiene o está en riesgo de tener una afección, trastorno o enfermedad infecciosa.
- 30 10. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 9 que comprende (a) aislar o extraer células raras haciendo pasar una muestra biológica a través de un filtro de policarbonato y recuperar las células raras aisladas o extraídas en el filtro de policarbonato.
- 35 11. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 10 que comprende (a) extraer o aislar células raras haciendo pasar una muestra biológica a través de un filtro de PET (tereftalato de polietileno) y recuperar las células raras extraídas o aisladas en el filtro de PET (tereftalato de polietileno).
- 40 12. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 11 que comprende (a) extraer o aislar células raras haciendo pasar una muestra biológica a través de un filtro hecho de cualquier material poroso y recuperar las células raras extraídas o aisladas en dicho filtro.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 12, en el que la muestra biológica se diluye antes de (a).
14. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 13, en el que la muestra biológica es fresca antes de (a).
- 50 15. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 14, en el que la muestra biológica se fija antes de (a).
16. El procedimiento de la realización 14 o 15, en el que la muestra biológica es tratada por un agente lítico celular antes de (a).
- 55 17. El procedimiento de la realización 14 o 15, en el que la muestra biológica es tratada por un agente mucolítico antes de (a).
18. El procedimiento de la realización 14 o 15, en el que la muestra biológica es tratada por un agente proteolítico anterior (a) a.
- 60 19. El procedimiento de la realización 14 o 15, en el que la muestra biológica es tratada por un agente anticoagulante antes (a) a.
20. Un procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 19, en el que las células raras aisladas o extraídas por filtración se transfieren a un soporte antes de análisis posteriores como en (b) o por cultivo.

21. Un procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 20, en el que células raras se recogen individualmente para análisis moleculares después de su extracción o aislamiento por filtración.
- 5 22. Un procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 21, en el que todas las células extraídas o aisladas por filtración se recogen para su uso en (b).
23. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, en el que las células raras aisladas o extraídas se cultivan antes de (b).
- 10 24. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 23, en el que las células raras aisladas o extraídas se cultivan y se utilizan para analizar su sensibilidad a medicamentos específicos y sus diferentes dosis.
- 15 25. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 24, en el que las células raras cultivadas aisladas o extraídas se utilizan para seleccionar tratamientos o tratamientos dirigidos a administrar al paciente y para controlar la respuesta y/o resistencia a los mismos.
26. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 25, en el que las células raras aisladas o extraídas se fijan antes de (b).
- 20 27. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 26, en el que células raras aisladas o extraídas se tiñen o inmunotiñen en el filtro antes de (b).
- 25 28. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 27, en el que células raras aisladas o extraídas se analizan en (b) mediante análisis molecular in situ después o antes de la tinción o inmunotinción.
29. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 28, en el que (b) comprende el análisis citomorfológico de las células raras aisladas o extraídas in situ sobre el filtro u otro soporte.
- 30 30. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 29, en el que (b) comprende el inmunomarcaje de las células raras aisladas o extraídas in situ sobre el filtro u otro soporte.
- 35 31. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 30, en el que (b) comprende el análisis molecular de las proteínas, ácidos nucleicos, u otros componentes de las células raras aisladas o extraídas in situ sobre el filtro.
32. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 32, en el que (b) comprende el análisis molecular de las proteínas, péptidos o polipéptidos de las células raras aisladas o extraídas.
- 40 33. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 32, en el que (b) comprende el análisis molecular del ADN, ARN, o microARN de las células raras aisladas o extraídas.
34. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 33, que comprende además (b1) visualizar las imágenes de las células raras aisladas o extraídas después del análisis citomorfológico, inmunomarcaje o análisis molecular in situ.
- 45 35. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 1 a 34, que comprende además (b2) registrar las imágenes de las células raras aisladas o extraídas después del análisis citomorfológico, inmunomarcaje o análisis molecular in situ.
36. Un procedimiento de detección de la presencia o ausencia de células raras, que comprende:
 (a) aislar o extraer células raras haciendo pasar una muestra biológica a través de un filtro y recuperar las células raras aisladas en el filtro; en el que el filtro tiene un tamaño de poro, densidad de poros u otras características físicas que retienen células raras pero que permiten el paso de otros tipos de células;
 (b) opcionalmente, cultivar las células raras aisladas o extraídas;
 (c) opcionalmente, fijar o teñir las células raras aisladas o extraídas o células raras opcionalmente cultivadas;
 (d) analizar las células raras aisladas o extraídas de (a), (b) o (c) mediante inmunomarcaje y/o análisis molecular in situ, y/o análisis molecular de ADN, ARN, y/o microARN de células raras, y/o análisis molecular de moléculas de proteína de células raras.
- 50 37. El procedimiento de la realización 36, en el que las células raras aisladas o extraídas se lisan para o durante (d).
- 60 38. El procedimiento de la realización 36 o 37, en el que se lisan las células raras aisladas o extraídas y (d) comprende detectar la proteína o proteínas mutadas y/o ARN mutado y/o mutación o mutaciones de ADN asociados con una afección, trastorno o enfermedad en las células raras lisadas.

- 5 39. El procedimiento de la realización 38, que comprende además seleccionar un tratamiento dirigido para medicina personalizada, para evaluar la eficacia del tratamiento o para detectar la posible resistencia al tratamiento basado en la detección de ADN mutado, y/o ARN mutado y/o proteína o proteínas mutadas en las células raras lisadas.
40. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 39, en el que las células raras aisladas y extraídas son lisadas y (d) comprende detectar la presencia o ausencia de mutaciones de ALK en las células raras lisadas.
- 10 41. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 40, en el que se lisan las células raras aisladas o extraídas y (d) comprende detectar la presencia o ausencia de mutaciones de ALK en las células raras lisadas, en el que dicho procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento para un sujeto, seguir la eficacia de un tratamiento, o detectar la resistencia a un tratamiento basado en la presencia o ausencia de la mutación de ALK.
- 15 42. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 41, en el que se lisan las células raras aisladas o extraídas y (d) comprende detectar la presencia o ausencia de una mutación de K-RAS y/o EGFR en las células raras lisadas, en el que dicho procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento para un sujeto, seguir la eficacia de un tratamiento, o detectar la resistencia a un tratamiento basado en la presencia o ausencia de la mutación de K-RAS y/o EGFR.
- 20 43. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 42, en el que se lisan las células raras aisladas o extraídas y (d) comprende detectar la presencia o ausencia de una mutación de B-RAF y/o HER2 en las células raras lisadas, en el que dicho procedimiento comprende además seleccionar un tratamiento para un sujeto, seguir la eficacia de un tratamiento, o detectar la resistencia a un tratamiento basado en la presencia o ausencia de la mutación de HER2 y/o B-RAF.
- 25 44. Un tratamiento de medicina personalizada que comprende repetir el procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 usando muestras biológicas obtenidas del mismo sujeto en diferentes momentos.
- 30 45. El tratamiento de medicina personalizada de la reivindicación 44, en el que las muestras biológicas se obtienen del mismo paciente antes y después del tratamiento, a diferentes puntos durante el tratamiento de una afección, o durante diferentes regímenes de tratamiento para una afección, trastorno o enfermedad asociados con las células raras.
- 35 46. El tratamiento de medicina personalizada de la realización 45,
(e) que comprende además comparar el número de células raras entre muestras obtenidas a diferentes momentos para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento o para detectar la resistencia a un régimen de tratamiento, en el que una disminución en el número relativo de células raras detectado indica una eficacia relativa de un régimen de tratamiento, y en el que un aumento en el número relativo de células raras detectado indica la resistencia o ineficacia del régimen de tratamiento; y opcionalmente,
40 (f) seleccionar un tratamiento dirigido personalizado eficaz para el sujeto basado en (e).
47. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43, en el que (d) analizar las células raras aisladas o extraídas comprende determinar el tipo y/u origen de las células raras.
- 45 48. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47, en el que (d) analizar las células raras aisladas o extraídas comprende determinar el estado de la transición epitelial a mesenquimal de las células raras.
49. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47-48, en el que (d) analizar las células raras aisladas o extraídas comprende determinar el estado de las células madre raras.
- 50 50. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 49, en el que (d) analizar las células raras aisladas o extraídas comprende determinar si las células raras tienen una firma de expresión génica asociada con células metastásicas o células invasivas o si las células raras expresan determinantes asociados con metástasis o invasión.
- 55 51. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 50, que comprende además hacer un diagnóstico precoz de una afección, trastorno o enfermedad asociados con las células raras basado en (d).
52. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 51, que comprende además hacer un diagnóstico precoz del cáncer y/o cáncer invasivo asociados con las células raras basado en (d).
- 60 53. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 52, que comprende además hacer un diagnóstico precoz del órgano donde se originó el cáncer y/o el cáncer invasivo.

54. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 53, que comprende además hacer un diagnóstico precoz de una afección, trastorno o enfermedad infecciosos asociados con las células raras basado en (d).
- 5 55. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 54, que comprende además evaluar un efecto de un fármaco candidato o tratamiento candidato sobre las características moleculares de las células raras, y seleccionar un fármaco o tratamiento que reduce el número de células raras en un sujeto en comparación con un control que no recibió el fármaco o tratamiento, y seleccionar un fármaco o tratamiento que reduce el número relativo de células raras o modifica las características moleculares o inmunológicas de las células raras en comparación con el control.
- 10 56. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 55, que comprende además evaluar la predisposición y/o el riesgo de un sujeto a desarrollar una afección, trastorno o enfermedad asociados con células raras, en el que un aumento en el número relativo de células raras en comparación con un valor de referencia o de control indica una mayor predisposición o riesgo de desarrollar dicha afección, trastorno o enfermedad o en el que un cambio molecular o inmunológico en las células raras en comparación con un valor de referencia o de control indica una mayor predisposición o riesgo de desarrollar dicha afección , trastorno o enfermedad.
- 15 57. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 56, en el que la afección, trastorno o enfermedad es un trastorno genético.
- 20 58. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 57, en el que la afección, trastorno o enfermedad es un cáncer o una enfermedad neoplásica.
- 25 59. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 56, en el que la afección, trastorno o enfermedad es una afección, trastorno o enfermedad infecciosos.
60. Un kit que comprende al menos uno de:
 uno o más filtros para extraer o aislar células raras de un fluido biológico,
 uno o más tampones, diluyentes, u otros agentes para tratar el fluido biológico antes de la filtración,
 30 uno o más tampones para suspender, lavar o de otra manera tratar las células raras después de que se extraen o aíslan de un fluido biológico,
 uno o más tampones de transferencia para transferir las células raras aisladas o extraídas de un filtro a un soporte diferente,
 uno o más reactivos de tinción citomorfológica y/o citoquímica u otros colorantes celulares, o tampones para los mismos,
 35 uno o más anticuerpos u otros reactivos para inmunomarcas células raras o tampones para los mismos,
 uno o más reactivos para el análisis in situ de células raras en un filtro u otro soporte,
 uno o más agentes líticos o tampones de lisis para lisar células raras,
 uno o más anticuerpos u otros reactivos para el análisis molecular de las proteínas de células raras, o tampones para los mismos,
 40 una o más sondas, cebadores, nucleótidos, enzimas u otros reactivos para el análisis molecular de los ácidos nucleicos de células raras, incluyendo PCR.
61. Una composición que comprende uno o más células raras aisladas o extraídas haciendo pasar una muestra biológica a través de un filtro y recuperar las células raras aisladas en el filtro; en el que el filtro tiene un tamaño de poro, densidad de poros u otras características físicas que retienen células raras, pero que permiten el paso de otros tipos de células.
- 45 62. Un filtro u otro soporte que comprende la composición de la realización 61.
- 50 63. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 59, que comprende además hacer un diagnóstico precoz de cáncer de pulmón asociado con células tumorales basado en la etapa d) de la realización 36 a 43 y 47 a 59.
64. El procedimiento de una cualquiera de las realizaciones 36 a 43 y 47 a 59, que comprende además hacer un diagnóstico precoz de la presencia y/o gravedad de la enfermedad cardiovascular asociada con células endoteliales basado en la etapa d) de la etapa a 43 y 47 a 59.
- 55

Referencias

[0250]

- 60 1. Goya T, Asamura H, Yoshimura H et al., Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: a Japanese lung cancer registry study. Lung Cancer 2005; 50: 227-34.

2. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al., Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.
3. Naruke T, Tsuchiya R, Kondo H, Asamura, H. Prognosis and survival after resection for bronchogenic carcinoma based on the 1997 TNM-staging classification: the Japanese experience. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1759-64.
4. Pfannschmidt J, Muley T, Bulzebruck H, et al., Prognostic assessment after surgical resection for non-small cell lung cancer: experiences in 2083 patients. *Lung Cancer* 2007; 55:371-7.
5. van Rens MT, de la Riviere AB, Elbers HR, van Den Bosch JM. Prognostic assessment of 2,361 patients who underwent pulmonary resection for non-small cell lung cancer, stage I, II, and IIIA. *Chest* 2000; 117:374-9.
6. Hirsch FR, Wynes MW, Gandara DR, Bunn PA Jr., The tissue is the issue: personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4909-11.
7. Mino-Kenudson M, Mark EJ., Reflex testing for epidermal growth factor receptor mutation and anaplastic lymphoma kinase fluorescence in situ hybridization in non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135:655-64.
8. Pao W, Girard N., New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:175-80.
9. Bria E, Milella M, Cuppone F, et al., Outcome of advanced NSCLC patients harboring sensitizing EGFR mutations randomized to EGFR tyrosine kinase inhibitors or chemotherapy as first-line treatment: a meta-analysis. *Ann Oncol.* 2011; 22:2277-85.
10. Gerber DE, Minna JD., ALK inhibition for non-small cell lung cancer: from discovery to therapy in record time. *Cancer Cell* 2010; 18:548-51.
11. Sasaki T, Jänne PA., New strategies for treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2011; 17:7213-8.
12. Shaw AT, Solomon B., Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17:2081-6.
13. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, et al., Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12:1004-12.
14. Yoshida A, Tsuta K, Nakamura H, et al., Comprehensive histologic analysis of ALK-rearranged lung carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2011; 35:1226-34.
15. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, et al., Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* 2011; 17:827-35.
16. Krebs MG, Sloane R, Priest L, et al., Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011a; 29: 1556-63.
17. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al., Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* 2011b Dec 14.
18. Paterlini-Brechot P, Benali NL., Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253:180-204.
19. Yu M, Stott S, Toner M, et al., Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 2011; 192:373-82.
20. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, et al., Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359:366-77.
21. Hofman V, Ilie MI, Long E, et al., Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer* 2011; 129:1651-60.
22. Hofman V, Long E, Ilie M, et al., Morphological analysis of circulating tumor cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumor cell (ISET) method. *Cytopathology* 2012; 23:30-8
23. Vona G, Sabile A, Louha M, et al., Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *Am J Pathol* 2000; 156:57-63.
24. Hou JM, Krebs M, Ward T, et al., Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer. *Am J Pathol* 2011; 178:989-96.
25. Lecharpentier A, Vielh P, Perez-Moreno P, et al., Detection of circulating tumor cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011; 105:1338-41.
26. Lababede O, Meziane M, Rice T., Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams. *Chest* 2011; 139:183-9.
27. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al., International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6:244-85.
28. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, et al., Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung carcinoma in the western population. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5216-23.
29. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al., Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7:413-21.
30. Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al., KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or Irinotecan: Results From the MRC FOCUS Trial. *J Clin Oncol* 2009; 27:5931-7.

31. Hofman P, Ilie M, Hofman V, et al., Immunohistochemistry to identify EGFR mutations or ALK rearrangements in patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 18 Nov 2011.
32. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al., EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:4275-83.
- 5 33. Lee JK, Park HS, Kim DW, et al., Comparative analyses of overall survival in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive and matched wild-type advanced non small cell lung cancer. *Cancer* 15 Nov 2011.
34. Wu SG, Kuo YW, Chang YL, et al., EML4-ALK Translocation Predicts Better Outcome in Lung Adenocarcinoma Patients with Wild-Type EGFR. *J Thorac Oncol* 2012; 7:98-104.
- 10 35. Yang P, Kulig K, Boland JM, et al., Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2012; 7:90-7
36. Just PA, Cazes A, Audebourg A, et al., Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer*. 6 Dec 2011
- 15 37. Paik JH, Choi CM, Kim H, et al., Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer A proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer* 28 Nov 2011.
38. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al., The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46:1773-80
39. Popat S, Gonzalez D, Min T, et al., ALK translocation is associated with ALK immunoreactivity and extensive signet-ring morphology in primary lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2011 Aug 18. [Epub para imprimir]
- 20 40. Yi ES, Boland JM, Maleszewski JJ, et al., Correlation of ICH and FISH for ALK gene rearrangement in non small cell lung carcinoma: ICH score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol* 2011; 6:459-65.
41. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, et al., Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:3349-55.
42. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, et al., Circulating tumor cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2010; 2:351-65.
- 25 43. Katayama R, Khan TM, Benes C, et al., Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:7535-40.
44. Heuckmann JM, Hölzel M, Sos ML, et al., ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin Cancer Res* 2011; 17:7394-401.
- 30 45. Paterlini-Brechot P, Benali NL., Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett.* 2007;253:180-204.
46. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al., Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol.* 2012; 7:306-15.
- 35 47. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, et al., EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell.* 2012; 148:349-61.
48. Klein C., Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*, 2009 (9): 302-312.
49. National Lung Screening Trial Research Team: Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011 4; 365:395-409.
- 40 50. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Flejou JF, et al., Preoperative Circulating Tumor Cell Detection Using the Isolation by Size of Epithelial Tumor Cell Method for Patients with Lung Cancer Is a New Prognostic Biomarker. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:827-35.
51. Hofman V, Long E, Ilie M, Bonnetaud C, Vignaud JM, Flejou JF, et al., Morphological analysis of circulating tumour cells in patients undergoing surgery for non-small cell lung carcinoma using the isolation by size of epithelial tumour cell (ISET) method. *Cytopathology.* 2012; 23:30-8.
- 45 52. Mazzone P, Mekhail T., Current and emerging medical treatments for non-small cell lung cancer: a primer for pulmonologists. *Respir Med.* 2012; 106:473-92.
53. 2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al., Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58:71-96.
- 50 54. Mets OM, Buckens CF, Zanen P, Isgum I, van Ginneken B, Prokop M, Gietema HA, Lammers JW, Vliegenthart R, Oudkerk M, van Klaveren RJ, de Koning HJ, Mali WP, de Jong PA., Identification of chronic obstructive pulmonary disease in lung cancer screening computed tomographic scans. *JAMA.* 2011; 306:1775-81.
- 55 55. Mujezinovic F, Alfirovic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110:687-694.
56. Dan S, Wang W, Ren J, Li Y, Hu H, Xu Z, Lau TK, Xie J, Zhao W, Huang H et al., Clinical application of massively parallel sequencing-based prenatal noninvasive fetal trisomy test for trisomies 21 and 18 in 11105 pregnancies with mixed risk factors. *Prenat Diagn* 2012; 32:1-8.
57. Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M et al., Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2012; 32:1233-1241.
- 60 58. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW., Digital PCR for the

- molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:13116-13121.
59. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM et al., Non invasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:20458-20463.
- 5 60. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR., Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16266-16271.
61. Vona G, Beroud C, Benachi A, Quenette A, Bonnefont JP, Romana S, Munnich A, Vekemans M, Dumez Y, Lacour B et al., Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Path* 2002; 160:51-58.
- 10 62. Mouawia H, Saker A, Jais JP, Benachi A, Bussieres L, Lacour B, Bonnefont JP, Frydman R, Simpson JL, Paterlini-Brechot P., Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online* 2012; 25:508-520.
63. Shettles LB. Use of the Y chromosome in prenatal sex determination. *Nature* 1971; 230:52-53.
64. Rhine SA, Cain JL, Cleary RE, Palmer CG, Thompson JF. Prenatal sex detection with endocervical smears: successful results utilizing Y-bodyfluorescence. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 122:155-160.
- 15 65. Ergin T, Baltaci V, Zeyneloglu HB, Duran EH, Ergenell MH, Batioglu S. Non-invasive early prenatal diagnosis using fluorescent in situ hybridization on transcervical cells: comparison of two different methods for retrieval. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 95:37-41.
66. Cioni R, Bussani C, Bucciantini S, Scarselli G. Fetal cells in a transcervical cell sample collected at 5 weeks of gestation. *J Mat-Fet Neonat Med* 2005; 18:271-273.
- 20 67. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Bucciantini S, Marchionni M, Scarselli G. Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population. *Prenat Diagn* 2005; 25:198-202.
68. Bussani C, Scarselli B, Cioni R, Bucciantini S, Scarselli G. Use of the quantitative fluorescent-PCR assay in the study of fetal DNA from micromanipulated transcervical samples. *Mol Diagn* 2004; 8:259-263.
- 25 69. Kingdom J, Sherlock J, Rodeck C, Adinolfi M. Detection of trophoblast cells in transcervical samples collected by lavage or cytobrush. *Obstet Gynecol* 1995; 86:283-288.
70. Massari A, Novelli G, Colosimo A, Sangiuolo F, Palka G, Calabrese G, Camurri L, Ghirardini G, Milani G, Giorlandino C et al. Non-invasive early prenatal molecular diagnosis using retrieved transcervical trophoblast cells. *Hum Genet* 1996; 97:150-155.
- 30 71. Chang SD, Lin SL, Chu KK, His BL. Minimally-invasive early prenatal diagnosis using fluorescence in situ hybridization on samples from uterine lavage. *Prenat Diagn* 1997; 17:1019-1025.
72. Chou MM, Lin SK, Ho ES. Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 weeks' gestation. *Prenat Diagn* 1997; 17:77-80.
73. Zhang L, Cui X, Schmitt K, Hubert R, Navidi W, Arnheim N. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:5847-5851.
- 35 74. Imudia AN, Suzuki Y, Kilburn BA, Yelian FD, Diamond MP, Romero R, Armant DR. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum Reprod* 2009; 24:2086-2092.
75. Coumans, F. A. W., et al., Filter Characteristics Influencing Circulating Tumor Cell Enrichment from Whole Blood, *PLOS ONE* 8(4): e61770 (April 2013)
- 40 76. Coumans, F. A. W., et al., Filtration Parameters Influencing Circulating Tumor Cell Enrichment from Whole Blood, *PLOS ONE* 8(4): e61774 (April 2013)

LISTADO DE SECUENCIAS

45 **[0251]**

<110> RARECELLS
 UNIVERSITE PARIS DESCARTES
 ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
 50 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
 PATERLINI-BRECHOT, Patrizia
 LAGET, Sophie
 HOFMAN, Paul
 55 CAPIOD, Thierry

<120> PROCESO PARA EL ANÁLISIS MÚLTIPLE DE CÉLULAS RARAS EXTRAÍDAS O AISLADAS DE MUESTRAS BIOLÓGICAS A TRAVÉS DE FILTRACIÓN

<130> BET13P1487

60 <150> US 61/651,437

<151> 2012-05-24

<160> 26

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 26
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo

15 <400> 1
 gcataaagat gtcacatca accaag 26

<210> 2
 <211> 24
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso

25 <400> 2
 tcttgccagc aaagcagtag ttgg 24

30 <210> 3
 <211> 24
 <212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo

40 <400> 3
 aaaaggctact ggtggagtat ttga 24

<210> 4
 <211> 23
 <212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso

50 <400> 4
 tcatgaaaat ggtcagagaa acc 23

55 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo

ES 2 666 594 T3

	<400> 5 gtattaaacct tatgtgtgac a	21
5	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador inverso	
15	<400> 6 gtcctgcacc agtaatatgc	20
20	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador directo	
	<400> 7 ttagatctct tacctaaact ctca	25
30	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador inverso	
40	<400> 8 tcagggccaa aaatttaac a	21
45	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo	
50	<400> 9 tgcttgctct gataggaaaa tg	22
55	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador inverso	

ES 2 666 594 T3

	<400> 10 ccacaaaatg gatccagaca	20
5	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador directo	
15	<400> 11 tgccagtaa cgtctcctt	20
20	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso	
25	<400> 12 caggtctag agcagagcag	20
30	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador directo	
40	<400> 13 cattcatgcg tctcacctg	20
45	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso	
50	<400> 14 ttatctccc tcccgtatc	20
55	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo	
60	<400> 15	

ES 2 666 594 T3

	cttcccatga tgatctgtcc	20
5	<210> 16 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador inverso	
	<400> 16 gctgcgagct gaccagaat gtctgg	26
15	<210> 17 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador directo	
25	<400> 17 gcgcgttcca tcctctac	18
30	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador inverso	
	<400> 18 ggcctccatc tcctcctc	18
40	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador directo	
50	<400> 19 gagtacggcc ctgaagaaga	20
55	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador inverso	
60	<400> 20 ccgtcgaagt tgagccatac	20

ES 2 666 594 T3

5 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 21
 gccgaggagg agatggag 18

15 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso

25 <400> 22
 gcttcagacc gtgctatcgt 20

30 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 23
 accggtgtgg ctcttaaca 20

40 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 24
 tcctgtactt accacaacaa cctt 24

50 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador directo

60 <400> 25
 gccactgagg atttggttt 20

<210> 26
<211> 22
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso

10 <400> 26
caaaagctga gatgaacag tg

22

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para diagnosticar un cáncer invasivo, que comprende:
 5 (a) aislar o extraer células tumorales circulantes haciendo pasar una muestra de sangre anticoagulada o una muestra de sangre diluida anticoagulada obtenida de un sujeto en riesgo de desarrollar un cáncer, mediante filtración vertical a través un filtro y recuperar las células aisladas o extraídas que no pasan a través del filtro; en el que el filtro tiene un tamaño de poro comprendido entre 3 y 100 μm , y una densidad de poros de entre 3×10^3 y 5×10^6 poros/ cm^2 y en el que el filtro retiene las células tumorales circulantes, pero permite el paso de células de la sangre más pequeñas que las células tumorales circulantes a través del filtro;
- 10 (b) analizar las células de (a) utilizando un análisis citomorfológico y/o inmunomarcaje y/o análisis molecular in situ, y/o análisis molecular de ADN, y/o ARN, y/o microARN, y/o análisis molecular de moléculas de proteína para determinar si las células tumorales circulantes están presentes, determinando de esta manera el riesgo del sujeto de tener un cáncer.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho filtro tiene un tamaño de poro comprendido entre 5 y 25 μm .
- 15 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, que comprende además lisar glóbulos rojos en la muestra de sangre anticoagulada o muestra de sangre diluida anticoagulada antes de (a).
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que (a) permite separar la mayor parte de los neutrófilos y linfocitos maduros y eritrocitos y retener en el filtro las células que son más grandes que los linfocitos maduros o neutrófilos.
- 20 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho filtro comprende policarbonato o PET (tereftalato de polietileno).
- 25 6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho filtro comprende al menos un área de filtración elemental que tiene una superficie igual a la de un disco con un diámetro de entre 0,6 cm y 3 cm, y el número de áreas de filtración elemental se elige de manera que la relación entre el volumen de fluido filtrado con respecto a la superficie de filtración es menor que 40 ml/cm^2 , y preferiblemente mayor que 0,14 ml/cm^2 .
- 30 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además cultivar las células recuperadas que no pasan a través del filtro antes de (b).
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además fijar o teñir las células recuperadas que no pasan a través del filtro antes de (b).
- 35 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (b) comprende analizar las células recuperadas que no pasan a través del filtro para la presencia de una mutación de la quinasa de linfoma anaplásico ("ALK").
- 40 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (b) comprende analizar las células recuperadas que no pasan a través del filtro para la presencia de una mutación o estado no mutado del homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten ("K-RAS").
- 45 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (b) comprende analizar las células recuperadas que no pasan a través del filtro para la presencia de una mutación del receptor del factor de crecimiento epidérmico ("EGFR").
- 50 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (b) comprende analizar las células recuperadas que no pasan a través del filtro para la presencia de una mutación del proto-oncogén B-Raf ("B-RAF").
13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (b) comprende analizar las células recuperadas que no pasan a través del filtro para la presencia de una mutación y/o amplificación del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano ("HER2").
- 55 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que (b) comprende analizar una muestra de células que no pasan a través del filtro para determinar el estado de transición epitelial a mesenquimal de las células; determinar si las células tienen una firma de expresión génica asociada con células metastásicas o invasivas; o determinar si las células expresan determinantes asociados con metástasis o invasión.
- 60 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, cuando se detectan células tumorales circulantes en (b), que comprende además determinar la presencia de células tumorales circulantes después de un tratamiento, a

diferentes puntos durante el tratamiento, o en puntos de tiempo durante diferentes regímenes de tratamiento .

5 16. Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que se utiliza la detección de células tumorales circulantes para seleccionar tratamientos dirigidos a células tumorales circulantes, y para controlar la respuesta del paciente a un tratamiento o controlar el desarrollo de resistencia a un tratamiento con un fármaco o agente particular.

17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende además hacer un diagnóstico del órgano donde se originó el cáncer invasivo.

10

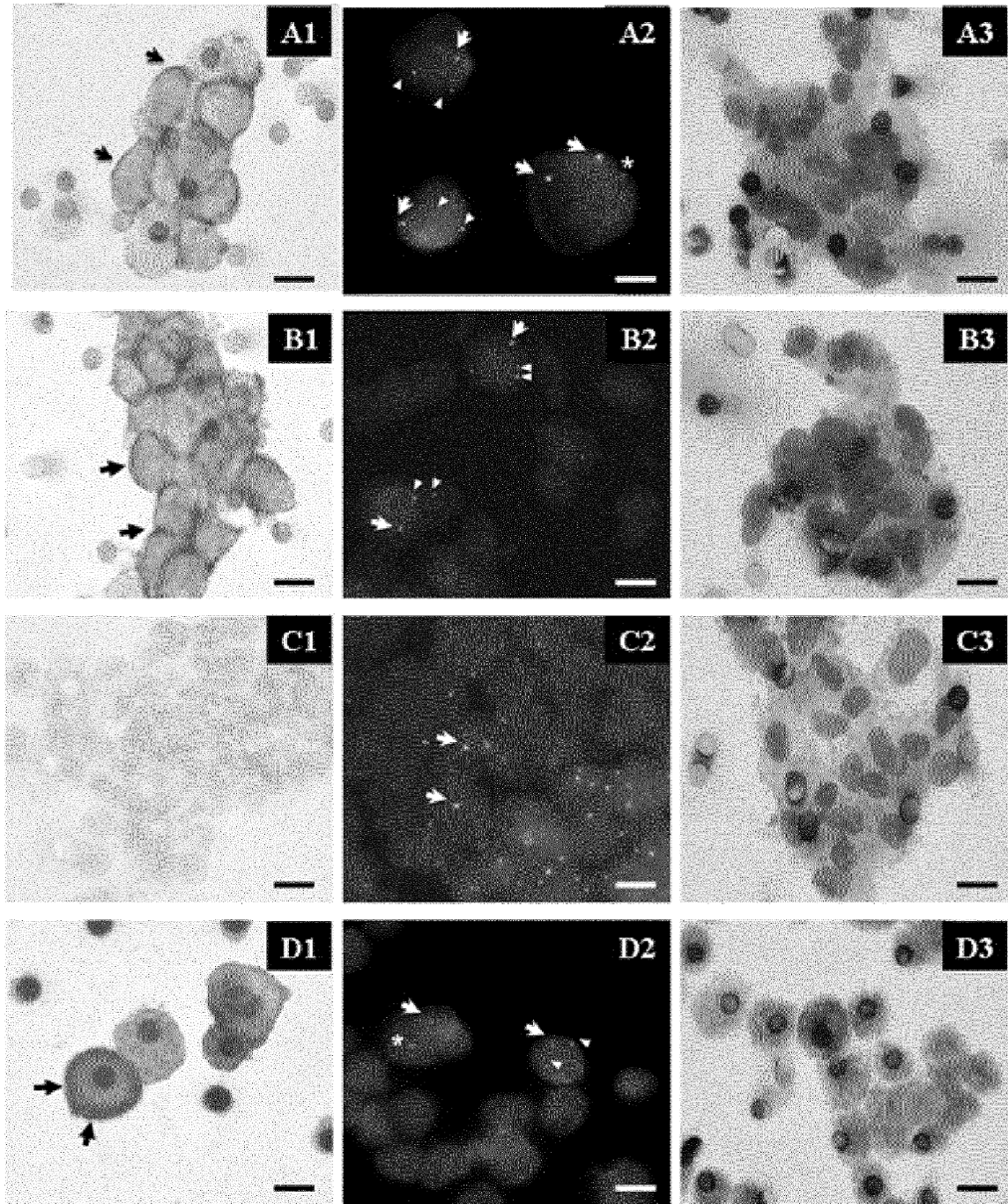


Figura 1A

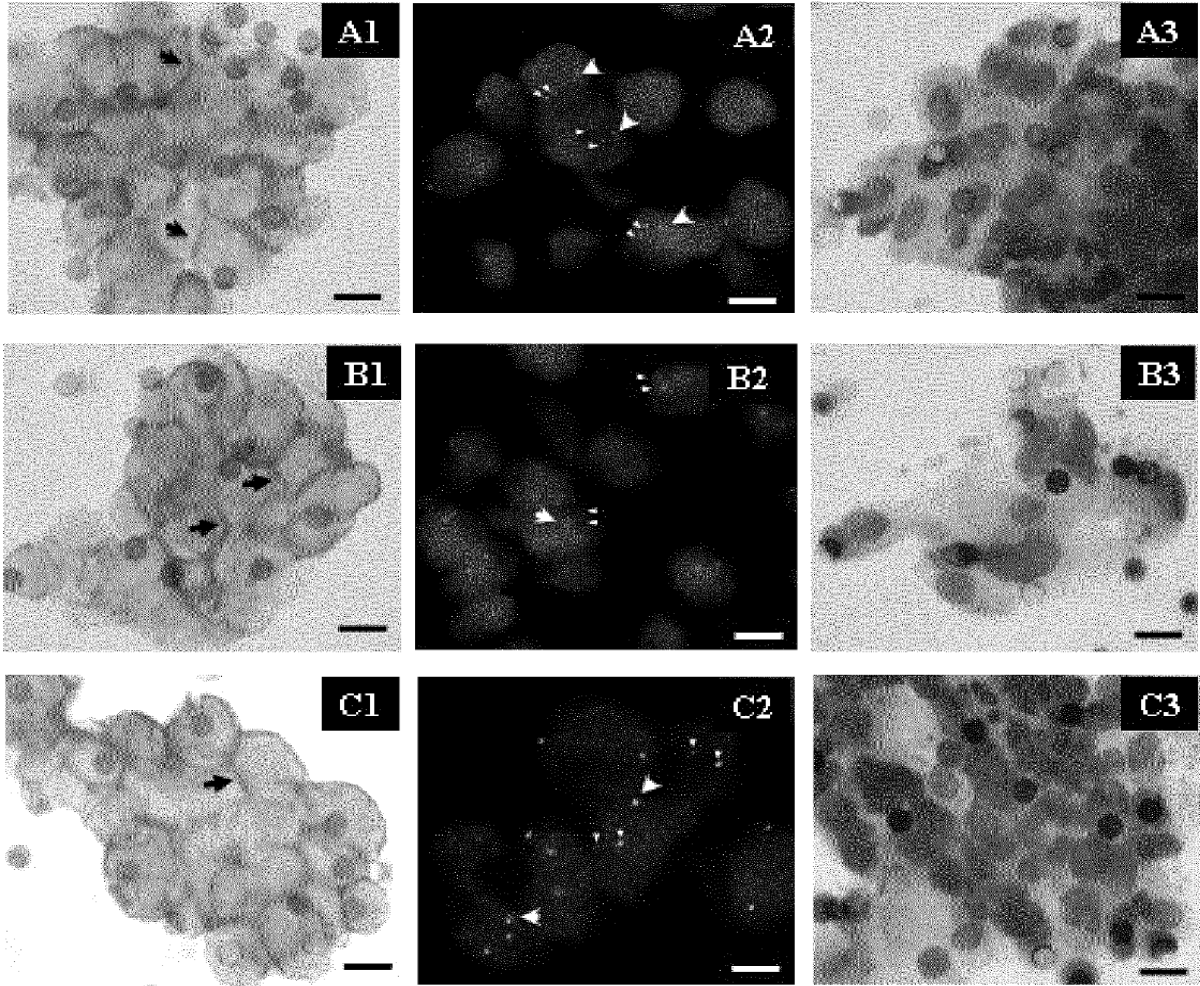


Figura 1B

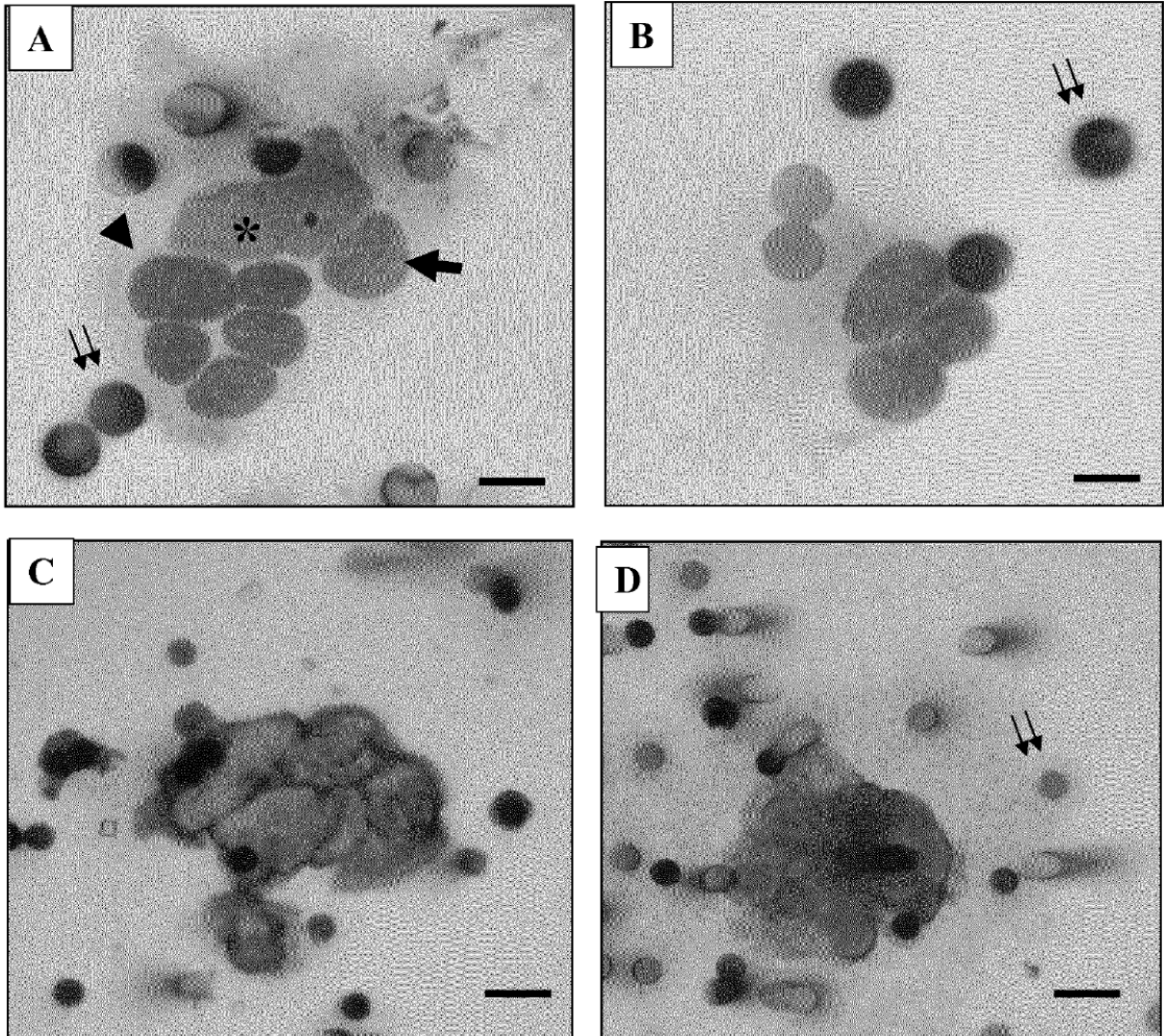


Figura 2

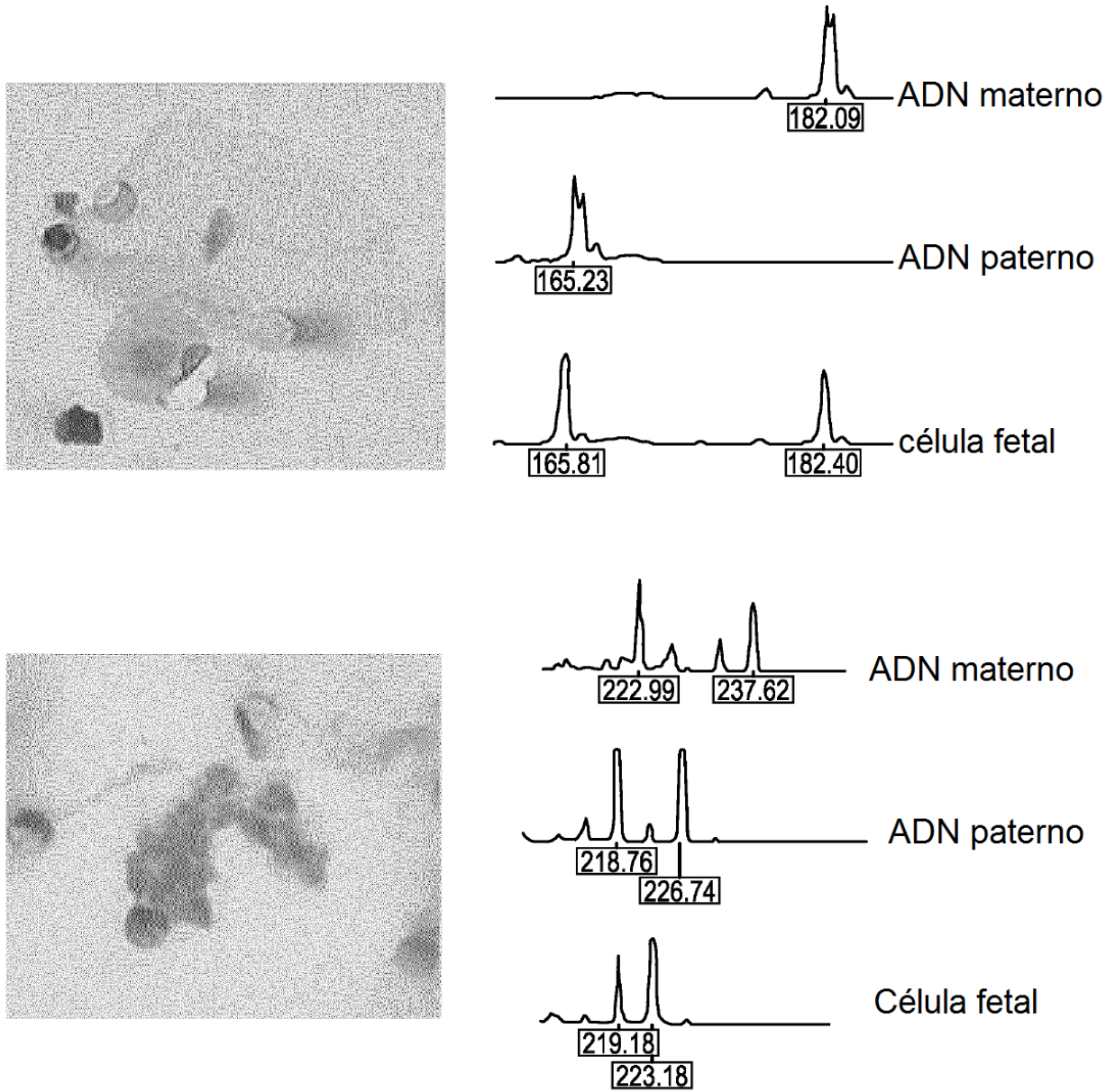


Figura 3