

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 406**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2015 PCT/US2015/026438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15161231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2015 E 15780576 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3132267**

54 Título: **Método para evitar positivos falsos en un ensayo de células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

**17.04.2014 US 201461980760 P**

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

**22.04.2020**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.  
(100.0%)  
511 Benedict Avenue  
Tarrytown, NY 10591 , US**

72 Inventor/es:

**PUGIA, MICHAEL;  
PHILIP, JULIA y  
MARFURT, KAREN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 755 406 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para evitar positivos falsos en un ensayo de células tumorales circulantes

Campo técnico

- 5 En el presente documento se proporcionan métodos para cribar una muestra de un paciente en un ensayo de células tumorales circulantes para detectar positivos falsos y métodos para realizar ensayos de detección de células tumorales circulantes. También se proporcionan aquí los usos de esos métodos en el tratamiento de un paciente.

Antecedentes

- 10 El análisis celular es importante en aplicaciones médicas, tal como el diagnóstico de muchas enfermedades. Sin embargo, muchas aplicaciones médicas de análisis celular requieren el aislamiento de ciertas células de interés que típicamente representan solo una pequeña fracción de la muestra analizada. Por ejemplo, las células tumorales circulantes (en adelante denominadas "CTC") son de particular interés en el diagnóstico de cánceres metastásicos. En los métodos convencionales, las CTC se aíslan de la sangre completa al eliminar primero los glóbulos rojos por lisis. En una muestra de sangre de 10 ml, se deben separar unos cientos de CTC de aproximadamente 800.000.000 glóbulos blancos (en adelante, "WBC"). Esto requiere métodos con alta eficiencia de separación y tasas de recuperación celular. Para que las CTC se analicen mediante métodos convencionales de microscopía de barrido o métodos moleculares como la secuenciación de próxima generación, por ejemplo, las células normales (generalmente WBC) deben reducirse de 200 a 1 célula enferma (típicamente células cancerosas) y el volumen de la muestra debe reducirse de 10 ml a 100s de microlitros. La detección de las CTC puede complicarse aún más debido a la presencia de células normales (es decir, no CTC) en la muestra, lo que puede interferir con la precisión del análisis.

- 20 El documento US2013/0129681 A1 está dirigido a un proceso para determinar la capacidad de señalización de las células de cáncer de vejiga donde se usa sangre completa y las células hematopoyéticas se excluyen de las células epiteliales usando CD45. Luego, se usan marcadores específicos del tipo de tumor para separar las células tumorales, como las CTC de otras células, y se usan marcadores epiteliales para separar las células normales de las células tumorales.

- 25 El documento WO2014/037552 A1 está dirigido a un método para analizar la composición de la población de células tumorales circulantes (CTC) en una muestra biológica que comprende los pasos de a) aislamiento o enriquecimiento de células mononucleares de sangre periférica (PMBC) y CTC de la muestra biológica, b) agotamiento de las células hematopoyéticas de PMBC y CTC aislados o enriquecidos, c) probar la suspensión celular obtenida para al menos dos marcadores independientemente uno del otro seleccionados entre marcadores de epitelio, marcadores mesenquimales, marcadores de transición epitelio-mesenquimatoso (EMT), marcadores de superficie, marcadores tisulares, marcadores tumorales, marcadores de resistencia, marcadores de células madre, marcadores hematopoyéticos y d) identificar así uno o más subgrupos de CTC en la población de CTC de esa muestra biológica.

El documento US2011/306043 A1 describe que los marcadores útiles de la superficie celular endotelial incluyen CD105, CD106, CD144 y CD146.

- 35 Por lo tanto, existe la necesidad de métodos de criba de positivos falsos en los ensayos de células tumorales circulantes.

Resumen

La invención en su forma más amplia se define mediante las reivindicaciones independientes 1, 3 y 4. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2 y 5-10.

- 40 Aquí se proporcionan métodos para seleccionar una muestra de un paciente en un ensayo de células tumorales circulantes para detectar positivos falsos.

También se proporcionan en el presente documento métodos para realizar un ensayo de detección de células tumorales circulantes.

- 45 También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar simultáneamente, y métodos para distinguir entre una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en una muestra de un paciente.

Breve descripción de los dibujos

El resumen, así como la siguiente descripción detallada, se entienden mejor cuando se leen junto con los dibujos adjuntos. Para fines de ilustración, en los dibujos se muestran realizaciones de ejemplo de los métodos descritos. Además, los dibujos no están necesariamente dibujados a escala. En los dibujos:

- 50 La FIGURA 1 representa un gráfico lineal que muestra la recuperación de CTC usando células cancerosas fijas de cultivo de tejidos añadidas a sangre de donantes sanos.

- 5 La FIGURA 2, que comprende las FIGURAS 2A, 2B, 2C y 2D representa una superposición de imágenes de inmunofluorescencia de la recuperación de CTC en muestras de sangre de pacientes con cáncer. Las muestras se analizaron con anticuerpos contra vimentina (rojo) y CK8/18/19 (rojo) como marcadores de células cancerosas y anticuerpos contra CD45 (púrpura) como marcador de glóbulos blancos. Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares.
- 10 La FIGURA 3, que comprende las FIGURAS 3A, 3B, 3C y 3D, representa una superposición de imágenes de inmunofluorescencia que muestran positivos falsos encontrados en muestras de sangre de donantes sanos. Las muestras se analizaron con anticuerpos contra vimentina (rojo) y CK8/18/19 (rojo) como marcadores de células cancerosas y anticuerpos contra CD45 (púrpura) como marcador de glóbulos blancos. Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares.
- 15 La FIGURA 4, que comprende las FIGURAS 4A, 4B, 4C y 4D, representa la inmunocitoquímica (ICC) usando anticuerpos anti-vimentina y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de células cancerosas filtradas (A) y (C) y (B) y (D) falsos positivos. (A) y (C) Vimentina (arriba a la izquierda), DAPI (arriba a la derecha), superposición de vimentina y DAPI (abajo a la izquierda) y tinción H&E (abajo a la derecha). (B) y (D) Vimentina (arriba a la izquierda), CD45 (arriba a la derecha), superposición de vimentina y DAPI (abajo a la izquierda) y tinción H&E (abajo a la derecha).
- 20 La FIGURA 5, que comprende las FIGURAS 5A, 5B, 5C y 5D, representa superposiciones de imágenes de inmunofluorescencia de sangre de donantes sanos teñida con anti-vimentina (rojo), anti-CD45 (púrpura) y (A) y (C) anti-ZO-1 (verde) o (B) y (D) anticuerpos monoclonales anti-CD 144 (verde). Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares.
- 25 La FIGURA 6, que comprende las FIGURAS 6A, 6B, 6C y 6D, representa superposiciones de imágenes de inmunofluorescencia de células HUVEC añadidas a la sangre de donantes sanos teñida con anti-vimentina (rojo), anti-CK8/18/19 (rojo), anti-CD45 (púrpura) y anticuerpos monoclonales anti-CD 105 (verde). Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares.
- 30 La FIGURA 7, que comprende las FIGURAS 7A, 7B, 7C y 7D, representa superposiciones de un ensayo de amplificación de señal de tiramida (TSA). Las células filtradas y fijas (células HUVEC añadidas a la sangre de donantes sanos) se incubaron con anticuerpos primarios contra vimentina (rojo), CK8/18/19 (rojo), y CD45 (púrpura), incubadas con un anticuerpo secundario anti-HRP de conejo, e incubadas con tiramina-Alexa488 para realizar la amplificación de la señal. La respuesta de la TSA es verde. Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares. Las células negativas no se tiñeron de verde. Las células positivas se tiñeron de verde.
- 35 Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas
- Los métodos divulgados pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada tomada en relación con las figuras y ejemplos adjuntos, que forman parte de esta divulgación. Debe entenderse que los métodos divulgados no se limitan a los métodos, condiciones o parámetros específicos descritos y/o mostrados aquí, y que la terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir realizaciones particulares a modo de ejemplo  
40 solamente y no está destinada ser limitativo de los métodos reivindicados. Además, como se usa en la especificación que incluye las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen el plural, y la referencia a un valor numérico particular incluye al menos ese valor particular, a menos que el contexto dicte claramente de otra manera. El término "pluralidad", como se usa en el presente documento, significa más de uno. Cuando se expresa un rango de valores, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. Además, la referencia a los valores establecidos en los rangos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese rango. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Todas las gamas son inclusivas y combinables.
- 45 Debe apreciarse que ciertas características de los métodos descritos que, por claridad, se describen en el presente documento en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de los métodos descritos que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación.
- En este documento se proporcionan métodos como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas.
- 50 Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a cualquier mamífero cuya muestra puede analizarse con los métodos descritos. Por lo tanto, los métodos descritos son aplicables a sujetos humanos y no humanos, aunque lo más preferiblemente se usa para humanos. En algunas realizaciones, la muestra del paciente es una muestra humana. En otras realizaciones, la muestra del paciente es una muestra no humana. "Paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento.
- 55 Como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra de sangre, que puede contener, por ejemplo, células normales y CTC. En algunas realizaciones, la muestra de sangre puede ser sangre completa. En otras realizaciones, la muestra de sangre puede ser plasma.

Las muestras se pueden recoger del paciente en un recipiente adecuado, como por ejemplo, una bolsa, una botella, una aguja o un recipiente VACUTAINER®.

Como se usa en el presente documento, "célula tumoral circulante" (CTC) se refiere a células que se han desprendido, desplazado y/o metastatizado del tumor primario y han entrado en el torrente sanguíneo.

5 Como se usa en el presente documento, el término "positivo falso" se refiere a no CTC que aparecen como CTC en un ensayo de detección. Los positivos falsos incluyen, entre otros, glóbulos rojos (RBC), plaquetas y glóbulos blancos no cancerosos, células endoteliales, células epiteliales, células mesenquimales, células madre o cualquier combinación de las mismas. Las "no CTC" también se denominan "células normales" o "células no cancerosas" en el presente documento.

10 Las CTC se distinguen de los positivos falsos al incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo que se une a la vimentina, un anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes, un anticuerpo que se une a un marcador expresado en glóbulos blancos y un anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales.

15 Los marcadores expresados en CTC incluyen, entre otros, vimentina, citoqueratinas básicas, citoqueratinas neutras, citoqueratinas ácidas, moléculas de adhesión o cualquier combinación de las mismas. Las citoqueratinas básicas o neutras incluyen, pero no se limitan a, CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7, CK8 y CK9. Las citoqueratinas ácidas incluyen, pero no se limitan a, CK10, CK12, CK 13, CK14, CK16, CK17, CK18, CK19 y CK20. En la presente invención, el otro marcador expresado en CTC comprende CK8, CK18, CK19, o cualquier combinación de los mismos. Estos tipos de biomarcadores del tipo de células cancerosas pueden utilizarse solos o en combinación con cualquiera de los

20 otros biomarcadores del tipo de células cancerosas, incluidos, entre otros, WAF, BAX-1, PDGF, JAGGED 1, NOTCH, VEGF, VEGFR, CAIX, MIB1, MDM, PR, ER, SEL5, SEMI, PI3K, AKT2, TWIST1, EML-4, DRAFF, C-MET, ABL1, EGFR, GNAS, MLH1, RET, MEK1, AKT1, ERBB2, HER2, HNF1A, MPL, SMAD4, ALK, ERBB4, HRAS, NOTCH 1, SMARCB1, APC, FBXW7, IDH1, NPM1, SMO, ATM, FGFR1, JAK2, NRAS, SRC, BRAF, FGFR2, JAK3, RA, STK11, CDH1, FGFR3, KDR, PIK3CA, TP53, CDKN2A, FLT3, KIT, PTEN, VHL, CSF1R, GNA11, KRAS, PTPN11, DDR2, CTNBN1,

25 GNAQ, MET, RBI, AKT1, BRAF, DDR2, MEK1, NRAS, FGFR1, y ROS1. Estos marcadores pueden ser específicos para las CTC (es decir, no expresados en células normales) o pueden expresarse tanto en CTC como en células normales. Como se usa en el presente documento, "otro marcador expresado en células tumorales circulantes" se refiere a marcadores CTC distintos de vimentina. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC es un anticuerpo anti-CK8. En otras realizaciones, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC es un anticuerpo anti-CK18. En otras realizaciones, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC es un anticuerpo anti-CK19. En otras realizaciones más, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC es una combinación de anticuerpos anti-CK8, anti-CK18 y/o anti-CK19, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CK8/18/19.

35 Los marcadores expresados en WBC incluyen, entre otros, CD45, CTLA-4, CD4, CD68 y/o CD8. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el marcador expresado en los glóbulos blancos comprende anticuerpos anti-CD45. Además, CD45 se puede usar para diferenciar los diferentes tipos de glóbulos blancos cuando se combina con otros marcadores de CD. Por ejemplo, los granulocitos se pueden indicar por CD45+, CD15+; los monocitos se pueden indicar por CD45+, CD14+; Los linfocitos T se pueden indicar por CD45+, CD3+; Las células T auxiliares se pueden indicar por CD45+, CD3+, CD4+; las células T citotóxicas se pueden indicar por CD45+, CD3+, CD8+; Los linfocitos B se pueden

40 indicar por CD45+, CD19+ o CD45+, CD20+; los trombocitos pueden indicarse por CD45+, CD61+; y las células asesinas naturales se pueden indicar por CD16+, CD56+, CD3. Adicionalmente, dos moléculas CD comúnmente utilizadas, CD4 y CD8, pueden usarse como marcadores para células T auxiliares y citotóxicas, respectivamente. Estas moléculas se definen en combinación con CD3+, ya que algunos otros leucocitos también expresan estas moléculas de CD (es decir, algunos macrófagos expresan bajos niveles de CD4; las células dendríticas expresan altos

45 niveles de CD8).

El marcador expresado en las células endoteliales es CD144.

50 Los anticuerpos se pueden preparar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, como la inmunización de un huésped y la recolección de sueros (policlonales) o mediante la preparación de líneas celulares híbridas continuas y la recolección de la proteína secretada (monoclonal) o mediante la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de los mismos que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

55 Los anticuerpos incluyen una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, que incluye las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 e IgM. Sus fragmentos incluyen Fab, Fv y F (ab')<sub>2</sub>, y Fab'. Además, se pueden usar agregados, polímeros, y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión por una molécula particular.

También se proporcionan en el presente documento métodos para identificar simultáneamente una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en una muestra de un paciente, que comprende:

incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo que se une a vimentina, un anticuerpo que se une a CK8/18/19 y un anticuerpo que se une a CD144;

5 detectar la pluralidad de anticuerpos, en donde la detección comprende generar señales a partir de la pluralidad de anticuerpos; e identificar la presencia de una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en la muestra que comprende:

cribar una célula tumoral circulante, en donde la célula tumoral circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19, o ambas, pero no una señal del anticuerpo que se une a CD144; y

10 cribar una célula endotelial circulante, en donde la célula endotelial circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19, o ambas, y una señal del anticuerpo que se une a CD144.

También se proporcionan en el presente documento métodos para distinguir entre una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en una muestra de un paciente, que comprende:

15 incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo que se une a vimentina, un anticuerpo que se une a CK8/18/19 y un anticuerpo que se une a CD144;

detectar la pluralidad de anticuerpos, en donde la detección comprende generar señales a partir de la pluralidad de anticuerpos; y

20 distinguir entre una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante, que comprende examinar la muestra en busca de una célula tumoral circulante, en donde la célula tumoral circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19, o ambos, pero no una señal del anticuerpo que se une a CD144, y la detección de la muestra para una célula endotelial circulante, en donde la célula endotelial circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19, o ambos, y una señal del anticuerpo que se une a CD144.

25 En algunas realizaciones, la CTC tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina pero no una señal del anticuerpo que se une al CD144. En otras realizaciones, la CTC tiene una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19 pero no una señal del anticuerpo que se une a CD144. En otras realizaciones más, la CTC tiene una señal del anticuerpo que se une a vimentina y una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19 pero no una señal del anticuerpo que se une a CD144.

30 En algunas realizaciones, la célula endotelial circulante (CEC) tiene una señal del anticuerpo que se une a vimentina y una señal del anticuerpo que se une a CD144. En otras realizaciones, la CEC tiene una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19 y una señal del anticuerpo que se une a CD144. En otras realizaciones, la CEC tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19 y una señal del anticuerpo que se une a CD 144.

35 Como se usa en el presente documento, el término "detección" se refiere a la identificación del anticuerpo que se une a la vimentina, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos y/o el anticuerpo que está unido a un marcador expresado en células endoteliales, por ejemplo, generando señales de los anticuerpos unidos.

40 Las señales pueden generarse a partir de los anticuerpos unidos mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la pluralidad de anticuerpos contiene uno o más marcadores detectables. La naturaleza de la etiqueta depende del formato de ensayo particular. Un sistema productor de señal generalmente incluye uno o más componentes, al menos un componente es una etiqueta detectable, que genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de etiqueta unida y/o sin unir, es decir, la cantidad de etiqueta unida o no unida a la célula detectada o a un agente que refleja la cantidad de la célula por detectar. El uno o más marcadores detectables pueden ser cualquier molécula que produzca, o puede inducirse a producir, una señal, que incluye, entre  
45 otros, marcadores fluorescentes, radiomarcadores, marcadores enzimáticos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores fotosensibilizadores o cualquier combinación de los mismos. Por lo tanto, detectar la pluralidad de anticuerpos puede comprender detectar y/o medir, radiactividad, actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o cualquier combinación de los mismos.

50 Las etiquetas adecuadas incluyen, por ejemplo: colorantes; fluoroscedores tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o ftaldehído y fluorescamina; enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), β-galactosidasa y peroxidasa de rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como QB replicasa; promotores complejos como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; quimioluminiscentes tales como isoluminol y ésteres de acridinio, por ejemplo; sensibilizadores coenzimas sustratos enzimáticos;  
55 radiomarcadores como <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, <sup>57</sup>Co y <sup>75</sup>Se; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas que incluyen partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO<sub>2</sub>), y

similares; sol de metal; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable.

5 La etiqueta puede producir directamente una señal y, por lo tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo fluorescentes, pueden absorber la luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otras etiquetas que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y colorantes.

10 Alternativamente, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señal incluiría todos los componentes necesarios para producir una señal medible. Dichos otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, depuradores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señal. Se puede encontrar una discusión detallada de los sistemas productores de señal adecuados en la Patente de los Estados Unidos No. 5,185,243, columnas 11-13.

15 La etiqueta u otros miembros del sistema que producen señales pueden unirse a un soporte o unirse a una molécula que está dispuesta sobre un soporte. Las células pueden unirse a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, siempre que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad del anticuerpo para unir un marcador en la célula. En algunas realizaciones, las células pueden estar recubiertas o unidas covalentemente directamente al soporte sólido. Los grupos de enlace también se pueden usar para acoplar covalentemente el soporte sólido y las células. También son posibles otros métodos para unir las células. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña (como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo) y una molécula pequeña (como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc.) puede unirse a las celdas o viceversa. La unión de componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la literatura.

25 El soporte puede estar compuesto por un material orgánico o inorgánico, sólido o fluido, insoluble en agua, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como partículas, incluyendo perlas, películas, membranas, tubos, pozos, tiras, varillas, superficies planas (como, por ejemplo, lámina, placa y portaobjetos) y fibra, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no ser suspendible en el medio en donde se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex; bicapas lipídicas o liposomas; gotas de aceite y soportes metálicos tales como, por ejemplo, partículas magnéticas; por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4 metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon y poli(butirato de vinilo), ya sea utilizados solos o en combinación con otros materiales.

35 La etiqueta y/u otro miembro del sistema productor de señal pueden estar unidos a un miembro de un par de unión específico u otra molécula. Por ejemplo, el marcador puede unirse covalentemente a un miembro de un par de unión específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor para un anticuerpo o un receptor que es capaz de unirse a una molécula pequeña conjugada con un anticuerpo. Un receptor es una molécula capaz de unirse específicamente a otra molécula. La unión de la etiqueta al miembro del par de unión específico se puede lograr mediante reacciones químicas que resultan en la sustitución de un átomo de hidrógeno de la etiqueta con un enlace al miembro del par de unión específico o puede incluir un grupo de enlace entre la etiqueta y el miembro del par de unión específico. Otros miembros del sistema productor de señal también pueden unirse covalentemente a miembros de pares de unión específicos. Por ejemplo, dos miembros del sistema productor de señal, como un fluorescente y un desactivador, pueden unirse a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el factor de coagulación. La formación del complejo acerca el fluoroscador y el desactivador, lo que permite que el desactivador interactúe con el fluoroscador para producir una señal.

50 Los ensayos discutidos anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio regulado acuoso a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El pH para el medio de ensayo estará generalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5. El pH generalmente será un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específico, y el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, como los miembros de un sistema productor de señal, por ejemplo. Se pueden usar varios reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el período de incubación. Reguladores ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, TUBOS, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINA y similares. Se pueden emplear diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de reguladores y conservantes, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, se pueden incluir proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; y potenciadores de unión, por ejemplo. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr el efecto o la función deseados.

En algunas realizaciones, el uno o más marcadores detectables comprenden etiquetas fluorescentes. Las etiquetas fluorescentes pueden detectarse mediante una serie de técnicas conocidas en el arte que incluyen, pero no se limitan a, inmunofluorescencia directa, FACS, inmunotransferencia o cualquier combinación de las mismas.

5 El número de etiquetas fluorescentes utilizadas depende, en parte, del método de detección empleado y permite distinguir las CTC de las células normales.

10 En algunas realizaciones, se pueden usar cuatro etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, el anticuerpo que se une a la vimentina, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en las células endoteliales pueden tener todos diferentes etiquetas fluorescentes. Cuando se detecta por inmunofluorescencia, las diferentes etiquetas fluorescentes pueden ser excitadas por diferentes longitudes de onda de luz de modo que cada anticuerpo se detecte en un canal diferente.

15 En otras realizaciones, se pueden usar tres etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, el anticuerpo que se une a la vimentina y el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede tener una primera etiqueta fluorescente, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos puede tener una segunda etiqueta fluorescente, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede tener una tercera etiqueta fluorescente.

20 Cuando se detecta por inmunofluorescencia, el anticuerpo que se une a la vimentina y el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes se puede detectar en un primer canal, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos se puede detectar en un segundo canal, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales se puede detectar en un tercer canal.

25 Alternativamente, el anticuerpo que se une a la vimentina puede tener una primera etiqueta fluorescente, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede tener una segunda etiqueta fluorescente, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en glóbulos blancos junto con el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede tener una tercera etiqueta fluorescente. Cuando se detecta por inmunofluorescencia, el anticuerpo que se une a la vimentina se puede detectar en un primer canal, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes se puede detectar en un segundo canal, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en glóbulos blancos junto con el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales se puede detectar en un tercer canal.

30 En otras realizaciones más, se pueden usar dos etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, el anticuerpo que se une a la vimentina y el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede tener una primera etiqueta fluorescente, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede tener una segunda etiqueta fluorescente. Cuando se detecta por inmunofluorescencia, el anticuerpo que se une a la vimentina junto con el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede detectarse en un primer canal, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos junto con el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales se puede detectar en un segundo canal.

40 Las señales también se pueden generar a partir de la pluralidad de anticuerpos mediante técnicas indirectas. Las técnicas indirectas no requieren que la pluralidad de anticuerpos tenga una etiqueta. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la detección es inmunofluorescencia indirecta que comprende incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia. Por lo tanto, después de incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos que comprenden un anticuerpo que se une a la vimentina, un anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC, un anticuerpo que se une a un marcador expresado en WBC y un anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales, la muestra se incuba adicionalmente con una pluralidad de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia que se unen a la pluralidad de anticuerpos.

45 El número de tipos de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia depende, en parte, del método de detección y permite distinguir las CTC de las células normales. En algunas realizaciones, la pluralidad de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia puede contener cuatro tipos de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia, de modo que el anticuerpo que se une a la vimentina puede unirse a un primer anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en células tumorales circulantes pueden estar unidas por un segundo anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en glóbulos blancos puede estar unido por un tercer anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede estar unido por un cuarto anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Cuando se detecta por inmunofluorescencia indirecta, las diferentes etiquetas fluorescentes pueden ser excitadas por diferentes longitudes de onda de luz de modo que cada anticuerpo se detecte en un canal diferente.

50 En otras realizaciones, la pluralidad de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia puede contener tres tipos de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia. Por ejemplo, el anticuerpo que se une a la vimentina y el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede unirse a un primer

anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos puede unirse a un segundo anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede unirse a un tercer anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Cuando se detecta por inmunofluorescencia, el anticuerpo que se une a la vimentina y el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes se puede detectar en un primer canal, el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos se puede detectar en un segundo canal, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales se puede detectar en un tercer canal.

Alternativamente, el anticuerpo que se une a la vimentina puede unirse a un primer anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede estar unido a un segundo anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en glóbulos blancos y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede unirse a un tercer anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Cuando se detecta por inmunofluorescencia, el anticuerpo que se une a la vimentina se puede detectar en un primer canal, el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes se puede detectar en un segundo canal, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en glóbulos blancos junto con el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales se puede detectar en un tercer canal.

En otras realizaciones más, la pluralidad de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia puede contener dos tipos de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia. Por ejemplo, el anticuerpo que se une a la vimentina y el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede unirse a un primer anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, mientras que el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales puede unirse por un segundo anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Cuando se detecta por inmunofluorescencia, el anticuerpo que se une a la vimentina junto con el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes puede detectarse en un primer canal, y el anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos junto con el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales se puede detectar en un segundo canal.

En algunas realizaciones, la inmunofluorescencia indirecta puede realizarse usando amplificación de señal de tiramida (TSA) como se describe en el manual del kit TSA de Perkin Elmer and Wang, G., Achim, C.L., Hamilton, R.L., Wiley, C.A., y Soontornniyomkij, V. Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy. *Methods*. 1999 Aug; 18(4):459-64. Briefly, TSA. En resumen, se puede incluir TSA en el ensayo de CTC incubando las células filtradas y fijadas con un anticuerpo primario de conejo en la diana que puede ser amplificado más otros anticuerpos de ratón conjugados. A continuación, los portaobjetos pueden incubarse con un anticuerpo secundario anti-HRP de conejo, seguido de incubar los portaobjetos con tiramina-Alexa488 para realizar la amplificación de la señal.

La inmunocitoquímica (ICC) se puede emplear para detectar la pluralidad de anticuerpos, ya sea por inmunofluorescencia directa o indirecta. Por ejemplo, la muestra del paciente puede colocarse sobre un soporte sólido y tratarse para fijar las células y/o permeabilizar las células, si se desea. La fijación de la muestra del paciente inmoviliza las células, preservando la estructura celular y manteniendo las células en una condición similar a la correspondiente *in vivo*, lo que permite que las células sean reconocidas por un anticuerpo específico. La cantidad de fijador empleado es la que conserva las células pero no conduce a resultados erróneos en un ensayo posterior. La cantidad de fijador depende de una o más de la naturaleza del fijador y la muestra, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad de fijador es de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.15% o de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0,10%, o de aproximadamente 0.10% a aproximadamente 0.15% en volumen de la muestra de sangre. Los agentes para llevar a cabo la fijación de CTC incluyen, entre otros, agentes de reticulación tales como un reactivo de aldehído (por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído); un alcohol (por ejemplo, alcoholes C1-C5 tales como metanol, etanol e isopropanol); una cetona (por ejemplo, una cetona C3-C5 como la acetona). Las designaciones C1-C5 o C3-C5 se refieren al número de átomos de carbono en el alcohol o la cetona. Se pueden llevar a cabo uno o más pasos de lavado en las células fijas usando un medio acuoso regulado.

Si es necesario después de la fijación, la muestra puede ser sometida a permeabilización. En algunos casos, un agente de fijación como un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol) o una cetona (por ejemplo, acetona) también da como resultado la permeabilización y no es necesaria ninguna etapa de permeabilización adicional. La permeabilización proporciona acceso a través de la membrana celular a marcadores de interés. La cantidad de agente de permeabilización empleada es la que interrumpe la membrana celular y permite el acceso al marcador. La cantidad de agente de permeabilización depende de factores que incluyen la naturaleza del agente de permeabilización. En algunos ejemplos, la cantidad de agente de permeabilización es de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.3%, o aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.2%, o aproximadamente 0.2% a aproximadamente 0.5%, o aproximadamente 0.2% a aproximadamente 0.4%, o aproximadamente 0.2% a aproximadamente 0.3%. Los agentes para llevar a cabo la permeabilización de la muestra incluyen, pero no se limitan a, un alcohol (por ejemplo, alcoholes C1-C5 tales como metanol y etanol); una cetona (por ejemplo, una cetona C3-C5 tal como acetona); un detergente (por ejemplo, saponina, TRITON® X-100, and TWEEN®-20). Se pueden llevar a cabo uno o más pasos de lavado en las células permeabilizadas usando un medio acuoso regulado.

Después de la fijación y la permeabilización, la muestra puede ponerse en contacto con un medio acuoso que contiene la pluralidad de anticuerpos. El medio acuoso puede ser un medio de ensayo como se describe anteriormente y la cantidad de cada anticuerpo marcado es la suficiente para identificar cada uno de los marcadores de interés. En algunos ejemplos, la cantidad de cada anticuerpo marcado puede exceder la cantidad sospechada de marcador. Las células pueden incubarse con los anticuerpos marcados en condiciones que permitan la unión del anticuerpo marcado a sus respectivos marcadores. Dichas condiciones se analizan anteriormente con respecto a los ensayos en general. Después de la incubación, la muestra puede someterse a uno o más pasos de lavado usando un medio regulado acuoso para eliminar los anticuerpos marcados no unidos.

Una tinción de ADN fluorescente como, por ejemplo, 4', 6-diamidino-2-fenilindol, yoduro de propidio, bromuro de etidio, SYBR® Green I, VISTRA™ GREEN, SYTO® GREEN, SYBR® Gold, YO-PRO-1™, TOTO-3™, TO-PRO-3™, NUCLEAR-ID™ Red, o colorante Hoechst, pueden emplearse para mejorar el contraste en la imagen de la muestra durante el examen microscópico. Después de la tinción, se pueden llevar a cabo uno o más pasos de lavado en las células usando un medio acuoso regulado. Las células se pueden examinar utilizando un microscopio fluorescente y cada uno de los diferentes marcadores fluorescentes se puede utilizar en la detección directa de un marcador respectivo en la muestra.

Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos donde los anticuerpos respectivos se detectan indirectamente con un segundo anticuerpo, que está marcado con una enzima, o directamente marcado con una enzima en un método de amplificación enzimática. Una enzima respectiva como, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante (HRP) se puede detectar por los medios apropiados. Por ejemplo, mediante la generación enzimática de una señal fluorescente, óptica o quimioluminiscente respectiva, se puede generar un marcador enzimático respectivo en un colorante unido covalentemente a grupos de proteína tirosina en presencia de HRP (como la Amplificación de la Señal de la Tiramida (TSA™), Perkin Elmer). Los miembros de unión específicos pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para cada uno de los anticuerpos no marcados respectivos usados para unirse a un marcador respectivo.

Las células se pueden examinar utilizando un microscopio fluorescente y se puede utilizar cada uno de los diferentes marcadores fluorescentes en la detección directa de los respectivos marcadores.

La detección de positivos falsos en la muestra comprende identificar células individuales que tienen una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une al otro marcador expresado en las células tumorales circulantes, o ambas, junto con una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en las células endoteliales. En algunas realizaciones, la detección de positivos falsos en la muestra comprende identificar células individuales que tienen una señal del anticuerpo que se une a la vimentina junto con una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en las células endoteliales. En algunas realizaciones, la detección de positivos falsos en la muestra comprende identificar células individuales que tienen una señal del anticuerpo que se une al otro marcador expresado en CTC junto con una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en las células endoteliales. En otras realizaciones más, la detección de positivos falsos en la muestra comprende identificar células individuales que tienen una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une al otro marcador expresado en las CTC junto con una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en las células endoteliales.

Confirmar la presencia de una célula tumoral circulante en la muestra comprende identificar una o más células que tienen una señal del anticuerpo que se une a la vimentina y una señal del anticuerpo que se une al otro marcador expresado en CTC, pero no una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en los glóbulos blancos, una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en las células endoteliales, o ambas.

Cuando se usa inmunofluorescencia directa o indirecta, se pueden identificar positivos falsos o CTC superponiendo/fusionando las señales de los diversos canales utilizados (2, 3 o 4 dependiendo del número de etiquetas fluorescentes). Por ejemplo, una célula que fluoresce en el canal utilizado para detectar el anticuerpo que se une a la vimentina y el canal utilizado para detectar el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC pero no en el canal utilizado para detectar el anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales es una CTC. Esto representa una señal específica para las CTC. Por otro lado, una célula que fluoresce en el canal utilizado para detectar el anticuerpo que se une a la vimentina, en el canal utilizado para detectar el anticuerpo que se une a otro marcador expresado en CTC, así como en el canal utilizado para detectar el anticuerpo que se une a un marcador expresado en las células endoteliales es un positivo falso, es decir, una célula normal.

La cantidad de señal obtenida en cualquiera de los métodos proporcionados aquí puede compararse con un umbral para evaluar la precisión de los resultados. Como se usa en el presente documento, el término "umbral" significa el punto en donde una señal es detectable sobre un ruido, en donde el ruido es la señal de fondo de la técnica de detección. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la señal del anticuerpo que se une a la vimentina y la señal del anticuerpo que se une a otro marcador en las CTC están preferiblemente por encima de un umbral. En otras realizaciones, la señal del anticuerpo que se une a un marcador en los WBC y la señal del anticuerpo que se une a un marcador en las células endoteliales están preferiblemente por debajo de un umbral. Los umbrales de señal de células endoteliales y WBC pueden establecerse usando un control negativo con WBC y células endoteliales, respectivamente. El umbral de señal de CTC se puede determinar usando un control positivo, que incluye WBC y/o células endoteliales cultivadas que se fijan con un marcador de CTC. Las señales por debajo del umbral se pueden

establecer en cero. Los umbrales son específicos para la calidad del grado de separación de unión de las etiquetas no unidas, y dependen del método de enriquecimiento utilizado.

5 Las células de control incluyen las de origen endotelial, incluidas, entre otras, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), las células endoteliales de los vasos grandes humanos (HLVEC) y las células endoteliales de los vasos pequeños humanos (HSVEC), por ejemplo, incluidas en el ATCC® y otra colección de bancos celulares de líneas celulares endoteliales primarias y transformadas de una variedad de especies. Las células cancerosas de origen epitelial incluyen, entre otras, carcinoma de células de mama (SKBR-3, SKBR-5, MDA, Hs 849.T, HTB30), adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas (N2228), astrocitoma cerebral (CCF- STTG1, SW 1783), adenocarcinoma de cuello uterino (HeLa), adenocarcinoma de colon (H329, GH354, COLO 824), adenocarcinoma de páncreas (KLE, HPAC), adenocarcinoma de células renales (786-O, 769-P, MIA), células de carcinoma de próstata (MDA PCa, LNCaP), células de carcinoma pancreático (PaCa-2), carcinoma de vejiga (HT-1376, Hs 228.T), carcinoma colorrectal (SNU-C2B, LS411N), carcinoma hepatocelular (SNU-449, C3A), faringe escamosa carcinoma de células (FaDu), células de carcinoma de vejiga de transición (SW 7801), melanoma (CHL-1) y otros incluidos en las colecciones de ATCC® y otros bancos de células. ATCC® tiene aproximadamente 1100 líneas celulares tumorales de una variedad de especies. Las células cancerosas de origen mesenquimatoso incluyen, entre otras, tejido conectivo de fibrosarcoma (15.T), ganglios linfáticos de linfosarcoma (TE 175.T), adenocarcinoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (H226), osteosarcoma (143.98.2), junto con otros estromas, células madre y sarcoma, y otros que figuran en el ATCC® y otras colecciones de bancos de células. Las células de origen sanguíneo incluyen las de sangre de donantes sanos, así como la sangre del paciente, incluida, entre otras, leucemia, médula ósea, mieloblastos (KG-1), leucemia monocítica aguda (THP-1), leucemia aguda de células T (J.CaM1.6), leucemia promielocítica aguda (15 HL-60), linfoma (1A2), y otros que figuran en el ATCC® y otras colecciones de bancos de líneas celulares de origen sanguíneo.

25 En algunas realizaciones, los métodos descritos comprenden además correlacionar la señal específica de las células tumorales circulantes con una carga tumoral. Como se usa en el presente documento, el término "carga tumoral" se refiere a la cantidad de células cancerosas, el tamaño del tumor o la cantidad de cáncer en el paciente. Por ejemplo, después de evaluar o confirmar la presencia de CTC, las CTC se pueden contar cuando la señal del anticuerpo que se une a la vimentina y la señal del anticuerpo que se une a otro marcador en las CTC están por encima de un umbral, y la señal del anticuerpo que se une a un marcador en los glóbulos blancos y la señal del anticuerpo que se une a un marcador en las células endoteliales están por debajo de un umbral.

30 Antes de incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos, la muestra del paciente puede tratarse para enriquecer la concentración de células tumorales circulantes. El enriquecimiento de la concentración de CTC en una muestra de un paciente puede lograrse mediante cualquier número de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, filtración. La filtración se puede lograr utilizando una o más de las siguientes fuerzas: centrifugación, presión, vacío, fuerzas hidrostáticas capilares, ultracentrifugación, gradiente térmico diferencial y fuerzas electroforéticas, por ejemplo. La filtración implica poner en contacto la muestra con una matriz porosa, generalmente bajo presión de vacío. En algunos ejemplos, la matriz porosa puede ser parte de un módulo de filtración donde la matriz porosa es parte de un conjunto para un uso conveniente durante la filtración ("conjunto de filtración de matriz porosa"). La matriz porosa puede ser una membrana, película o estructura de microfluidos que tiene poros u obstáculos a través de los cuales fluye líquido a través de las células. Las técnicas de filtración incluyen, entre otras, microfiltración, ultrafiltración, filtración de flujo cruzado o cualquier combinación de las mismas.

45 Friedrich, et al., en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2012/0315664 ("Publicación de solicitud de patente 664) describen un ejemplo de un conjunto de filtración por matriz porosa, a modo de ilustración y sin limitación. La publicación de la solicitud de patente '664 describe un conjunto y un método para la filtración de un líquido. Un cuerpo de soporte está diseñado en un hueco de un portador y una membrana de filtro se encuentra plana sobre el cuerpo de soporte. La membrana del filtro y el cuerpo de soporte están diseñados para ser permeables a los líquidos y, por lo tanto, sirven como filtros, en particular para filtrar células raras de la sangre. Como resultado de que la membrana del filtro se encuentra nivelada sobre el cuerpo de soporte, el residuo de filtración puede examinarse particularmente bien microscópicamente.

50 El contenedor en donde se recoge la muestra del paciente puede contener un medio de recogida en donde se entrega la muestra. El medio de recogida puede comprender un medio seco y puede comprender una cantidad de agente de desactivación de plaquetas eficaz para lograr la desactivación de plaquetas en una muestra de sangre. El medio de recogida también puede comprender otros agentes que incluyen, pero no se limitan a, un anticoagulante, un agente de fijación, un agente de detención de la formación de fibrina, o cualquier combinación de los mismos, cada uno de los cuales está presente en una cantidad suficiente para lograr la función deseada de los agentes. En algunos ejemplos, una muestra puede tratarse para aglutinar preferentemente CTC sobre células normales para facilitar la separación de CTC de células normales, por ejemplo, durante la filtración.

60 Los agentes de desactivación plaquetaria incluyen, entre otros, quelantes, citrato, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidor del receptor de adenosina difosfato (ADP), inhibidores de la glucoproteína IIB/IIIA, inhibidores de la fosfodiesterasa, inhibidores de la tromboxano e inhibidores de la recaptación de la adenosina. Los agentes quelantes incluyen agentes quelantes que comprenden una unidad estructural de ácido triacético o una sal del mismo, una unidad estructural ácido tetraacético o una sal del mismo, una unidad estructural ácido pentaacético o una sal del mismo, o

- una unidad estructural ácido hexaacético o una sal del mismo. En algunos ejemplos, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales o tetraacetato de etilenglicol (EGTA) y sus sales. La cantidad efectiva de agente de desactivación de plaquetas depende de factores tales como la naturaleza del agente de desactivación de plaquetas, la naturaleza de la muestra de sangre, el nivel de activación de plaquetas y la fuerza iónica. En algunos ejemplos, la cantidad de EDTA seco en el recipiente es la que producirá una concentración de aproximadamente 1.0 mg/mL a aproximadamente 2.0 mg/mL de sangre, o aproximadamente 1.5 mg/mL de sangre. La cantidad del agente de desactivación de plaquetas es la que es suficiente para lograr al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 99% de desactivación de plaquetas.
- Un agente que detiene la formación de fibrina es una sustancia que, cuando se combina con la muestra de sangre, detiene la formación de fibrina en la superficie de las CTC, que se forma como resultado de proteínas de coagulación naturales en la muestra de sangre, como por ejemplo, fibrinógeno. Tales agentes que detienen la formación de fibrina incluyen, pero no se limitan a, agentes de desactivación de plaquetas, anticoagulantes y agentes de fijación.
- Los anticoagulantes incluyen, entre otros, inhibidores del Factor VII, inhibidores del Factor X, inhibidores directos de la trombina, cumarinas, heparina y proteínas antitrombina.
- Los agentes de fijación incluyen, pero no se limitan a, sustancias que actúan para entrecruzar proteínas y/o desactivar enzimas proteolíticas y prevenir la generación natural de fibrina. En algunos ejemplos, el agente de fijación es un reactivo aldehído (como, por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído) y ureas (como, por ejemplo, diazolidinilurea o imidazolidinilurea).
- La matriz porosa puede ser un material sólido o semisólido y puede estar compuesta de un material orgánico o inorgánico, insoluble en agua. La matriz porosa puede tener cualquiera de una serie de formas que incluyen tubular (por ejemplo, fibra hueca, espiral enrollada y fibra fina hueca), superficie grabada en huella o plana o aplanada (por ejemplo, tira, disco, película, membrana y placa). La matriz puede fabricarse a partir de una amplia variedad de materiales, que pueden ser naturales o sintéticos, poliméricos o no poliméricos, fibrosos o no fibrosos, que incluyen, entre otros, celulosa (incluido papel), nitrocelulosa, acetato de celulosa, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli-(4 metilbuteno), poliestireno, poli(metacrilato), poli(tereftalato de etileno), nylon y poli(butirato de vinilo), material cerámico, material metálico o cualquier combinación de los mismos.
- El tamaño de los poros de la matriz porosa es el que es suficiente para retener preferentemente CTC mientras permite el paso de células normales a través de los poros. El tamaño de los poros de la matriz porosa depende, por ejemplo, del tamaño de las células normales, y la presión aplicada a la muestra, como una muestra de sangre. En algunos ejemplos, el tamaño promedio de los poros de la matriz porosa es de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 75  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 75  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo. La densidad de poros en la matriz porosa es de aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 50% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 70%, por ejemplo.
- Se puede aplicar presión a la muestra en la matriz porosa para facilitar el paso de las células normales a través de la membrana. El término "presión" se refiere a diferencias de presión con respecto a la presión atmosférica normal y puede ser presión positiva (aumento de la presión relativa a la presión atmosférica normal) o presión negativa (vacío) (disminución de la presión relativa a la presión atmosférica normal). El nivel de presión aplicado depende, por ejemplo, de una o más de la naturaleza y el tamaño de las células no raras, el tamaño de la, la naturaleza de la matriz porosa y el tamaño de los poros de la matriz porosa. En algunos ejemplos, el nivel de presión positiva aplicada es de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 500 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 400 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 300 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 200 milibar, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 100 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 50 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 25 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 20 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 15 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibar, o aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 30 milibar, o aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 25 milibar, o aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 20 milibar, o aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 15 milibar, o aproximadamente 5 milibar a unos 10 milibares, por ejemplo. El nivel de presión negativa (vacío) aplicado es el negativo de los rangos anteriores.
- En algunas realizaciones, la presión aplicada a la muestra sobre la matriz porosa puede ser una presión oscilante. "Presión oscilante" se refiere a una presión aplicada intermitentemente a intervalos regulares o irregulares, que puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 250 segundos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 100 segundos, o aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 50 segundos, o aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 600 segundos, o aproximadamente 10 segundos

a aproximadamente 500 segundos, o aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 250 segundos, o aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 100 segundos, o aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 50 segundos, o aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 600 segundos, o aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 500 segundos, o aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 250 segundos, por ejemplo. En este enfoque, la presión puede oscilar a aproximadamente 0 milibares a aproximadamente 10 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 7.5 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 5.0 milibares, o aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 2.5 milibares, por ejemplo, durante parte o la totalidad de la aplicación de presión a la muestra de sangre. La presión oscilante se logra mediante un interruptor de encendido y apagado, por ejemplo, y puede realizarse de forma automática o manual. Se permiten altas caídas de presión dependiendo de uno o más del volumen del depósito, el volumen de la muestra y la tasa de filtración.

La muestra puede ponerse en contacto con una matriz porosa de modo que las CTC se retengan preferentemente en la matriz porosa y las células normales pasen a través de la matriz porosa. En algunas realizaciones, la muestra puede diluirse con un medio de dilución antes del contacto con la matriz porosa. El medio de dilución puede comprender un medio acuoso, que puede estar regulado. El pH para un medio regulado acuoso suele ser un pH moderado. En algunos ejemplos, el pH del medio de dilución es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, o pH fisiológico, por ejemplo. Se pueden usar varios reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante cualquier período de incubación. Los reguladores ilustrativos incluyen, entre otros, borato, fosfato (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato), carbonato, TRIS, barbital, TUBOS, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINA. La cantidad de medio de dilución combinada con la muestra depende de uno o más de varios factores, tales como, por ejemplo, la naturaleza de la matriz porosa y la naturaleza de la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad de medio de dilución es de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 100 mL, o de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 80 mL, o de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 60 mL, o de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 50 mL, o de aproximadamente 5 mL a aproximadamente 30 mL, o aproximadamente 5 mL a aproximadamente 20 mL, o aproximadamente 5 mL a aproximadamente 10 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 100 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 80 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 60 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 50 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 30 mL, o aproximadamente 10 mL a aproximadamente 20 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 100 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 80 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 60 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 50 mL, o aproximadamente 20 mL a aproximadamente 30 mL, por ejemplo, en base a 10 mL de la muestra.

La muestra puede ponerse en contacto con la matriz porosa durante un período de tiempo suficiente para lograr un enriquecimiento de las CTC en células normales en la matriz porosa. El período de tiempo depende, por ejemplo, de una o más de la naturaleza y el tamaño de las células normales, el tamaño de las CTC, la naturaleza de la matriz porosa, el tamaño de los poros de la matriz porosa, el nivel de presión aplicada a la muestra de sangre en la matriz porosa, el volumen que se va a filtrar y el área de superficie del filtro. En algunos ejemplos, el período de contacto es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, o aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, por ejemplo.

El aumento deseado en la proporción de CTC a células normales en la muestra puede ser al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 75 veces, o al menos aproximadamente 100 veces, o al menos aproximadamente 200 veces en comparación con la muestra original. En algunos ejemplos, el aumento de la proporción de CTC a células normales que se desea es de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 200 veces, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 150 veces, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 25 veces a aproximadamente 100 veces, o aproximadamente 50 veces hasta aproximadamente 100 veces, por ejemplo.

En otras realizaciones más, los métodos descritos comprenden además aislar las células tumorales circulantes de la muestra. Por ejemplo, después de confirmar la presencia de CTC, las CTC pueden aislarse de la muestra para, por ejemplo, análisis adicionales o pruebas de tratamiento. Se pueden usar numerosas técnicas para aislar las CTC de la muestra, que incluyen, entre otros, partículas magnéticas, filtración, citometría de flujo, canales y cámaras de microfluidos, o cualquier combinación de los mismos.

Cualquiera de los métodos de detección de una muestra de un paciente en un ensayo de CTC y los métodos para realizar ensayos de detección de CTC descritos en este documento pueden usarse para la detección de positivos falsos en los métodos de tratamiento descritos.

## 60 Ejemplos

Materiales

Todos los productos químicos se pueden comprar de Sigma-Aldrich Company (St. Louis MO) a menos que se indique lo contrario.

Abreviaturas

- 5 Aquí se usan las siguientes abreviaturas: mL = mililitro;  $\mu$ L = microlitro; mg = miligramo;  $\mu$ m = micrón(s); min = minuto (s); h = hora(s); rpm = revoluciones por minuto; PBS = solución salina regulada con fosfato como Ambion PBS pH 7.4 Producto Thermo Scientific número 158-0020; K<sub>3</sub>EDTA = sal de potasio de etilendiaminotetraacetato; ATCC = American Type Culture Collection.

Recolección de muestras de personas sanas y pacientes con cáncer.

- 10 Las muestras de sangre completa para la prueba se prepararon mediante la recolección de sangre de donantes normales que carecen de células raras/enfermas (es decir, células cancerosas) y de donantes de enfermedades con cáncer metastásico y células tumorales circulantes. Las muestras de sangre (7-10 mL) se recogieron en tubos de recogida de sangre que contenían K<sub>3</sub>EDTA y Transfix de 0.45 ml (VacutestKima TVT-09-50-45). Los glóbulos blancos fueron aproximadamente 10<sup>7</sup> por 10 mL de sangre y los glóbulos rojos fueron aproximadamente 5x10<sup>10</sup> por 10 mL de sangre.
- 15

Preparación de controles celulares

- Las células se cultivaron en cultivo usando los medios de crecimiento recomendados. La línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3 (ATCC® HTB-30) se cultivó en IMDM modificado (HYCLONE®) (Pierce/ThermoScientific, Rockford IL) más 15% de FBS (HYCLONE®). La línea celular de cáncer de pulmón humano NCI H226 (ATCC® CRL-5826) se cultivó en FBS + RPMI-1640 al 10% (HYCLONE®). La línea celular de células endoteliales de vena umbilical humana primaria (HUVEC) (ATCC® PCS-100-010) se cultivaron en medio basal ENDOGRO® (Millipore Corporation, Billerica MA). Todas las siguientes operaciones se llevaron a cabo bajo estrictas condiciones asépticas. Las células en 6 mL de medio completo se dispensaron en matraces de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, cada uno con 3 mL de medio completo. El cultivo se incubó a 37°C en una incubadora adecuada con 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera de aire. Las células se subcultivaron dos o tres veces por semana. Cuando el cultivo fue confluyente, se retiró el medio de cultivo, la capa celular se lavó con 5 mL de 1 x PBS y se trató con tripsina, y los cultivos celulares se dividieron.
- 20
- 25

- Las células cultivadas se contaron mezclando 30  $\mu$ L de solución de azul de tripano (0.4%) y 10  $\mu$ L de células y leyendo en un hemocitómetro o leyendo la suspensión celular sin diluir. Por lo general, las células a 10<sup>5</sup>/mL se transfirieron a tubos de muestras de sangre vacíos y limpios y se lavaron con 10 mL de sangre completa de donantes sanos recogidos en tubos de recolección de sangre que contenían K<sub>3</sub>EDTA y 0.45 ml de Transfix (VacutestKima TVT-09-50-45). Los controles se realizaron con 0, 5 y a niveles adicionales entre 20 y 300 células/tubo de sangre. Los valores esperados se asignaron a estas muestras para su uso en la medición de la recuperación de las células.
- 30

Filtración y tinción de muestras de pacientes y muestras de control

- Dentro de los 5 días posteriores al almacenamiento a 25°C, las muestras de sangre se filtraron a través de una membrana que tenía un tamaño de poro promedio de 8  $\mu$ m de acuerdo con un método divulgado en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2012/0315664. Durante la filtración, la muestra en la membrana se sometió a un mBar negativo, es decir, una disminución mayor de aproximadamente 30 mBar con respecto a la presión atmosférica. El vacío aplicado varió de 1 a 30 mBar a medida que el volumen de la muestra se reduce durante la filtración. Se permitieron altas caídas de presión dependiendo del depósito y el volumen de muestra y la velocidad de filtración. Justo antes de la filtración, se transfirió una muestra (7-10 mL) a un tubo Falcon de 50 mL, que se llenó hasta 20 mL con PBS frío con 0.2 a 10 mg/L de fibrina añadida. Los tubos Falcon se volcaron manualmente dos veces y se sometieron a centrifugación durante 10 minutos a 400 x g a 20°C. La muestra diluida se colocó en la estación de filtración sin mezclar y la muestra diluida se filtró a través de la membrana. Después de la filtración, la membrana se lavó con PBS, y la muestra se fijó con formaldehído, se lavó con PBS, se sometió a permeabilización usando Triton® X100 al 0.2% en PBS y se lavó nuevamente con PBS.
- 35
- 40
- 45

- Las células capturadas en la membrana se detectaron con un procedimiento de inmunocitoquímica (ICC) basado en la unión de anticuerpos específicos a proteínas o antígenos específicos en las células. Se dispuso un regulador de bloqueo de caseína al 10% en PBS sobre la membrana. Después de un período de incubación de 5 minutos, la membrana se lavó con PBS para bloquear la unión no específica a la membrana. A continuación, se dispuso una mezcla de anticuerpo conjugado a la membrana seguida de un período de incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de conjugados de anticuerpos (en 10% de caseína en PBS) utilizados en este ejemplo incluía anticuerpos de células anticancerígenas (reactivos a Vimentina, CK8/18 y 19) conjugados con DyLight 550 (ThermoScientific Inc. Rockford, IL) a 15  $\mu$ g/mL, y el anticuerpo anti-CD45 (usado para WBC) conjugado con DyLight 650 a 20 $\mu$ g/mL. La mezcla de conjugados de anticuerpos también incluía anticuerpo de células anti-endoteliales (reactivo a CD144, ZO1 o CD105) conjugado con DyLight 488 a 15  $\mu$ g/mL. El anticuerpo no unido se lavó (PBS + Tween® 20 al 0.05%) y se añadió DAPI (0.8  $\mu$ g/mL en PBS), una tinción de ADN fluorescente, para teñir los núcleos de las células. Se realizó un último paso de lavado con PBS, seguido de medios de cobertura para ayudar a preservar
- 50
- 55

la intensidad fluorescente de las sondas. Los portaobjetos se hicieron con DABCO como medio de cobertura (0.25 g de DABCO a 9 mL de glicerol y 1 ml de 10 x PBS).

#### Metodología para medición

5 Los portaobjetos se colocaron en un portaobjetos de un microscopio fluorescente (Leica DM5000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania)) donde se capturaron imágenes durante el escaneo automático de la membrana para cada una de las sondas fluorescentes utilizadas para la detección de células objetivo. Los conjugados de anticuerpos se unieron a la proteína o antígeno de una célula, y las etiquetas fluorescentes se detectaron usando un microscopio fluorescente con filtros de excitación, emisión y corte específicos para cada etiqueta. Luego, las células se caracterizaron escaneando la membrana mediante microscopía de fluorescencia realizada con un Leica DM5000  
10 usando los conjuntos de filtros para las etiquetas de fluoróforo respectivas usadas en los conjugados de anticuerpos anteriores (a saber, DyLight 480, DyLight 550 y DyLight 650, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA) y DAPI. Las múltiples etiquetas fluorescentes, cada una con diferentes anticuerpos específicos de tipo celular, se usaron para detectar múltiples antígenos o proteínas en las células aisladas. El proceso de filtración permite que todas las señales se midan simultáneamente. La medición de una cantidad de señal obtenida en cualquiera de los tipos de células se correlacionó con el nivel de enfermedad en el sujeto. Esta medición se explica más completamente de la siguiente manera: para determinar primero si la célula es de interés utilizando un marcador CTC con una señal distinta separada y en comparación con un marcador no CTC en una segunda o tercera señal distinta separada. Las CTC se cuentan cuando la señal CTC está por encima de un umbral y la señal que no es CTC está por debajo de un umbral para las etiquetas de CTC. Los no CTC se cuentan cuando la señal no CTC está por encima de un umbral y la señal CTC está  
20 por debajo de un umbral para las etiquetas no CTC. El umbral se define como el punto en donde la señal es detectable sobre el ruido (es decir, la señal de fondo en la matriz de filtración). Estos umbrales se establecen utilizando tipos de células conocidas como células de control, incluidas las células endoteliales de la Vena Umbilical Humana (HUVEC), las del endotelio, las células cancerosas de origen epitelial, incluidas las células de carcinoma de mama (SKBR-3) y el adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas (H226), células cancerosas de origen mesenquimatoso. Estas células se compararon con las células normales de origen sanguíneo, las de sangre de donantes sanos.

Se seleccionó un umbral de señal separado para cada determinación de si una célula es una CTC, una no CTC o si una CTC tiene características de células endoteliales circulantes adicionales. El umbral de la señal no CTC se establece utilizando un control negativo de un paciente sano con células no endoteliales circulantes y no CTC. El CTC y los umbrales de señal de características adicionales se determinan utilizando un control positivo con CTC no cultivados y CTC que se fijan con la característica adicional. Las señales por debajo del umbral se establecen en cero. La muestra desconocida se procesa y solo las señales de características adicionales por encima del umbral medido en celdas que son CTC positivas y las células negativas no CTC se consideran un indicador positivo de una célula que tiene una característica adicional.

#### Recuperación de CTC utilizando filtración

35 La FIGURA 1 representa un gráfico lineal que muestra la recuperación de CTC usando células cancerosas fijas de cultivo de tejidos añadidas a sangre de donantes sanos. Las muestras de sangre de pacientes con cáncer se filtraron y analizaron usando anticuerpos contra vimentina (rojo) y CK8/18/19 (rojo) como marcadores de células cancerosas, y anticuerpos contra CD45 (púrpura) como marcador de glóbulos blancos. Se usó DAPI para teñir los núcleos celulares. (FIGURA 2). Como se muestra en las FIGURAS 2A, 2B, 2C y 2D, las muestras de pacientes con cáncer  
40 contenían células que se tiñeron de rojo, lo que sugiere la presencia de células cancerosas después del procedimiento de filtración. La recuperación de las células cancerosas se evaluó analizando muestras de sangre de donantes sanos enriquecidos con un número conocido de células cancerosas procedentes de cultivos de tejidos. Las muestras se filtraron y se contó el número de células cancerosas en cada muestra. La tinción se examinó como se hizo en la FIGURA 2. El enriquecimiento de las CTC se midió contando las CTC (ya sea CK o vimentina positivo) y comparando con el recuento del WBC normal (CD45 positivo) restante en la membrana. Los glóbulos rojos se lisaron o pasaron a través de la membrana; todos las CTC fueron capturados en la membrana. La FIGURA 1 muestra una recuperación lineal de CTC a > 90%.

#### Evaluación de marcadores de células cancerosas

50 Para identificar los anticuerpos contra el cáncer apropiados en el ensayo CTC, las células de control para determinados tipos de cáncer se seleccionaron frente a anticuerpos reactivos a marcadores de cáncer y se marcaron con Dylight 550. Los anticuerpos contra citoqueratinas 8/18/19 fueron reactivos a líneas celulares de carcinoma, células de carcinoma de mama (SKBR), y adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas (H226). Los anticuerpos de vimentina fueron reactivos al adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas (H 226) y SKBR. Las señales obtenidas con las células de control permitieron determinar los umbrales de las células cancerosas en comparación  
55 con el WBC normal en las muestras. (Datos no mostrados)

#### Evaluación de marcadores endoteliales para detectar positivos falsos

Para identificar marcadores apropiados que pueden usarse para la identificación de células endoteliales circulantes (CEC) en un ensayo de CTC, se analizaron sangre de donantes sanos (FIGURAS 3A y 3C) y sangre de donantes

5 sanos enriquecidos con células HUVEC (FIGURAS 3B y 3D) utilizando una variedad de anticuerpos contra marcadores de células endoteliales (Tabla 1). Las muestras se analizaron con anticuerpos contra vimentina (rojo) y CK8/18/19 (rojo) como marcadores de células cancerosas, anticuerpos contra CD45 (púrpura) como marcador de glóbulos blancos y anticuerpos contra varios marcadores de células endoteliales. Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares. La FIGURA 3, que comprende las FIGURAS 3A, 3B, 3C y 3D, representa una superposición de imágenes de inmunofluorescencia que muestran CEC encontradas en las muestras de sangre. Las células sembradas en HUVEC se muestran en un grupo de muestras de sangre de donantes sanos en 3B y 3D. De los marcadores examinados, CD105 tuvo la respuesta más fuerte a las células de control endotelial (HUVEC). Se realizó una tinción adicional de células mediante tinción con H&E para identificar células endoteliales potenciales que circulan naturalmente en las muestras de pacientes normales (FIGURA 4).

Tabla 1

Marcador	Clon de anticuerpos	CEC naturalmente en sangre de pacientes sanos	HUVEC cultivados añadidos a la sangre de pacientes sanos
Vimentina	V9	++++	+ *
ZO-1	ZO1-1A12	+	+
CD105	MEM-226	+	++++
CD326/EpCAM	B29.1 (VU1D9)	-	-
CD144	F-8	+++	+
	BV9	-	-
	123413	-	-
	123433	-	+
	TEA 1/31	-	++
	MM0012-8A0	-	-
Claudina 5	4C3C2	-	-
ESAM	408159	-	+
VEGFR2	Avia 12alpha1	-	-
Factor von Willebrand	EPSISR15	-	+++
	210905	-	-
	2Q2134	-	+
	MM0601-5F2	-	-
	RFF-VIII R/1	-	-
* Respuesta variable y débil a VIM.			
** Se observó una sola célula con respuesta a claudina 5 pero no a CD45 o CK/vim			

15 Sorprendentemente, los CEC también fueron detectados por vimentina en pacientes con salud normal. Las FIGURAS 3A y 3C representan una superposición de imágenes de inmunofluorescencia que muestran células positivas falsas encontradas en muestras de sangre de donantes sanos sin enriquecer en HUVEC. Las muestras se analizaron con anticuerpos contra vimentina (rojo) y CK8/18/19 (rojo) como marcadores de células cancerosas, y anticuerpos contra CD45 (púrpura) como marcador de glóbulos blancos. Se usó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares. Estas células se tiñeron adicionalmente con H&E para mostrar que no eran WBC. La FIGURA 4, que comprende las FIGURAS 4A, 4B, 4C y 4D, representa la inmunocitoquímica (ICC) usando anticuerpos anti-vimentina y tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de células cancerosas filtradas (A) y (C) y (B) y (D) positivo falsos (A) y (C) Vimentina (arriba a la izquierda), DAPI (arriba a la derecha), superposición de vimentina y DAPI (abajo a la izquierda) y tinción H&E (abajo a la derecha). (B) y (D) Vimentina (arriba a la izquierda), CD45 (arriba a la derecha), vimentina y DAPI (abajo a la izquierda) y tinción H&E (abajo a la derecha).

25 Estas muestras de donantes sanos se seleccionaron con marcadores para la identificación de células endoteliales (Tabla 1). Las muestras se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-vimentina (rojo), anticuerpos monoclonales anti-CD45 (púrpura) y anti-endotelial (verde) (anti-ZO-1 en FIGURAS 5A y 5C y anti-CD144 en FIGURAS 5B y 5D)

anticuerpos monoclonales. CK8/18/19 no se usó para garantizar que la señal fuera específica de vimentina. La respuesta a CD144 y ZO1 indica que las células son CEC. Las células también se tiñeron con DAPI. Como se muestra en las Figuras 5A, 5B, 5C y 5D al superponer las imágenes, las señales rojas, moradas y verdes superpuestas mostraron que las células vimentinas falsas positivas reaccionan a los marcadores endoteliales. Estos datos indican que la vimentina reaccionaría tanto a CTC como a CEC en la muestra.

También fue inesperado el nivel de respuesta de la mayoría de las células endoteliales. La respuesta de CEC en sangre de pacientes sanos fue más débil que la respuesta de HUVEC cultivada. La FIGURA 6 ilustra que CD105 detecta HUVEC pero no CEC nativo, mientras que vimentina detecta CTC nativo pero no HUVEC. Inesperadamente, el marcador de células cancerosas vimentina fue muy positivo para la CCA natural. En contraste, el anticuerpo vimentina V9 y el anticuerpo CD144 F-8 respondieron más fuertemente a la CEC en la sangre del paciente sano que a la célula HUVEC. Estos datos también muestran que el CD144 mediría específicamente CEC, ya que las CTC no fueron positivas para CD144. Las señales obtenidas con las celdas de control permiten la determinación de los umbrales no CTC comparando el WBC con las CTC en las muestras. Se hicieron ajustes a los umbrales para tener en cuenta la estimación excesiva o insuficiente de las células de control a las células nativas de modo que se detectaría la CEC nativa y no el WBC.

Los métodos anteriores pueden emplearse para determinar el potencial de un sujeto mamífero para exhibir enfermedad. La señal obtenida en cualquiera de los métodos de ensayo anteriores para la detección de CTC que comprende una o más características adicionales se puede correlacionar con el potencial de un sujeto mamífero para exhibir enfermedades midiendo las señales CTC y no CTC que identifican las células por encima del umbral de CTC y por debajo el umbral no CTC. La señal de función adicional en la se puede medir si está por encima del umbral positivo. Se pueden contar los números de CTC para cada paciente. Si la señal para la característica está por encima del umbral para la característica, se considera que la celda tiene esta característica. Cuanto mayor sea el aumento en la señal de la función por encima del umbral, mayor será la función para la. Cuanto mayor sea el número de CTC, el número de CTC con características y la extensión de características adicionales, mayor será la correlación del sujeto que exhibe la enfermedad frente a los sujetos que carecen de enfermedad.

Identificación de positivos falsos

La sangre de 9 donantes saludables diferentes se incubó con anticuerpos anti-CK8/18/19 (rojo), anticuerpos anti-CD-144 (verde) y anticuerpos anti-CD-45 (púrpura) con o sin anticuerpos anti-vimentina (rojo), y se evaluó por microscopía. Se observaron células individuales, así como dobletes y agrupaciones a partir de estas muestras. Como se muestra en la Tabla 2, solo las células incubadas con el anticuerpo anti-vimentina aparecieron en el canal rojo, lo que sugiere que el anticuerpo anti-vimentina es la fuente del positivo falso. Si bien no desea limitarse a la teoría, se cree que las células de origen endotelial sorprendentemente causan positivos falsos con vimentina, que pueden descartarse con marcadores específicos para células de origen endotelial (es decir, CD 144 en este ejemplo) y células de origen sanguíneo (es decir, CD45 en este ejemplo).

Tabla 2

Muestra #	Donante #	# células positivas en canal rojo		
		positiva a CK8/18/19 o vimentina	positiva a CK8/18/19	positiva a CK8/18/19 o vimentina y negativa a CD144
1	171	2	0	0
2	128	8	0	0
3	77	3	0	0
4	155	2	0	0
5	189	2	0	0
6	153	4	0	0
7	99	4	0	0
8	55	1	0	0
9	73	0	0	0
10	73 (2° tubo)	2	0	0

Identificación de verdaderos positivos de CTC

Se incubó sangre de 4 pacientes con cáncer de mama y 6 pacientes con cáncer de pulmón con anticuerpos anti-CK8/18/19 (rojo), anticuerpos anti-CD-144 (verde) y anticuerpos anti-CD-45 (púrpura), con o sin anticuerpos anti-vimentina (rojo), y se evaluaron por microscopía. Se observaron células individuales, así como dobletes y agrupaciones a partir de estas muestras. Como se muestra en la Tabla 3, solo las muestras incubadas con anticuerpo anti-vimentina tenían significativamente más células identificadas como positivas, incluso con la eliminación de CEC positivos falsos usando la respuesta CD144. La inclusión de vimentina se muestra en una mayor tasa de detección de células cancerosas, ya que la vimentina parece detectar células de origen epitelial y células de origen mesenquimatoso. Además, se puede lograr la detección simultánea de CTC y CEC; una célula que es CK8/18/19 o una célula de vimentina positiva y CD144 negativa es una CTC, mientras que una célula que es CK8/18/19 o una célula de vimentina positiva y CD144 positiva es una CEC.

Tabla 3

Muestra #	Cáncer	# células positivas en canal rojo		
		positiva a CK8/18/19 o vimentina	positiva a CK8/18/19	positiva a CK8/18/19 o vimentina y negativa a CD144
1	mama	15	1	2
2	mama	8	4	8
3	mama	1	1	1
4	mama	10	9	10
5	pulmón	9	0	7
6	pulmón	1	1	1
7	pulmón	5	4	5
8	pulmón	59	1	14
9	pulmón	6	6	6
10	pulmón	6	0	5

Método de amplificación indirecta CTC

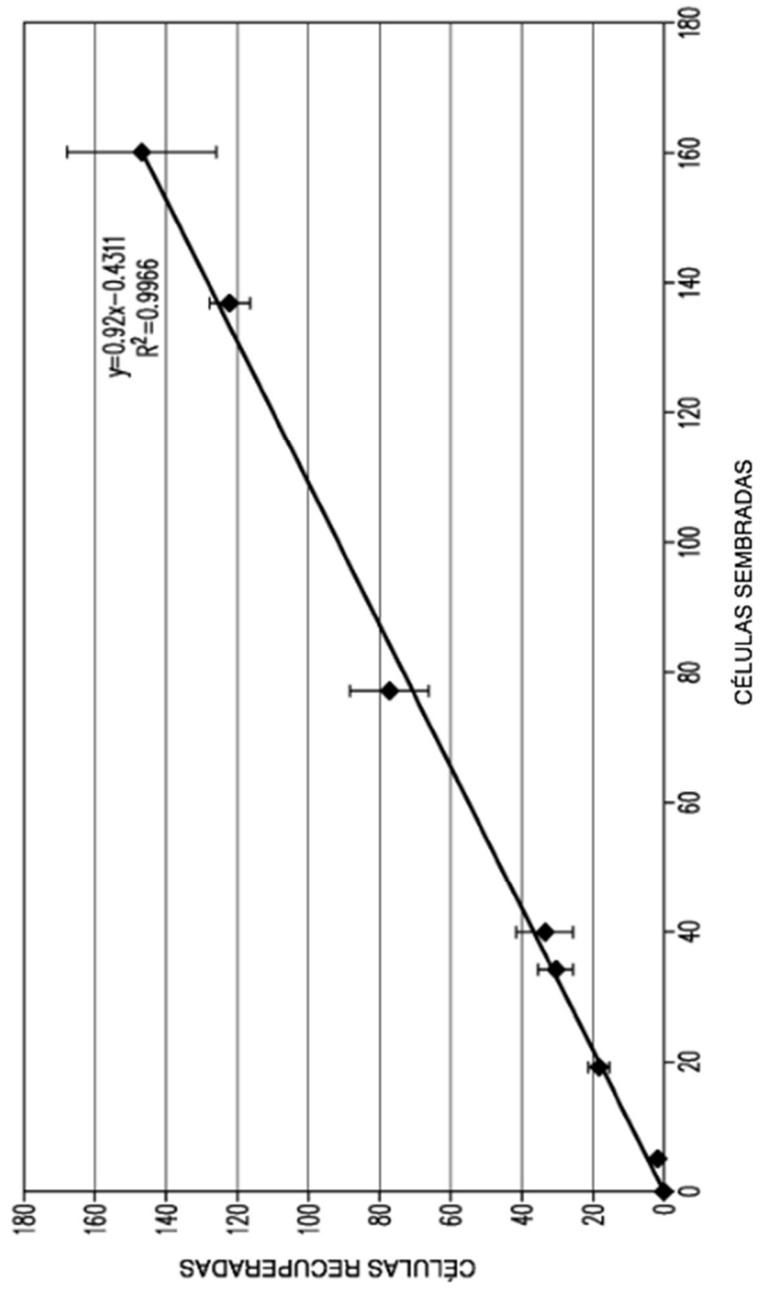
Dado que la inmunotinción directa en el ensayo CTC requiere anticuerpos con altas afinidades para generar suficiente señal, se evaluó la amplificación de la señal de tiramida (TSA) como una forma de generar suficiente señal de anticuerpos de baja afinidad o antígenos de baja expresión. Como se muestra en la FIGURA 7A, la inclusión de 7B, 7C y 7D del ensayo de TSA permite la detección de antígenos inaccesibles para la inmunotinción directa, ya sea debido a la baja afinidad de anticuerpos o baja expresión de antígeno.

**REIVINDICACIONES**

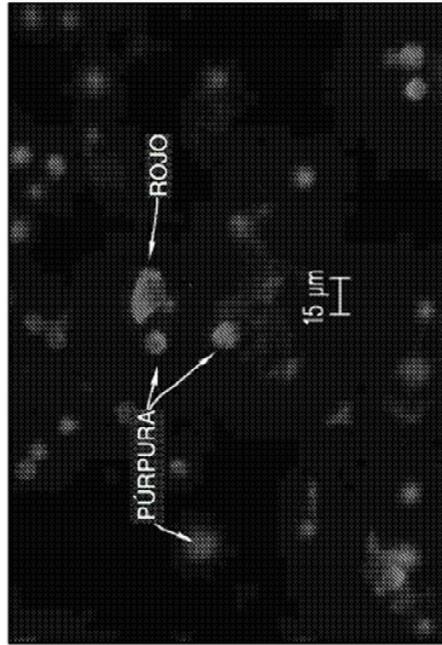
1. Un método para realizar un ensayo de detección de células tumorales circulantes que comprende:
- 5      incubar una muestra de un paciente con una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo que se une a la vimentina, un anticuerpo que se une a otro marcador expresado en las células tumorales circulantes, un anticuerpo que se une a un marcador expresado en los glóbulos blancos, y un anticuerpo que se une a un marcador expresado en células endoteliales;
- 10     detectar la pluralidad de anticuerpos, en donde la detección comprende generar señales a partir de la pluralidad de anticuerpos; y
- 10     confirmar la presencia de una célula tumoral circulante en la muestra, que comprende identificar una o más células que tienen una señal del anticuerpo que se une a la vimentina y una señal del anticuerpo que se une al otro marcador expresado en CTC, pero no una señal de el anticuerpo que se une al marcador expresado en los glóbulos blancos, una señal del anticuerpo que se une al marcador expresado en las células endoteliales, o ambos, en donde el marcador expresado en las células endoteliales es CD144, y en donde el otro marcador se expresa en el tumor circulante las células comprenden CK8, CK18, CK19, o cualquier combinación de las mismas.
- 15     2. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el marcador expresado en glóbulos blancos comprende CD45.
3. Un método para identificar simultáneamente una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en una muestra de un paciente, que comprende:
- 20     incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo que se une a vimentina, un anticuerpo que se une a CK8 /18/19 y un anticuerpo que se une a CD144;
- 20     detectar la pluralidad de anticuerpos, en donde la detección comprende generar señales a partir de la pluralidad de anticuerpos; e
- 25     identificar la presencia de una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en la muestra que comprende:
- 25     detección de una célula tumoral circulante, en donde la célula tumoral circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8 /18/19, o ambas, pero no una señal del anticuerpo que se une a CD144; y
- 30     detectar una célula endotelial circulante, en donde la célula endotelial circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8 /18/19, o ambas, y una señal del anticuerpo que se une a CD144.
- 30     4. Un método para distinguir entre una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante en una muestra de un paciente, que comprende:
- 35     incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos, en donde la pluralidad de anticuerpos comprende un anticuerpo que se une a vimentina, un anticuerpo que se une a CK8/18/19 y un anticuerpo que se une a CD144;
- 35     detectar la pluralidad de anticuerpos, en donde la detección comprende generar señales a partir de la pluralidad de anticuerpos; y
- 40     distinguir entre una célula tumoral circulante y una célula endotelial circulante, que comprende examinar la muestra en busca de una célula tumoral circulante, en donde la célula tumoral circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a la vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19, o ambos, pero no una señal del anticuerpo que se une a CD144, y la detección de la muestra para una célula endotelial circulante, en donde la célula endotelial circulante tiene una señal del anticuerpo que se une a vimentina, una señal del anticuerpo que se une a CK8/18/19, o ambos, y una señal del anticuerpo que se une a CD144.
- 45     5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha muestra de un paciente se trata para enriquecer la concentración de células tumorales circulantes, preferiblemente en donde la muestra de un paciente se trata por filtración.
- 45     6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de anticuerpos contiene uno o más marcadores detectables.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el uno o más marcadores detectables comprende marcadores fluorescentes.
- 50     8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la detección es inmunofluorescencia indirecta que comprende incubar la muestra con una pluralidad de anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además correlacionar la señal específica de las células tumorales circulantes con una carga tumoral.

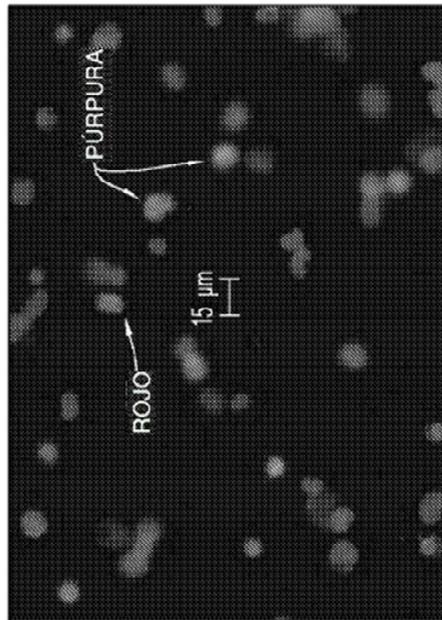
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además aislar las células tumorales circulantes de la muestra.



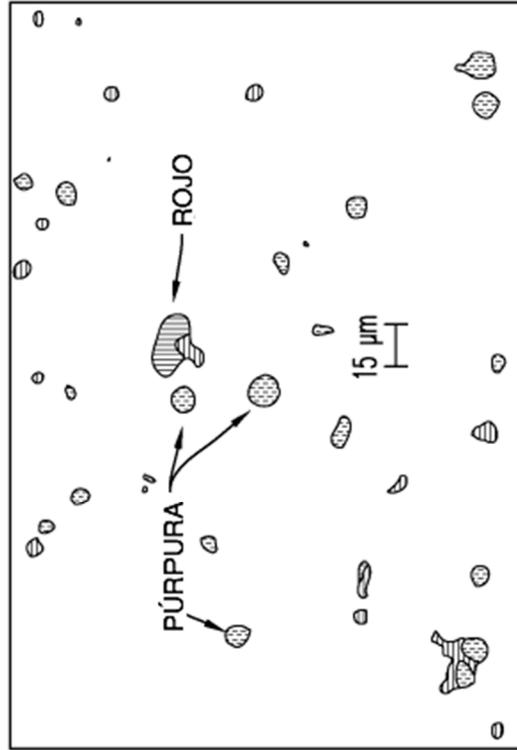
**FIG. 1**



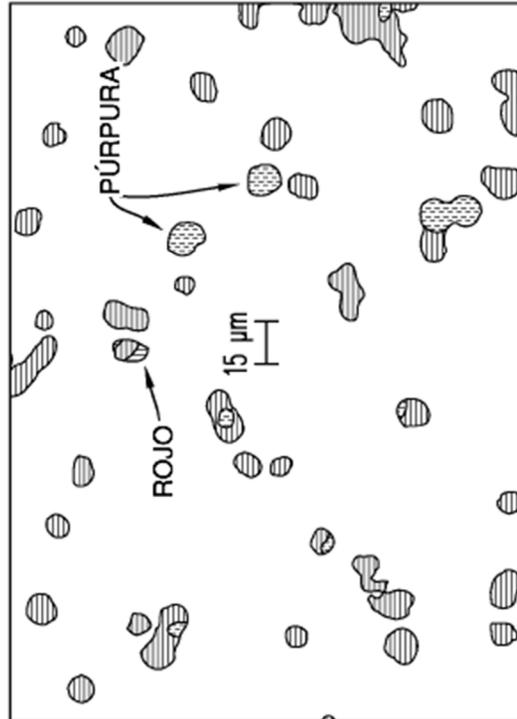
**FIG. 2B**



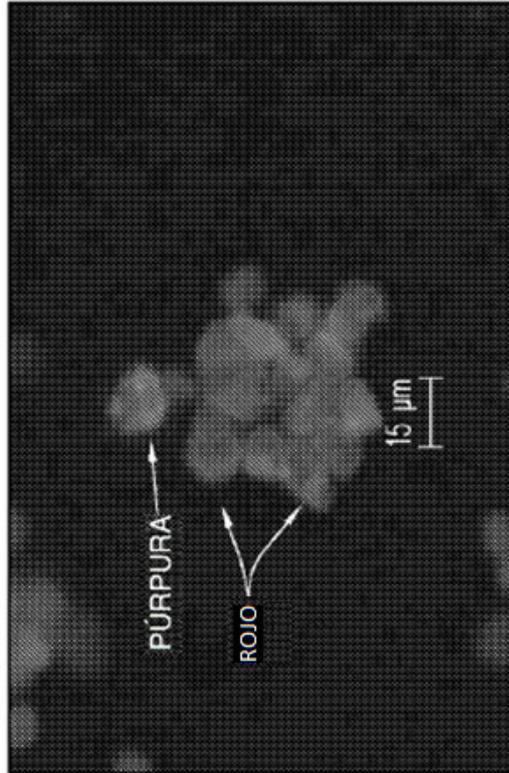
**FIG. 2A**



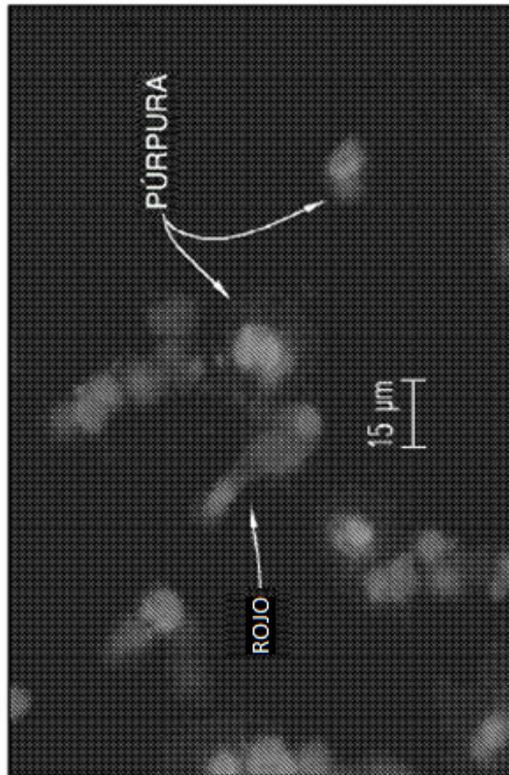
**FIG. 2D**



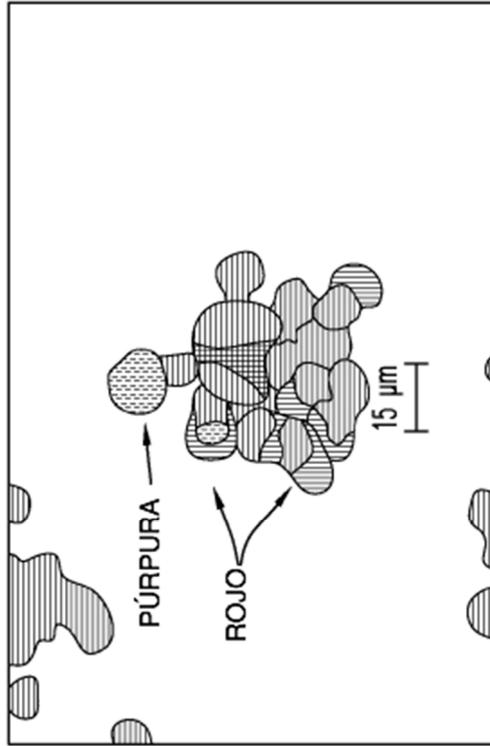
**FIG. 2C**



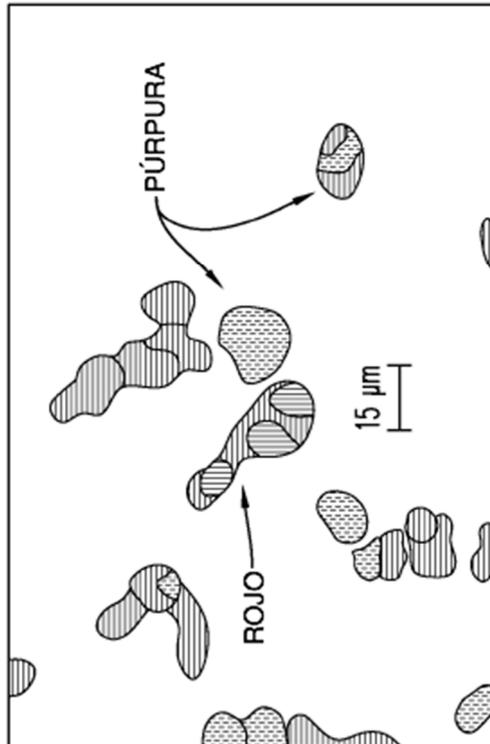
**FIG. 3B**



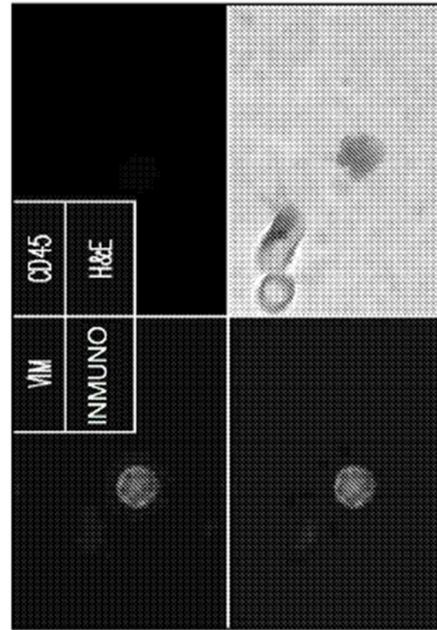
**FIG. 3A**



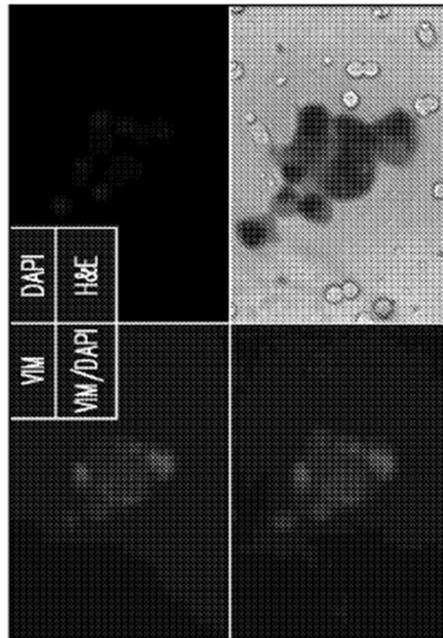
**FIG. 3D**



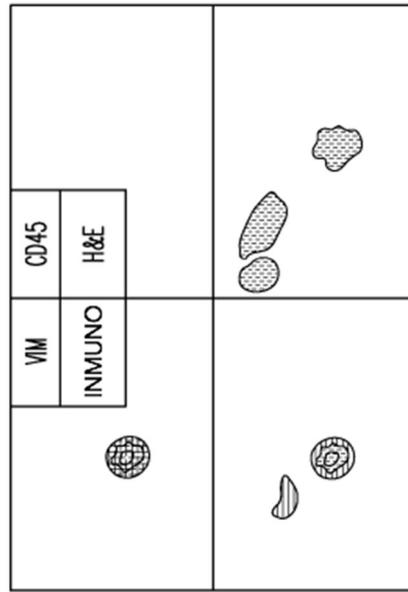
**FIG. 3C**



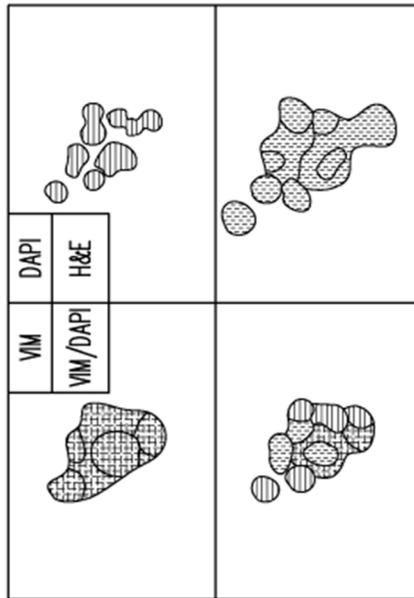
**FIG. 4B**



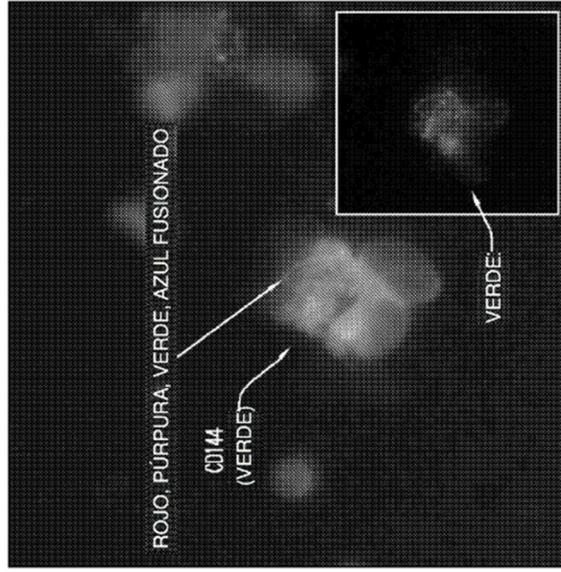
**FIG. 4A**



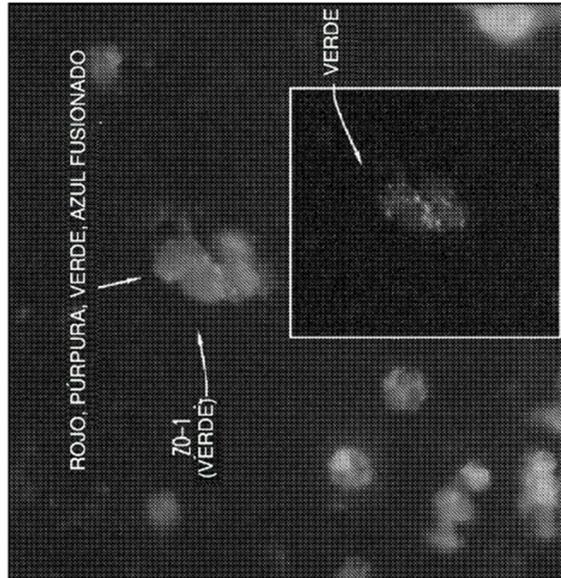
**FIG. 4D**



**FIG. 4C**



**FIG. 5B**



**FIG. 5A**

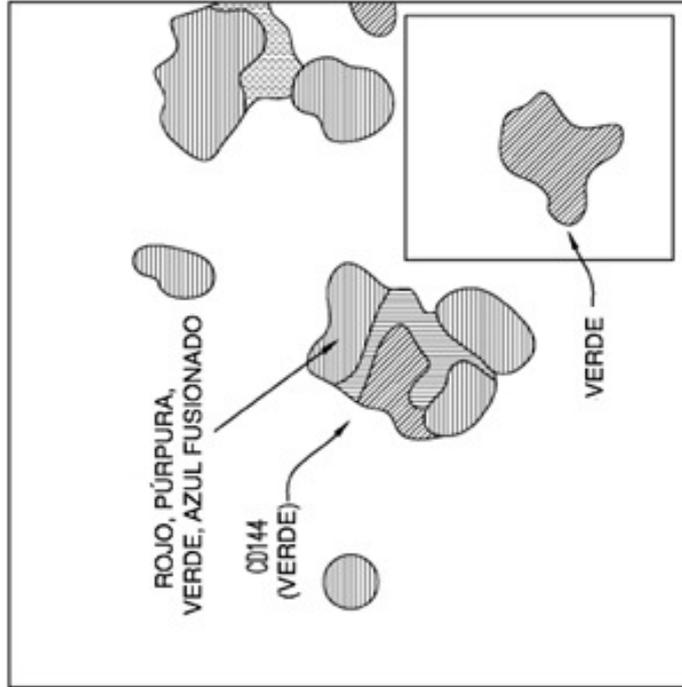


FIG. 5D

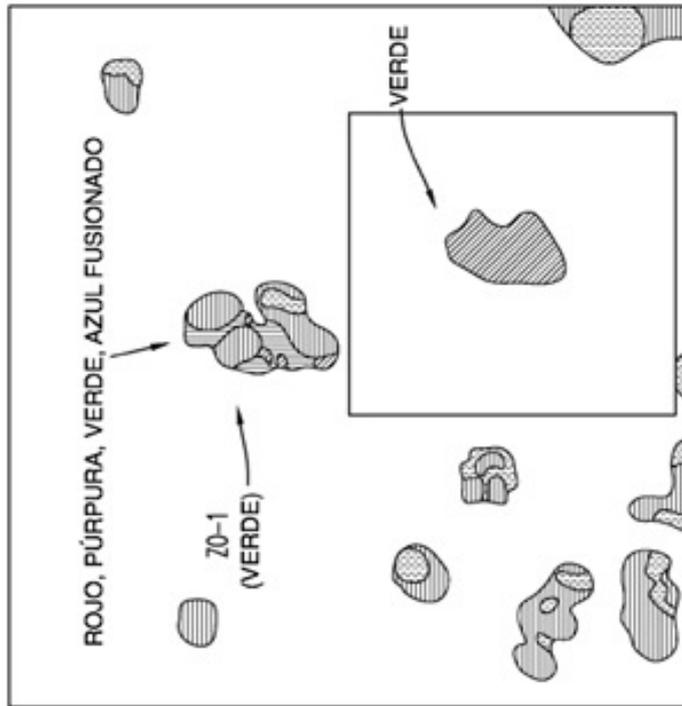
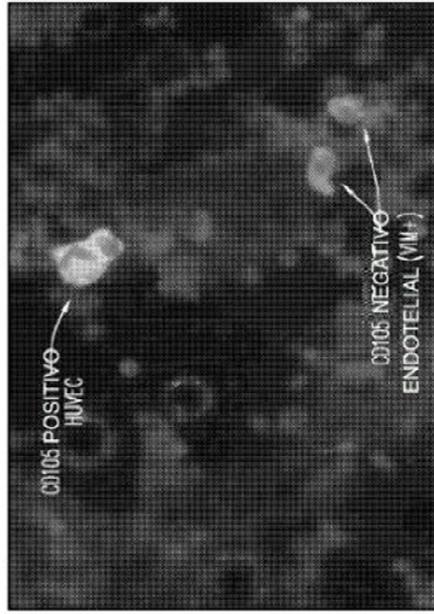
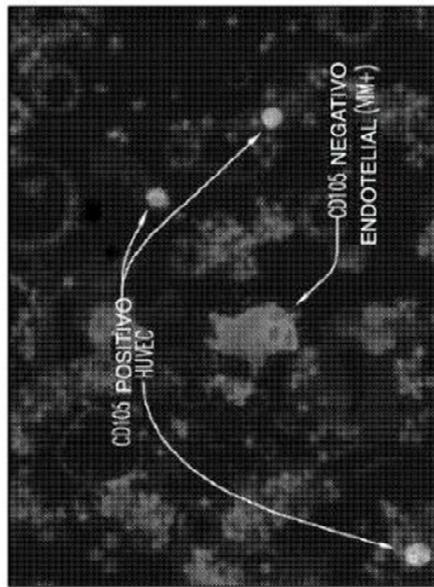


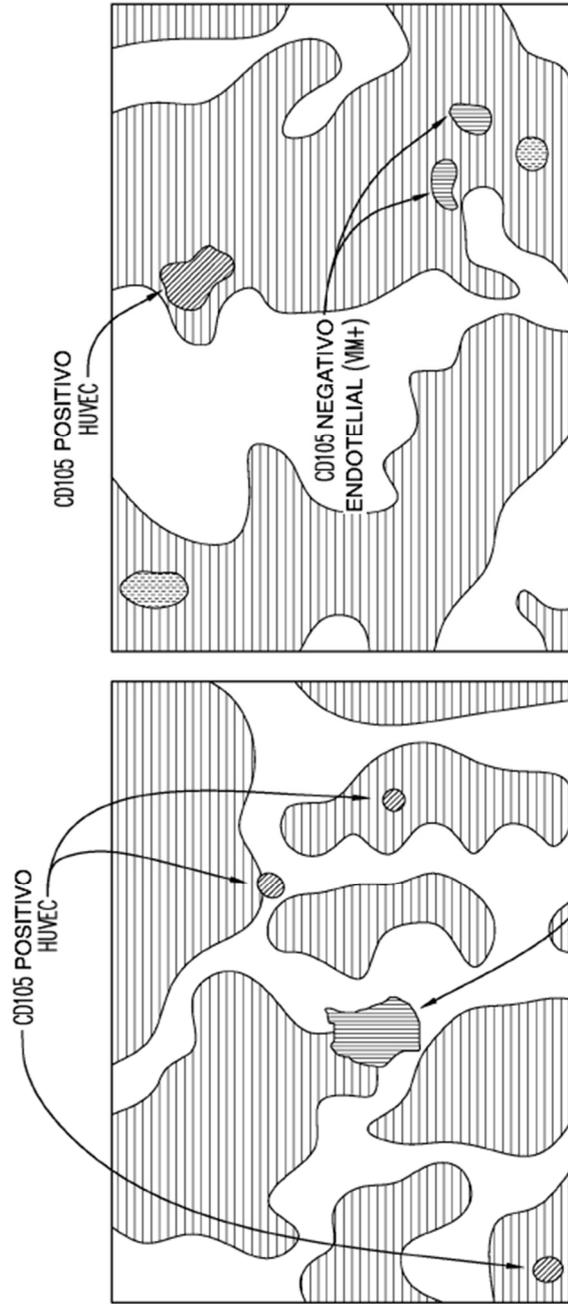
FIG. 5C



**FIG. 6B**

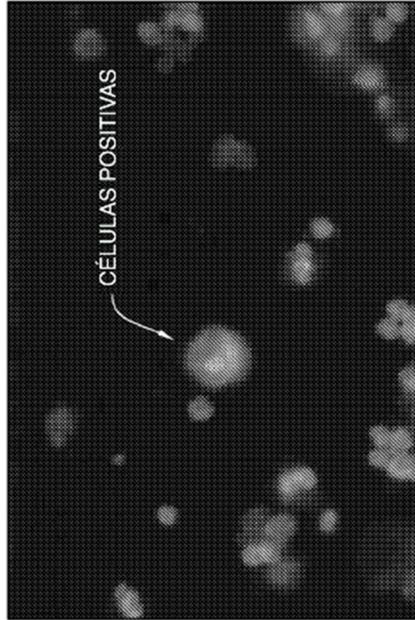


**FIG. 6A**

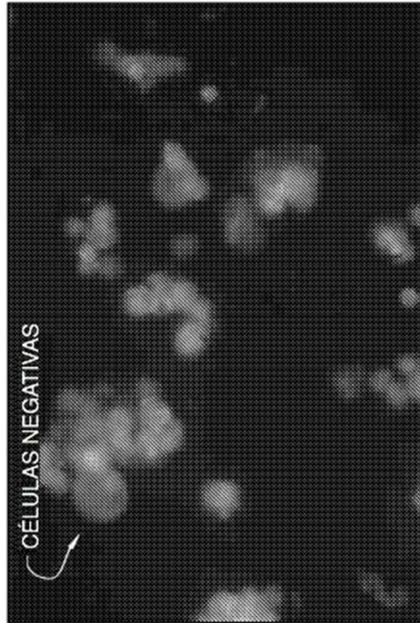


**FIG. 6D**

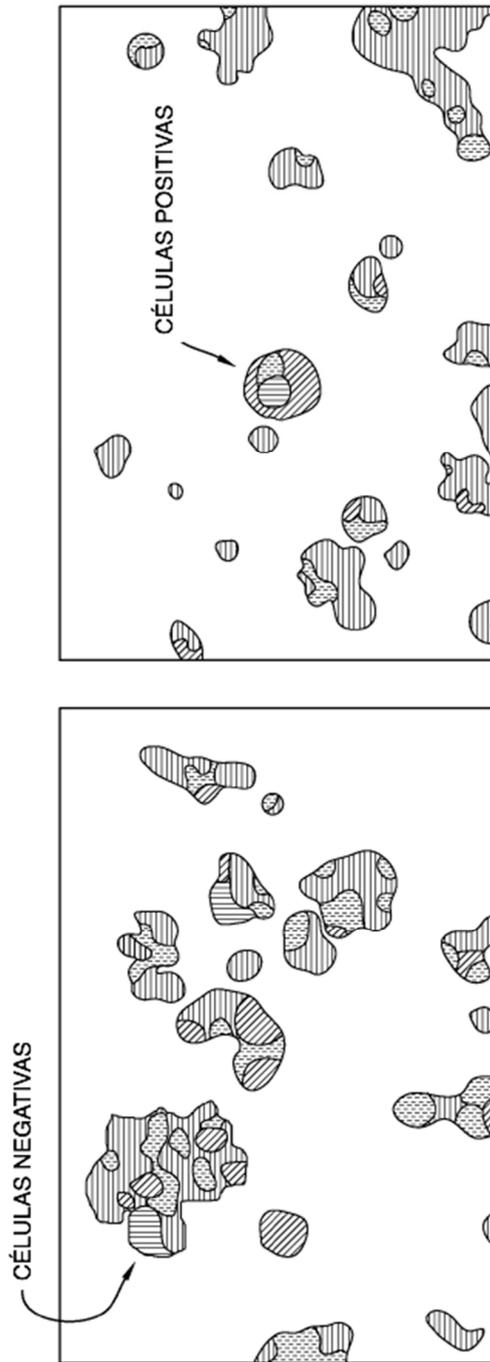
**FIG. 6C**



**FIG. 7B**



**FIG. 7A**



**FIG. 7D**

**FIG. 7C**