(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 919 098**

(51) Int. CI.:

G01N 33/574 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2015 PCT/US2015/012957**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15112999**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2015 E 15740999 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2022 EP 3100046**

(54) Título: **Detección de la expresión del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en células tumorales circulantes (CTC)**

(30) Prioridad:

27.01.2014 US 201461932117 P
30.01.2014 US 201461933771 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2022

(73) Titular/es:

EPIC SCIENCES, INC. (100.0%)
9381 Judicial Drive, Suite 200
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

DITTAMORE, RYAN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Detección de la expresión del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en células tumorales circulantes (CTC)

La presente divulgación se refiere en general a métodos precisos y no invasivos para detectar el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) sobre las CTCs.

Antecedentes

El cáncer de próstata es la enfermedad maligna de órganos sólidos más comúnmente diagnosticada en los Estados Unidos (EE.UU.) y sigue siendo la segunda causa principal de muerte por cáncer entre los hombres estadounidenses. Solo en el año 2014, la incidencia proyectada de cáncer de próstata fue de 233.000 casos, teniendo lugar muerte en 29.480 hombres, lo que hace que la terapia contra el cáncer de próstata metastásico sea realmente una necesidad médica no satisfecha. Siegel et al., 2014. CA Cancer J Clin. 2014; 64(1):9-29. Estudios epidemiológicos de Europa muestran datos comparables con una incidencia estimada de 416700 nuevos casos en el año 2012, lo que representa el 22,8% de los diagnósticos de cáncer en los hombres. En total, se esperan 92200 muertes por cáncer de próstata, lo que lo convierte en uno de los tres cánceres con el que los hombres tienen más probabilidades de morir, con una tasa de mortalidad del 9,5%.

A pesar del éxito comprobado de la terapia hormonal contra el cáncer de próstata mediante la castración química o quirúrgica, la mayoría de los pacientes eventualmente progresarán a una fase de la enfermedad que es metastásica y que muestra resistencia a una manipulación hormonal adicional. Esto se ha denominado cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC). Sin embargo, a pesar de esta designación, existe una evidencia de que la señalización y la expresión génica mediadas por el receptor de andrógenos (AR) pueden persistir en el mCRPC, incluso frente a niveles de andrógenos con castración. Esto puede deberse en parte a una regulación al alza de las enzimas involucradas en la síntesis de andrógenos, la sobreexpresión de AR o la aparición de ARs mutantes con reconocimiento promiscuo de varios ligandos esteroideos. El tratamiento de pacientes con mCRPC sigue siendo un desafío clínico importante.

Antes del año 2004, no había ningún tratamiento sometido a ensayo para mejorar la supervivencia de los hombres con mCRPC. El tratamiento de los pacientes con mitoxantrona con prednisona o hidrocortisona tenía como único objetivo aliviar el dolor y mejorar la calidad de vida, pero no había un beneficio en términos de supervivencia general (SG). En el año 2004, los resultados de dos importantes ensayos clínicos de fase 3, TAX 327 y SWOG (Southwest Oncology Group) 9916, establecieron Taxotere® (docetaxel) como opción quimioterapéutica primaria para los pacientes con mCRPC. Se ha investigado un tratamiento hormonal adicional con terapias dirigidas al receptor de andrógenos (AR), quimioterapia, terapias combinadas e inmunoterapia para el mCRPC, y resultados recientes han ofrecido opciones adicionales en ese grupo de pacientes difíciles de tratar. Con el advenimiento del crecimiento exponencial de nuevos agentes sometidos a ensayo y aprobados para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC), solo en los últimos 5 años han surgido problemas con respecto a la secuencia o combinación óptima de esos agentes. Existen varias pautas que ayudan a orientar a los médicos en cuanto al mejor enfoque de la secuencia, y la mayoría evaluaría la presencia o ausencia de síntomas, el estado funcional y la carga de la enfermedad para ayudar a determinar la mejor secuencia para esos agentes. Mohler et al., J Natl Compr Canc Netw. 2013; 11(12):1471-1479; Mohler et al., J Natl Compr Cane Netw. 2014; 12(5): 686-718; Cookson et al., J Urol. 2013; 190(2):429-438. Actualmente, los tratamientos aprobados consisten en agentes citotóxicos de la clase del taxano, tales como Taxotere® (docetaxel) y Jevtana® (cabazitaxel) y fármacos de terapia hormonal antiandrógenos, tales como Zytiga® (arbiterona, bloquea la producción de andrógenos) o Xtandi® (enzalutamida, un inhibidor del receptor de andrógenos (AR)).

El desafío para los médicos es decidir la mejor secuencia para administrar esas terapias para brindar el mayor beneficio a los pacientes. Sin embargo, el fracaso de una terapia sigue siendo un desafío importante, basándose en respuestas heterogéneas frente a las terapias entre los pacientes y de cara a una resistencia cruzada de cada agente. Mezynski et al., Ann Oncol. 2012; 23(11):2943-2947; Noonan et al., Ann Oncol. 2013; 24(7):1802-1807; Pezaro et al., Eur Urol. 2014, 66(3): 459-465. Además, los pacientes pueden perder la ventana terapéutica para obtener un beneficio sustancial de cada fármaco que se ha mostrado que brinda beneficios en la supervivencia general. Por lo tanto, sigue siendo un objetivo importante mejores métodos para identificar las poblaciones diana que tienen el mayor potencial para beneficiarse de las terapias dirigidas.

PSMA es una glicoproteína integral de membrana de tipo II dimérica, altamente expresada en las células del cáncer de próstata. Se ha mostrado que es un agente predictor de la progresión del cáncer de próstata y del pronóstico del cáncer de próstata. Por ejemplo, se observan niveles elevados de PSMA en formas agresivas de la enfermedad, es decir, cánceres de próstata metastásicos y de mayor grado. La expresión de un nivel elevado de PSMA se correlaciona con una recurrencia temprana de PSA en el cáncer de próstata tratado quirúrgicamente. PSMA se correlaciona con la agresividad de la enfermedad, el fracaso de una terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR) y una enfermedad progresiva y, por lo tanto, se afirma firmemente PSMA como diana para la caracterización del cáncer de próstata y la terapia posterior. La capacidad para detectar los niveles de PSMA en las CTCs que comprende la formación de imágenes de alta definición de células nucleadas extendidas en placas, puede identificar a los pacientes que

probablemente se beneficiarán de los enfoques terapéuticos que se dirigen a PSMA en la superficie celular de las CTCs. Por lo tanto, puede ser factible administrar agentes que se dirigen a PSMA en el tumor y su sistema microvascular para (1) destruir selectivamente los vasos que perfunden el tejido tumoral, (2) lograr dosis regionales elevadas de fármacos para superar la resistencia del tumor y (3) no afectar a los tejidos normales, que normalmente carecen de expresión de PSMA. La capacidad de detectar niveles de PSMA sobre CTCs que comprende la formación de imágenes de alta definición de células nucleadas sobre placas, también se puede identificar a los pacientes que probablemente tengan un mayor riesgo de fracaso de la terapia dirigida a AR.

Las células tumorales circulantes (CTCs) representan un avance significativo en el diagnóstico del cáncer que se hace aún más atractivo por su medición no invasiva. Cristofanilli et al., N Engl J Med 2004, 351:781-91. Las CTCs liberadas desde un tumor primario o desde sus sitios metastásicos, contienen una información importante sobre la biología del tumor. Históricamente, los niveles extremadamente bajos de CTCs en el torrente sanguíneo combinados con su fenotipo desconocido, impedían significativamente su detección y limitaban su utilidad clínica. Recientemente ha surgido una variedad de tecnologías para la detección, el aislamiento y la caracterización de CTCs con el fin de utilizar su información. Las CTCs tienen el potencial de proporcionar un medio no invasivo para evaluar cánceres progresivos en tiempo real durante la terapia y, además, ayudar a dirigir la terapia al realizar un seguimiento de los cambios fisiológicos y genéticos fenotípicos que ocurren como respuesta a una terapia. En la mayoría de los pacientes con cáncer de próstata avanzado, se ha extirpado el tumor primario y se espera que las CTCs consistan en células desprendidas de las metástasis, proporcionando una "biopsia líquida". Si bien las CTCs se definen tradicionalmente como células EpCAM/positivas para citoqueratina (CK+), CD45- y morfológicamente distintas, una evidencia reciente sugiere que existen otras poblaciones de candidatos de CTCs, incluidas las células que son EpCAM/negativas para citoqueratina (CK-) o células de tamaño más pequeño que las CTCs tradicionales. Estos hallazgos con respecto a la heterogeneidad de la población de las CTCs sugieren que las plataformas de CTCs sin enriquecimiento son favorables sobre las técnicas de selección positiva que aíslan las CTCs en función del tamaño, la densidad o la positividad de EpCAM, que son propensas a perder importantes subpoblaciones de CTCs.

El documento US 2002/098535 A1 se refiere a la caracterización de células cancerosas aisladas, procedentes de una muestra de fluido corporal, en clases y subclases que comprenden células terminales, células proliferativas y células intermedias.

Existe una necesidad de desarrollar métodos precisos y no invasivos para detectar la aparición y realizar un seguimiento de la expresión de PSMA en diversos tipos de CTCs en pacientes con mCRPC.

La presente invención aborda esa necesidad de un ensayo, al proporcionar un ensayo para detectar y cuantificar la expresión de PSMA en diversos tipos de CTCs en pacientes con mCRPC. También se proporcionan ventajas relacionadas.

Compendio

La presente invención proporciona un método para detectar el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente afectado por cáncer de próstata tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas y que comprende (a) realizar un análisis directo que comprende tinción inmunofluorescente y caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida del paciente, para detectar células tumorales circulantes (CTC), y (b) determinar el número de CTCs que expresan PSMA.

De acuerdo con el método, el análisis directo en la etapa (a) identifica más de una subpoblación de CTCs que expresan PSMA: una primera subpoblación de CTCs que expresa PSMA comprende CTCs tradicionales CK+, CD45-, y una segunda subpoblación de CTCs que expresa PSMA comprende CTCs apoptóticas CK+, CD45-. En algunas realizaciones, el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC). En realizaciones adicionales, la tinción inmunofluorescente de las células nucleadas comprende pan citoqueratina (CK), agrupación de diferenciación (CD) 45 y diamidino-2-fenilindol (DAPI).

En realizaciones adicionales, la determinación de la presencia de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA en la etapa (b) comprende el análisis de las CTCs detectadas en la etapa (a) a nivel de células individuales. El método para detectar el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) sobre las células tumorales circulantes (CTCs) puede comprender una caracterización molecular de las CTCs. El método para detectar el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) sobre las células tumorales circulantes (CTCs) puede comprender el análisis de la subpoblación de CTCs que expresa PSMA para identificar subtipos clonales dentro de la subpoblación.

En realizaciones adicionales, el método para detectar el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) sobre las células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente afectado por cáncer de próstata, comprende una etapa que compara el número de CTCs que expresan PSMA con un valor de referencia. En realizaciones adicionales, el método para detectar PSMA sobre las células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente afectado por cáncer de próstata, comprende determinar la proporción de CTCs que comprenden CTCs que expresan PSMA. En algunas realizaciones, la proporción de CTCs que comprenden CTCs que expresan PSMA se compara con un valor de referencia. En realizaciones adicionales, una proporción de CTCs que expresan PSMA por encima del valor de referencia, identifica al paciente como candidato para una terapia dirigida a PSMA. En

realizaciones adicionales, una proporción de CTCs que expresan PSMA por encima del valor de referencia es indicativa de una resistencia a la terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR).

El método de la invención se puede usar para identificar a un paciente afectado por cáncer de próstata como candidato para una terapia dirigida a PSMA.

El método de la invención también se puede usar para predecir una resistencia a la terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR) en un paciente que padece cáncer de próstata.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B muestran métodos relacionados con la ejecución de las realizaciones descritas en el presente documento y describen la población de estudio ejemplificada. La Figura 1A muestra un esquema de un procedimiento representativo de recogida y detección de CTCs: (1) células nucleadas de una muestra de sangre se colocan sobre un portaobjetos; (2) los portaobjetos se almacenan en un biodepósito a -80°C; (3) los portaobjetos se tiñen con CK, CD45, DAPI y AR; (4) se escanean los portaobjetos; (5) se ejecutan algoritmos de patología digital multiparamétricos; (6) confirmación del programa informático y del lector humano de las CTCs y cuantificación de la expresión de biomarcadores. La Figura 1B muestra información sobre la población del estudio. Las características demográficas y clínicas, incluido el historial de la terapia actual y anterior, PSA y recuento concomitante con CellSearch®, de los pacientes en el momento de la inclusión en el estudio se muestran en los paneles izquierdo y derecho. Treinta y seis pacientes (pacs) con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC) se incluyeron en el estudio.

Las Figuras 2A, 2B y 2C muestran la heterogeneidad de PSMA en las CTCs. La Figura 2A muestra imágenes inmunofluorescentes de la heterogeneidad de la expresión de PSMA en CTCs tradicionales y CTCs apoptóticas procedentes de una sola extracción de sangre. La Figura 2B muestra una tabla que describe la heterogeneidad en noventa y dos muestras de pacientes, tal y como se detectaron con Epic frente a CellSearch®. La Figura 2C muestra una tabla que detalla los porcentajes de pacientes con expresión de PSMA sobre las CTCs en la primera extracción de sangre.

La Figura 3 muestra la expresión de PSMA en cada CTC y la CTC apoptótica calculada mediante el programa informático Epic representada gráficamente para cada paciente.

La Figura 4 muestra un perfil de CTCs en un paciente evolucionando con abiraterona y la respuesta posterior a enzalutamida, con la conversión correspondiente desde CTCs PSMA+ a CTCs PSMA- y la disminución de las CTCs absolutas.

Descripción detallada

La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que la detección de PSMA sobre la superficie de CTCs que comprende la formación de imágenes de alta definición de células nucleadas sobre placas basándose en un análisis directo que comprende tinción inmunofluorescente y características morfológicas de las células nucleadas, se puede usar para determinar la heterogeneidad de PSMA y los cambios dinámicos en la expresión de PSMA a lo largo del tiempo.

La presente invención proporciona un método para detectar PSMA sobre células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente que padece cáncer de próstata, que comprende (a) realizar un análisis directo que comprende una tinción inmunofluorescente y una caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida del paciente, para detectar células tumorales circulantes (CTCs) y (b) determinar el número de CTCs que expresan PSMA tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la tinción inmunofluorescente (CD45) de células nucleadas comprende pan citoqueratina (CK), agrupación de diferenciación (CD) 45 y diamidino-2-fenilindol (DAPI).

De acuerdo con el método de la invención, el análisis directo en la etapa (a) identifica más de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA. Una primera subpoblación de CTCs que expresa PSMA comprende CTCs tradicionales CK+, CD45-, y una segunda subpoblación de CTCs que expresa PSMA comprende CTCs apoptóticas CK+, CD45-. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las CTCs apoptóticas carecen de núcleos intactos.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la presencia de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA en la etapa (b) comprende un análisis de las CTCs detectadas en la etapa (a) a nivel de una sola célula. Los métodos descritos en este documento pueden comprender además una caracterización molecular de las CTCs. Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además el análisis molecular de la subpoblación de CTCs que expresa PSMA para identificar subtipos clonales dentro de dicha subpoblación. La identificación de subtipos clonales previamente desconocidos que expresan PSMA puede permitir además métodos nuevos para identificar pacientes que son propensos a ser resistentes o están en proceso de adquirir resistencia frente a una terapia dirigida a AR.

En algunos aspectos de la invención, el cáncer de próstata es cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). En aspectos adicionales de la invención, el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC).

Tal y como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un método para detectar PSMA sobre células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente que padece cáncer de próstata, que comprende (a) realizar un análisis directo que comprende tinción inmunofluorescente y caracterización morfológica de las células nucleadas en una muestra de sangre obtenida a partir del paciente para detectar las células tumorales circulantes (CTC), y (b) determinar el número de CTCs que expresan PSMA. De acuerdo con el método de la invención, el análisis directo en la etapa (a) identifica más de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA: una primera subpoblación de CTCs que expresa PSMA comprende CTCs tradicionales CK+, CD45-, y una segunda subpoblación de CTCs que expresa PSMA comprende CTCs apoptóticas CK+, CD45-. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento comprenden además una etapa que compara el número de CTCs que expresan PSMA con un valor de referencia. En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento comprenden además determinar la proporción de CTCs que comprenden CTCs que expresan PSMA. En algunas realizaciones de los métodos reivindicados, la proporción de CTCs que comprende CTCs que expresan PSMA se compara con un valor de referencia. En realizaciones relacionadas, la proporción de CTCs que expresan PSMA por encima de dicho valor de referencia, identifica al paciente como candidato para una terapia dirigida a PSMA. En realizaciones adicionales, la proporción de CTCs que expresan PSMA por encima de dicho valor de referencia es indicativa de resistencia a la terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR).

En algunos aspectos de la invención, los métodos de la invención comprenden determinar la proporción de CTCs que comprende la primera subpoblación de CTCs que expresan PSMA. En algunos aspectos de la invención, los métodos de la invención comprenden determinar la proporción de CTCs que comprende la segunda subpoblación de CTCs que expresan PSMA. En algunos aspectos de la invención, una proporción de CTCs que comprende CTCs que expresan PSMA se compara con un valor de referencia. En algunos aspectos de la invención, una proporción de CTCs que expresa PSMA por encima de dicho valor de referencia, identifica al paciente como candidato para una terapia dirigida a PSMA. En algunos aspectos de la invención, una proporción de CTCs que expresan PSMA por encima de dicho valor de referencia, es indicativa de una resistencia a la terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR).

El método de la invención se puede usar para identificar a un paciente afectado por cáncer de próstata como candidato para una terapia dirigida a PSMA.

El método de la invención también se puede usar para predecir una resistencia a una terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR) en un paciente que padece cáncer de próstata.

Debe señalarse que, tal y como se utilizan en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una CTC" incluye una mezcla de dos o más CTCs y similares.

El término "aproximadamente", particularmente haciendo referencia a una cantidad dada, se entiende que incluye desviaciones de más o menos un cinco por ciento.

Tal y como se usa en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contenido dicte claramente lo contrario, y se usan indistintamente con "al menos uno/una" y "uno/una o más".

Tal y como se utilizan en el presente documento, los términos y expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene" y cualquier variación de los mismos, se entiende que incluyen una inclusión no exclusiva, de modo que un procedimiento, método, producto por procedimiento o composición de la materia que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos, no incluye solo esos elementos sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho procedimiento, método, producto por procedimiento o composición de la materia.

El término "paciente" tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere preferiblemente a un ser humano, pero también incluye a otros mamíferos. Se observa que, tal y como se utilizan en el presente documento, los términos "organismo", "individuo", "sujeto" o "paciente" se usan como sinónimos y de forma intercambiable.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "célula tumoral circulante" o "CTC" se entiende que incluye cualquier célula rara que está presente en una muestra biológica y que está relacionada con el cáncer de próstata. Las CTCs, que pueden estar presentes como células individuales o en agrupaciones de CTCs, a menudo son células epiteliales que se desprenden de tumores sólidos que se encuentran en concentraciones muy bajas en la circulación de los pacientes. Las CTCs incluyen las "CTCs tradicionales", que son positivas para citoqueratina (CK+), negativas para CD45 (CD45-), contienen un núcleo DAPI y son morfológicamente distintas de los glóbulos blancos circundantes. La expresión también incluye "CTCs no tradicionales" que difieren de una CTC tradicional en al menos una característica. Las CTCs no tradicionales incluyen las cinco subpoblaciones de CTCs, incluidas las agrupaciones de CTCs, CTCs negativas para CK (CK^-) que son positivas para al menos un biomarcador adicional que permite la clasificación como CTCs, CTCs pequeñas, CTCs con nucléolos$^+$ y CTCs moteadas para CK. Tal y como se usa en el

presente documento, la expresión "agrupación de CTCs" significa dos o más CTCs con membranas celulares en contacto. Tal y como se usa en el presente documento, una "subpoblación" se refiere a dos o más CTCs que comparten una o más características morfológicas y/o de inmunofluorescencia. Tal y como se describe en el presente documento, las subpoblaciones de CTCs asociadas con CRPC comprenden CTCs tradicionales CK+, CD45- y CTCs apoptóticas CK+, CD45-.

La mayoría de los pacientes con cáncer de próstata sistémico, tratados con terapia de privación de andrógenos (ADT), también denominada terapia hormonal "primaria" en el contexto del cáncer de próstata, desarrollarán cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). El cáncer de próstata resistente a la castración (CRCP) se define por una progresión de la enfermedad a pesar de la terapia de privación de andrógenos (ADT). El CRPC se puede categorizar como no metastásico o metastásico (mCRPC). El mCRPC se refiere a un CRPC que se ha extendido más allá de la glándula prostática, a un sitio distante, tal como los ganglios linfáticos o el hueso. La progresión de un CRCP puede incluir cualquier combinación de aumento del antígeno específico de la próstata (PSA) sérico, progresión de una enfermedad preexistente y aparición de metástasis iniciales o nuevas. La mayoría de los CRPCs seleccionan mecanismos que regulan al alza los andrógenos intracelulares y/o el receptor de andrógenos (AR), lo que conduce al crecimiento continuo del cáncer dirigido por AR a pesar de un nivel de castración de andrógenos séricos. Por lo tanto, cuando los pacientes desarrollan CRPC, generalmente son sensibles a las terapias hormonales "secundarias" secuenciales (antiandrógenos, ketoconazol, estrógenos) dirigidas a una inhibición del AR.

Tal y como se utiliza en el presente documento, la expresión "valor de referencia" en el contexto del número de CTCs que expresan PSMA o la prevalencia de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA, se refiere al número o prevalencia de la subpoblación de CTCs que expresa PSMA en: (a) una o más muestras correspondientes obtenidas a partir del mismo paciente en un punto de tiempo anterior; (a) una o más muestras correspondientes obtenidas a partir de un paciente en una situación similar o un promedio de pacientes en un momento anterior o correspondiente; (c) una o más muestras de control/normales obtenidas a partir de sujetos normales o sanos, por ejemplo, a partir de hombres que no tienen cáncer de próstata; o (d) cualquier otro patrón de referencia correspondiente, considerado útil por un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, determinar el "número de CTCs que expresan PSMA" se refiere a determinar el número absoluto. En otras realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el "número de CTCs que expresan PSMA" puede incluir además la determinación del número/proporción relativa de CTCs que expresan PSMA entre todas las CTCs. En algunas realizaciones, el número absoluto o número relativo/proporción de CTCs que expresan PSMA entre todas las CTCs, se denomina además el tamaño de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA.

Tal y como se usa en el presente documento, el término "prevalencia" con respecto a una subpoblación de CTCs asociada con CRPC en una muestra biológica de una prueba, se refiere al número de CTCs en la muestra que pertenecen a la subpoblación de CTCs.

Tal y como se describe en este documento, una mayor prevalencia de CTCs que expresan PSMA es indicativa de resistencia a una terapia dirigida a AR en un paciente. Tal y como se describe adicionalmente en el presente documento, una mayor prevalencia de CTCs que expresan PSMA, es una respuesta indicativa a una terapia dirigida con PSMA en un paciente. Si bien tanto las CTCs tradicionales como las apoptóticas son subpoblaciones de CTCs y están incluidas en la expresión "CTC que expresa PSMA", tal y como se define en el presente documento, es el aumento en la proporción relativa de una o ambas subpoblaciones entre todas las CTCs en una muestra lo que es indicativo de resistencia a una terapia dirigida a AR en un paciente. De manera similar, un aumento en la proporción relativa de una o ambas de esas subpoblaciones entre todas las CTCs en una muestra, identifica a un paciente como candidato adecuado para una terapia dirigida a PSMA. En su sentido más amplio, una muestra biológica puede ser cualquier muestra que contenga CTCs.

Tal y como se utiliza en esta memoria, el término "resistencia" en el contexto de la terapia dirigida a AR, significa que el sujeto no muestra una respuesta a la terapia basada en una capacidad subyacente de las células tumorales para escapar del efecto del agente terapéutico. La resistencia incluye la resistencia *de novo* y la resistencia adquirida. Los pacientes con cáncer que muestran resistencia *de novo* no responden a una terapia desde el principio. Sin embargo, en la resistencia adquirida, las células cancerosas inicialmente responden a un fármaco, pero eventualmente adquieren resistencia frente al mismo. Las células también pueden mostrar resistencia cruzada frente a otros fármacos no relacionados estructural y mecánicamente, un fenómeno comúnmente conocido como resistencia a múltiples fármacos (MDR). Debido a una adquisición de MDR, los regímenes de tratamiento que combinan múltiples agentes con diferentes dianas ya no son eficaces.

Una muestra puede comprender un fluido corporal tal como sangre; la fracción soluble de una preparación celular o una parte alícuota del medio en el que se cultivan las células; un cromosoma, un orgánulo o una membrana aislada o extraída de una célula; ADN genómico, ARN o ADNc en solución o unido a un sustrato; una célula; un tejido; una huella de tejido; una huella génica; células; piel, y similares. Una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto puede ser cualquier muestra que contenga células nucleadas e incluya cualquier material en el que se pueden detectar CTCs. Una muestra puede ser, por ejemplo, sangre completa, plasma, saliva u otro fluido corporal o tejido que contenga células.

En el método de la invención, la muestra biológica es una muestra de sangre. Tal y como se describe en el presente

documento, una muestra puede ser sangre completa, más preferiblemente sangre periférica o una fracción de células de sangre periférica. Como apreciarán los expertos en la técnica, una muestra de sangre puede incluir cualquier fracción o componente de la sangre, sin limitación, linfocitos T, monocitos, neutrófilos, eritrocitos, plaquetas y microvesículas tales como exosomas y vesículas similares a exosomas. En el contexto de esta divulgación, las células sanguíneas incluidas en una muestra de sangre incluyen cualquier célula nucleada y no se limitan a los componentes de la sangre completa. Como tales, las células sanguíneas incluyen, por ejemplo, tanto glóbulos blancos (WBCs, por sus siglas en inglés) como células raras, incluidas las CTCs.

Cada una de las muestras de esta divulgación puede contener una pluralidad de poblaciones celulares y subpoblaciones celulares que se pueden distinguir mediante métodos bien conocidos en la técnica (p. ej., FACS, inmunohistoquímica). Por ejemplo, una muestra de sangre puede contener poblaciones de células no nucleadas, tales como eritrocitos (por ejemplo, 4-5 millones/µl) o plaquetas (150.000-400.000 células/µl), y poblaciones de células nucleadas como glóbulos blancos (por ejemplo, 4.500-10.000 células/µl), CEC o CTCs (células tumorales circulantes; p. ej., 2-800 células/µl). Los glóbulos blancos pueden contener subpoblaciones celulares, por ejemplo, de neutrófilos (2.500-8.000 células/µl), linfocitos (1.000-4.000 células/µl), monocitos (100-700 células/µl), eosinófilos (50-500 células/µl), basófilos (25-100 células/µl) y similares. Las muestras de esta divulgación son muestras no enriquecidas, es decir, no están enriquecidas en relación con ninguna población o subpoblación específica de células nucleadas. Por ejemplo, las muestras de sangre no enriquecidas no están enriquecidas en relación con CTCs, WBCs, linfocitos B, linfocitos T, células NK, monocitos o similares.

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre, obtenida a partir de un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata en base a una biopsia de tejido o de líquido y/o una cirugía o motivos clínicos. En algunas realizaciones, la muestra de sangre se obtiene a partir de un sujeto que muestra una manifestación clínica de cáncer de próstata que avanza a CRPC, que incluye, entre otros, niveles crecientes de PSA antes del diagnóstico, después de la cirugía inicial o la radiación, o a pesar de la terapia hormonal. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene a partir de un sujeto que ha tenido una terapia hormonal o que se ha sometido a una orquiectomía bilateral y cuyos niveles de testosterona han descendido a menos de 50 ng/dl, y que muestra una evidencia de progresión de la enfermedad en forma de aumento de los niveles de PSA o metástasis óseas o de tejidos blandos. En algunos casos, la muestra se obtiene a partir de un sujeto que se ha sometido a terapias hormonales primarias, que son los agonistas de la LHRH, por ejemplo, leuprolida (Lupron) o goserelina (Zoladex). En algunos casos, la muestra se obtiene a partir de un sujeto que se ha sometido a terapias dirigidas a AR, por ejemplo, Zytiga (arbiterona), que bloquea la producción de andrógenos, y Xtandi (enzalutamida), un inhibidor del receptor de andrógenos (AR). En otras realizaciones, la muestra biológica se obtiene a partir de un sujeto sano o de un sujeto que se considera que tiene un alto riesgo existente de cáncer de próstata y/o metástasis de cáncer de próstata, basándose en criterios conocidos clínicamente establecidos que incluyen, por ejemplo, la edad, la raza, la familia y el historial.

Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "análisis directo" significa que las CTCs se detectan en el contexto de todas las células nucleadas circundantes presentes en la muestra, en lugar de después del enriquecimiento de la muestra para CTCs antes de la detección. En algunas realizaciones, los métodos comprenden una microscopía que proporciona un campo de visión que incluye tanto las CTCs como al menos 200 glóbulos blancos (WBCs) circundantes.

En algunas realizaciones, determinar el número de CTCs que expresan PSMA, se refiere a determinar el número absoluto. En otras realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el número de CTCs que expresan PSMA puede incluir además la determinación del número/proporción relativa de CTCs que expresan PSMA entre todas las CTCs. En algunas realizaciones, el número absoluto o número relativo/proporción de CTCs que expresan PSMA entre todas las CTCs, se denomina además el tamaño de una subpoblación de CTCs que expresa PSMA.

Un aspecto fundamental de la presente divulgación es la solidez no paralela de los métodos descritos, con respecto a la detección de CTCs. La detección de eventos raros descrita en este documento con respecto a las CTCs, se basa en un análisis directo, es decir no enriquecido, de una población que incluye la identificación de eventos raros en el contexto de los eventos no raros circundantes. La identificación de los eventos raros de acuerdo con los métodos descritos, identifica inherentemente los eventos circundantes como eventos no raros. Teniendo en cuenta los eventos no raros circundantes y determinando los promedios de los eventos no raros, por ejemplo, el tamaño promedio de las células de los eventos no raros, se permite calibrar el método de detección eliminando el ruido de fondo. El resultado es una solidez de los métodos descritos que no se puede lograr con métodos que no se basan en el análisis directo, sino que comparan poblaciones enriquecidas con comparaciones contextuales inherentemente distorsionadas de eventos raros. La solidez de los métodos de análisis directo descritos en este documento permite la caracterización de CTCs, incluidas las subpoblaciones de CTCs descritas en este documento, lo que no se puede lograr con otros métodos de detección de CTCs dependientes del enriquecimiento, y permite la identificación y el análisis de biomarcadores morfológicos y proteicos indicativos de la presencia de una subpoblación de CTCs asociada con el CRPC en el contexto de los métodos reivindicados. Es probable que los enfoques que enriquecen las CTCs en función de la expresión epitelial o de características físicas pasen por alto las CTCs no tradicionales. La inclusión y caracterización de las CTCs no tradicionales en el mCRPC y en otros tipos de cáncer proporciona una información para el pronóstico/predicción que sobrepasa a la de las CTCs tradicionales.

Tal y como se describe en este documento, los métodos descritos en este documento permiten una detección de las

CTCs que expresan PSMA en un paciente que padece cáncer de próstata, por ejemplo, mCRPC, y hacen posible la distinción entre diferentes grupos de pacientes en el caso de una resistencia, para adaptar el tratamiento posterior con mayor precisión y eficacia. Los métodos de la invención permiten además un control de la resistencia de los pacientes con cáncer de próstata, al permitir detectar una aparición de resistencia frente a terapias dirigidas a AR en un paciente que padece cáncer de próstata. La rápida evolución de las terapias farmacológicas en el cáncer de próstata ha mejorado enormemente el uso de docetaxel desde su aprobación crucial en la “Food and Drug Administration” (FDA) de los EE.UU. en el año 2004 y ha dado lugar a una nueva era en la que se ha avanzado superando el uso de la terapia de privación de andrógenos (ADT) con la adición de nuevos agentes hormonales, inmunoterapia, quimioterapia de segunda línea y radiofármacos. La elección de una secuencia actualmente se basa en los perfiles de los pacientes, si es que existen síntomas de enfermedad metastásica o no. Si bien los resultados de la supervivencia mejoran indudablemente con el uso de esas terapias, la enfermedad finalmente progresará con cada régimen.

Los andrógenos en forma de testosterona o la dihidrotestosterona (DHT), que es más potente, han sido impulsores bien definidos de la progresión del cáncer de próstata y la diferenciación de la glándula prostática. Como tal, la base de un tratamiento para los cánceres de próstata avanzados se estableció hace décadas cuando la castración en forma de orquiectomía quirúrgica logró una regresión significativa del tumor de próstata. Desde entonces, la sustitución por una castración química se ha empleado principalmente debido a la preferencia del paciente. Por lo tanto, la ADT se ha convertido en el tratamiento sistémico estándar para el cáncer de próstata metastásico o localmente avanzado. Si bien la ADT casi siempre es eficaz en la mayoría de los pacientes, inevitablemente se produce una progresión de la enfermedad hacia la resistencia a la castración. Ahora se reconoce cada vez más que el receptor de andrógenos (AR) permanece sobreexpresado a pesar de los niveles aparentemente castrados de testosterona, ya que los receptores alternativos pueden activar el AR u otros genes diana pueden ayudar a perpetuar el fenotipo resistente a la castración, por lo que la expresión "resistencia a la castración" se ha adoptado ampliamente en las publicaciones. Una comprensión mejorada de la función de esos andrógenos en la estimulación del crecimiento del cáncer de próstata, ha llevado al desarrollo y la aprobación de terapias de nueva generación dirigidas a AR, como Zytiga (arbiterona), que bloquea la producción de andrógenos, y Xtandi (enzalutamida), un inhibidor del receptor de andrógenos (AR).

PSMA es una glicoproteína integral de membrana de tipo II dimérica, altamente expresada en las células del cáncer de próstata. Se ha mostrado que es un predictor de la progresión del cáncer de próstata y del pronóstico del cáncer de próstata. Por ejemplo, se observan niveles elevados de PSMA en formas agresivas de la enfermedad, es decir, cánceres de próstata metastásicos y de mayor grado. La expresión de un nivel elevado de PSMA se correlaciona con una recurrencia temprana de PSA en un cáncer de próstata tratado quirúrgicamente. PSMA se correlaciona con la agresividad de la enfermedad, el fracaso de una terapia dirigida al receptor de andrógenos (AR) y una enfermedad progresiva y, por lo tanto, sostiene firmemente a PSMA como una diana para la caracterización del cáncer de próstata y la terapia posterior.

Tal y como se describe en el presente documento, los métodos de la invención permiten la detección de CTCs que expresan PSMA en un paciente afectado por mCRPC y hacen posible adaptar un tratamiento posterior de forma más precisa y eficaz. Los métodos de la invención permiten además controlar la resistencia de un paciente con cáncer de próstata, al permitir la detección de la aparición de un fracaso de la terapia dirigida a AR en un paciente afectado por cáncer de próstata, basándose en la detección de CTCs que expresan PSMA. Además, los métodos de la invención permiten seleccionar un paciente con cáncer de próstata que es un candidato para la terapia dirigida a PSMA, por ejemplo, BIND-014, Progenics ADC, así como otras terapias basadas en anticuerpos, dirigidas al dominio extracelular expuesto de PSMA.

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el paciente se somete a un tratamiento hormonal. En ciertas realizaciones, el tratamiento hormonal es ADT primario. En realizaciones adicionales, el paciente se somete a un tratamiento hormonal secundario y/o terapia citotóxica. En algunas realizaciones, el paciente se somete a una primera terapia hormonal "secundaria", como antiandrógenos y ketoconazol, que son opciones para un CRPC no metastásico. En otras realizaciones, el paciente se somete a un tratamiento con una terapia dirigida contra AR de segunda generación, como enzalutamida (Xtandi), que es más potente que los antiandrógenos de primera generación debido a su capacidad para bloquear la translocación nuclear de AR y está aprobado para su uso en el mCRPC, o abiraterona (Zytiga) que es un potente inhibidor de la síntesis de andrógenos. En algunas realizaciones, el paciente se somete a una quimioterapia citotóxica con un régimen basado en platino, por ejemplo y sin limitación, docetaxel (Taxotere®), mitoxantronapaclitaxel (Taxol®) y cabazitaxel.

En algunas realizaciones, el método para detectar PSMA sobre células tumorales circulantes (CTCs) y los métodos relacionados descritos en el presente documento pueden incluir además factores de riesgo de pacientes individuales, datos clínicos, de biopsia o de formación de imágenes, que incluyen cualquier forma de modalidad de formación de imágenes conocida y utilizada en la técnica, por ejemplo y sin limitación, mediante tomografía computarizada (CT) de rayos X, ultrasonidos, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía de impedancia eléctrica y resonancia magnética (MRI). Se entiende que un experto en la técnica puede seleccionar una modalidad de formación de imágenes basándose en una variedad de criterios conocidos en la técnica. Además, los métodos descritos en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más factores de riesgo individuales que pueden seleccionarse a partir del grupo que consiste en, por ejemplo, edad, raza, antecedentes familiares, antecedentes clínicos y/o datos.

Los factores de riesgo para un CRPC en el contexto de los datos clínicos incluyen además, por ejemplo, PSA, marcadores de recambio óseo, dolor óseo, gammagrafías óseas. En esos casos, se pueden realizar biopsias para confirmar o descartar un mCRPC y los métodos para detectar mCRPC en un paciente afectado por cáncer de próstata pueden incluir además como factor de riesgo, los datos resultantes de una biopsia. Se entiende que un experto en la técnica puede seleccionar factores de riesgo individuales adicionales basándose en una variedad de criterios conocidos en la técnica. Tal y como se describe en el presente documento, los métodos de la invención pueden incluir uno o más factores de riesgo individuales. En consecuencia, los biomarcadores pueden incluir, sin limitación, datos de formación de imágenes, datos clínicos, datos de biopsias y factores de riesgo individuales. Tal y como se describe en este documento, los biomarcadores también pueden incluir, entre otros, moléculas biológicas que comprenden nucleótidos, ácidos nucleicos, nucleósidos, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, esteroides, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, anticuerpos, regiones de interés que sirven como sustitutos de macromoléculas biológicas y combinaciones de los mismos (por ejemplo, glicoproteínas, ribonucleoproteínas, lipoproteínas) así como porciones o fragmentos de una molécula biológica.

El análisis directo de las CTCs tal y como se usa en la invención, incluye características morfológicas y características inmunofluorescentes. Como entenderán los expertos en la técnica, los biomarcadores pueden incluir una molécula biológica, o un fragmento de una molécula biológica, cuyo cambio y/o detección puede correlacionarse, individualmente o de forma combinada con otras características medibles, con mCRPC. Las CTCs, que pueden estar presentes como células individuales o en agrupaciones de CTCs, a menudo son células epiteliales que se desprenden de tumores sólidos y están presentes en concentraciones muy bajas en la circulación de los sujetos. En consecuencia, la detección de CTCs en una muestra de sangre puede denominarse detección de eventos raros. Las CTCs tienen una abundancia de menos de 1:1.000 en una población de células sanguíneas, por ejemplo, una abundancia de menos de 1:5.000, 1:10.000, 1:30.000, 1:50:000, 1:100.000, 1:300.000, 1:500.000 o 1:1.000.000. En algunas realizaciones, las CTCs tienen una abundancia de 1:50:000 a 1:100.000 en la población celular.

Las muestras de esta divulgación se pueden obtener por cualquier medio, incluyendo, por ejemplo, mediante biopsia de un tejido sólido o biopsia de un líquido (véase, por ejemplo, Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9(1):016003). Brevemente, en realizaciones particulares, el procedimiento puede incluir la lisis y la eliminación de los glóbulos rojos en una muestra de sangre de 7,5 ml, el depósito de las células nucleadas restantes sobre portaobjetos de microscopio especializados, cada uno de los cuales acomoda el equivalente de aproximadamente 0,5 ml de sangre completa. Una muestra de sangre puede extraerse de cualquier fuente conocida que incluya células sanguíneas o componentes de las mismas, tal como sangre venosa, arterial, periférica, tisular, del cordón umbilical, y similares. Las muestras pueden procesarse usando métodos clínicos rutinarios y bien conocidos (p. ej., procedimientos para extraer y procesar sangre completa). En algunas realizaciones, se extrae una muestra de sangre en tubos de recogida de sangre anticoagulantes (BCT), que pueden contener EDTA o Streck Cell-Free DNA™. En otras realizaciones, se extrae una muestra de sangre en tubos CellSave® (Veridex). Una muestra de sangre puede almacenarse además hasta 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 60 horas antes de su procesamiento adicional.

En algunas realizaciones, los métodos de esta divulgación comprenden una etapa inicial de obtener un recuento de glóbulos blancos (WBC) para la muestra de sangre. En determinadas realizaciones, el recuento de leucocitos puede obtenerse mediante el uso de un dispositivo HemoCue® para WBC (Hemocue, Ängelholm, Suecia). En algunas realizaciones, el recuento de leucocitos se utiliza para determinar la cantidad de sangre necesaria para extender sobre una placa un volumen de carga constante de células nucleadas en cada portaobjetos y para calcular el equivalente de CTCs por cada volumen de sangre.

En algunas realizaciones, los métodos de esta divulgación comprenden una etapa inicial de lisis de eritrocitos en la muestra de sangre. En algunas realizaciones, los eritrocitos se lisan, por ejemplo, añadiendo una solución de cloruro de amonio a la muestra de sangre. En ciertas realizaciones, una muestra de sangre se somete a centrifugación después de la lisis de los eritrocitos y se vuelven a suspender las células nucleadas, por ejemplo, en una solución PBS.

En algunas realizaciones, las células nucleadas de una muestra de sangre se depositan como una monocapa sobre un soporte plano. El soporte plano puede ser de cualquier material, por ejemplo, cualquier material transparente fluorescente, cualquier material que favorezca la fijación de las células, cualquier material que permita una eliminación sencilla de restos celulares, cualquier material que tenga un espesor de <100 µm. En algunas realizaciones, el material es una película. En algunas realizaciones, el material es un portaobjetos de vidrio. En ciertas realizaciones, el método incluye una etapa inicial de depositar células nucleadas de la muestra de sangre como una monocapa sobre un portaobjetos de vidrio. El portaobjetos de vidrio se puede recubrir para permitir la máxima retención de células vivas (véase, por ejemplo, Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9(1):016003). En algunas realizaciones, aproximadamente 0,5 millones, 1 millón, 1,5 millones, 2 millones, 2,5 millones, 3 millones, 3,5 millones, 4 millones, 4,5 millones o 5 millones de células nucleadas se depositan sobre el portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, los métodos de esta divulgación comprenden depositar aproximadamente 3 millones de células sobre un portaobjetos de vidrio. En realizaciones adicionales, los métodos de esta divulgación comprenden depositar entre aproximadamente 2 millones y aproximadamente 3 millones de células sobre el portaobjetos de vidrio. En algunas realizaciones, el portaobjetos de vidrio y las muestras celulares inmovilizadas están disponibles para un procesamiento o experimentación posteriores, después de que se hayan completado los métodos de esta divulgación.

En algunas realizaciones, los métodos de esta divulgación comprenden una etapa inicial de identificación de células

nucleadas en la muestra de sangre no enriquecida. En algunas realizaciones, las células nucleadas se identifican con una tinción fluorescente. En ciertas realizaciones, la tinción fluorescente comprende una tinción específica del ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la tinción fluorescente es diamidino-2-fenilindol (DAPI). En algunas realizaciones, la tinción inmunofluorescente de células nucleadas comprende pan citoqueratina (CK), agrupación de diferenciación (CD) 45 y DAPI. En algunas realizaciones descritas con más detalle en el presente documento, las CTCs comprenden una tinción inmunofluorescente distinta de las células nucleadas circundantes. En algunas realizaciones, la tinción inmunofluorescente distinta de las CTCs detecta las CTCs DAPI (+), CK (+) y CD 45 (-), también denominadas CTCs tradicionales. En algunas realizaciones, la identificación de CTCs comprende además comparar la intensidad de la tinción fluorescente de pan citoqueratina con las células nucleadas circundantes. En algunas realizaciones, las CTCs son CTCs CK-, que se identifican como CTC basándose en otras características. Tal y como se describe en el presente documento, las CTCs detectadas en los métodos de la invención incluyen las CTCs tradicionales, CTCs negativas para citoqueratina (CK^-), CTCs pequeñas y agrupaciones de CTCs. En algunas realizaciones, la detección y el análisis de CTCs se logran mediante microscopía de barrido con fluorescencia para detectar la tinción inmunofluorescente de células nucleadas en una muestra de sangre. (Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9(1):016003).

En realizaciones particulares, todas las células nucleadas se conservan y se tiñen de forma inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales dirigidos a la citoqueratina (CK), un filamento intermedio que se encuentra exclusivamente en las células epiteliales, un anticuerpo específico de pan leucocitos dirigido al antígeno leucocitario común CD45 y una tinción nuclear, DAPI. Las células sanguíneas nucleadas se pueden visualizar en múltiples canales fluorescentes para producir imágenes digitales de alta calidad y alta resolución que conservan los detalles citológicos finos del contorno nuclear y la distribución citoplasmática. Mientras que los glóbulos blancos circundantes pueden identificarse con el anticuerpo específico de pan leucocitos dirigido a CD45, las CTCs tradicionales pueden identificarse, por ejemplo, como DAPI (+), CK (+) y CD 45 (-). En los métodos descritos en el presente documento, las CTCs comprenden una tinción inmunofluorescente distinta de las células nucleadas circundantes.

Tal y como se describe en este documento, las CTCs incluyen las CTCs tradicionales, también denominadas CTCs de alta definición (HD-CTCs). Las CTCs tradicionales son positivas para CK, negativas para CD45, contienen un núcleo positivo para DAPI intacto sin cambios apoptóticos identificables o una apariencia alterada, y son morfológicamente distintas de los glóbulos blancos (WBCs) circundantes. Las intensidades de DAPI (+), CK (+) y CD45 (-) se pueden clasificar como características medibles durante el recuento de CTCs, tal y como se ha descrito anteriormente. Nieva et al., Phys Biol 9:016004 (2012). El análisis directo, sin enriquecimiento, empleado por los métodos descritos en el presente documento, da como resultado una alta sensibilidad y una alta especificidad, al tiempo que añade una citomorfología de alta definición para permitir una caracterización morfológica detallada de una población de CTCs que se sabe que es heterogénea. En algunas realizaciones, las características morfológicas de una CTC detectada en los métodos de la invención, comprenden una o más del grupo que consiste en tamaño del núcleo, forma del núcleo, presencia de orificios en el núcleo, tamaño de la célula, forma de la célula y relación entre núcleo y citoplasma, detalle del núcleo, contorno nuclear, prevalencia de nucléolos, calidad del citoplasma y cantidad de citoplasma.

Si bien las CTCs tradicionales pueden identificarse mediante inmunofluorescencia como que comprenden células DAPI (+), CK (+) y CD 45 (-), los métodos de la invención pueden realizarse con cualquier otro biomarcador que un experto en la técnica seleccione para detectar CTCs tradicionales y CTCs no tradicionales en una muestra biológica. El experto en la materia sabe cómo seleccionar una característica morfológica, una molécula biológica o un fragmento de una molécula biológica, cuyo cambio y/o detección puede correlacionarse con una CTC. Los biomarcadores moleculares incluyen, entre otros, moléculas biológicas que comprenden nucleótidos, ácidos nucleicos, nucleósidos, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, esteroides, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, anticuerpos, regiones de interés que sirven como sustitutos de macromoléculas biológicas y combinaciones de los mismos (por ejemplo, glicoproteínas, ribonucleoproteínas, lipoproteínas). El término también incluye porciones o fragmentos de una molécula biológica, por ejemplo, un fragmento peptídico de una proteína o polipéptido.

Una persona experta en la técnica apreciará que se pueden usar varios métodos para detectar y analizar las CTCs, incluidos enfoques basados en microscopía que incluyen microscopía de barrido con fluorescencia (véase, por ejemplo, Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9(1):016003), enfoques de espectrometría de masas, como MS/MS, LC-MS/MS, monitorización de reacciones múltiples (MRM) o SRM y monitorización de iones de producto (PIM), y también incluye métodos basados en anticuerpos como inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, inmunoensayos como transferencias Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, transferencia de puntos y FACS. Las técnicas y los protocolos de inmunoensayo son generalmente conocidos por los expertos en la materia (Price y Newman, Principles and Practice of Immunoassay, 2ª edición, Grove's Dictionaries, 1997; y Gosling, Immunoassays: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000). Se puede utilizar una variedad de técnicas de inmunoensayo, incluidos los inmunoensayos competitivos y no competitivos (Self et al., Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65 (1996), véase también John R. Crowther, The ELISA Guidebook, 1ª ed., Humana Press 2000, ISBN 0896037282 y, An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, by Chard T, compilador, Elsevier Science 1995, ISBN 0444821198).

Una persona experta en la técnica apreciará además que la prevalencia de biomarcadores de proteínas puede detectarse utilizando cualquier clase de reactivos de unión, específicos de marcadores conocidos en la técnica, incluidos, por ejemplo, anticuerpos, aptámeros, proteínas de fusión, como proteínas de fusión que incluyen proteínas componentes de ligandos de proteínas o receptores, o aglutinantes de moléculas pequeñas específicos de

biomarcadores. En algunas realizaciones, la prevalencia de AR, CK o CD45 está determinada por un anticuerpo.

Los anticuerpos de esta divulgación se unen específicamente a un biomarcador de proteína. El anticuerpo se puede preparar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2ª ed. 1986). El anticuerpo puede ser cualquier inmunoglobulina o derivado de la misma, ya sea natural o producido total o parcialmente de forma sintética. Todos sus derivados que conservan la capacidad de unión específica, también se incluyen en la expresión. El anticuerpo tiene un dominio de unión que es homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión de una inmunoglobulina y se puede obtener a partir de fuentes naturales, o producirse parcial o totalmente de forma sintética. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. Los expertos en la técnica apreciarán que el anticuerpo se puede proporcionar con cualquiera entre una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, humanizado, parcialmente humanizado, quimérico, quimérico humanizado, etc. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo que incluye, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, scFv, Fv, dsFv y Fd. El anticuerpo se puede producir por cualquier medio. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir enzimática o químicamente mediante la fragmentación de un anticuerpo intacto y/o se puede producir de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo. El anticuerpo puede comprender un fragmento de anticuerpo monocatenario. Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo puede comprender cadenas múltiples que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro, y cualquier fragmento funcional obtenido a partir de tales moléculas, en donde tales fragmentos conservan las propiedades de unión específicas de la molécula de anticuerpo original. Debido a su tamaño más pequeño como componentes funcionales de la molécula completa, los fragmentos de anticuerpos pueden ofrecer ventajas sobre los anticuerpos intactos para uso en determinadas técnicas inmunoquímicas y aplicaciones experimentales.

Se puede usar un marcador detectable en los métodos descritos en el presente documento para la detección directa o indirecta de los biomarcadores, cuando se ponen en práctica los métodos de la invención. Se puede utilizar una amplia variedad de marcadores detectables, y la elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la habilidad para la conjugación con el anticuerpo, los requisitos de estabilidad y los suministros y la instrumentación disponibles. Los expertos en la técnica están familiarizados con la selección de un marcador detectable adecuado, basándose en la detección con un ensayo de los biomarcadores en los métodos de la invención. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (p. ej., fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo de Texas, isotiocianato de tetrarodimina (TRITC), Cy3, Cy5, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 488), marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), ficoeritrina, etc.), enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina, metales y similares.

Para un análisis basado en la espectrometría de masas, marcar de forma diferencial con reactivos isotópicos, por ejemplo, marcadores de afinidad codificadas por isótopos (ICAT) o la variación más reciente que utiliza reactivos de marcado isobárico, iTRAQ (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), seguido de cromatografía líquida multidimensional (LC) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS), el análisis puede proporcionar una metodología adicional en la puesta en práctica de los métodos de esta divulgación.

Se puede utilizar un ensayo de quimioluminiscencia que utiliza un anticuerpo quimioluminiscente para la detección sensible y no radiactiva de proteínas. También puede ser adecuado un anticuerpo marcado con fluorocromo. Los ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo de Texas y lisamina. Los marcadores indirectos incluyen varias enzimas bien conocidas en la técnica, como la peroxidasa de rábano picante (HRP), la fosfatasa alcalina (AP), la beta-galactosidasa, la ureasa y similares. Los sistemas de detección que utilizan sustratos adecuados para peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa son bien conocidos en la técnica.

Una señal procedente del marcador directo o indirecto se puede analizar, por ejemplo, usando un microscopio, tal como un microscopio de fluorescencia o un microscopio de barrido con fluorescencia. Alternativamente, se puede usar un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un medidor de la radiación para detectar radiación, como un contador gamma para la detección de ^{125}I, o un fluorómetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de cierta longitud de onda. Si se desea, los ensayos usados para poner en práctica los métodos de esta divulgación, pueden automatizarse o realizarse de forma robótica, y la señal de múltiples muestras puede detectarse simultáneamente.

En algunas realizaciones, los biomarcadores son marcadores inmunofluorescentes. En algunas realizaciones, los marcadores inmunofluorescentes comprenden un marcador específico para células epiteliales. En algunas realizaciones, los marcadores inmunofluorescentes comprenden un marcador específico para glóbulos blancos (WBCs). En algunas realizaciones, uno o más de los marcadores inmunofluorescentes comprenden CD45 y CK.

En algunas realizaciones, la prevalencia de marcadores inmunofluorescentes en células nucleadas, como CTCs o WBCs, da como resultado distintos patrones de tinción inmunofluorescente. Los patrones de tinción inmunofluorescente para CTCs y WBCs pueden diferir según los marcadores epiteliales o de WBC que se detectan en las células respectivas. En algunas realizaciones, determinar la prevalencia de uno o más marcadores inmunofluorescentes comprende comparar la tinción inmunofluorescente distinta de las CTCs con la tinción

inmunofluorescente distinta de las WBCs usando, por ejemplo, una tinción inmunofluorescente de CD45, que identifica claramente las WBCs. Hay otros marcadores detectables o combinaciones de marcadores detectables que se unen a las diversas subpoblaciones de WBCs. Estos se pueden usar en varias combinaciones, incluso en combinación con o como una alternativa a la tinción inmunofluorescente de CD45.

Las CTCs pueden comprender características morfológicas distintas en comparación con las células nucleadas circundantes. En algunos casos, las características morfológicas comprenden el tamaño del núcleo, la forma del núcleo, el tamaño de la célula, la forma de la célula y/o la relación entre núcleo y citoplasma. En algunos casos, las células nucleadas pueden analizarse mediante un detalle nuclear, contorno nuclear, prevalencia de nucléolos, calidad del citoplasma, cantidad de citoplasma, intensidad de patrones de tinción inmunofluorescente. Un experto en la materia entiende que las características morfológicas de esta divulgación pueden incluir cualquier rasgo, propiedad, característica o aspecto de una célula que pueda determinarse y correlacionarse con la detección de una CTC. Las características morfológicas pueden comprender una o más del grupo que consiste en tamaño del núcleo, forma del núcleo, presencia de orificios en el núcleo, tamaño de la célula, forma de la célula y relación entre núcleo y citoplasma, detalle nuclear, contorno nuclear, predominio de nucléolos, calidad del citoplasma y cantidad de citoplasma.

La detección y el análisis de las CTCs se pueden realizar con cualquier método microscópico adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el método se realiza mediante microscopía de barrido fluorescente. En ciertas realizaciones, el método microscópico proporciona imágenes de alta resolución de CTCs y sus glóbulos blancos circundantes (véase, p. ej., Marrinucci D. et al., 2012, Phys. Biol. 9(1):016003). En algunas realizaciones, un portaobjetos recubierto con una monocapa de células nucleadas de una muestra, como una muestra de sangre no enriquecida, se examina mediante un microscopio de barrido fluorescente y se registran las intensidades de la fluorescencia procedentes de los marcadores inmunofluorescentes y las tinciones nucleares para permitir la determinación de la prevalencia de cada marcador inmunofluorescente y la valoración de la morfología de las células nucleadas. En algunas realizaciones, la recopilación y el análisis de datos microscópicos se realizan de forma automatizada.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención incluyen la detección de uno o más biomarcadores, por ejemplo, AR, CK y CD 45. Se considera que un biomarcador está presente en una célula si es detectable por encima del ruido de fondo del respectivo método de detección utilizado (p. ej., 2, 3, 5 o 10 veces más alto que el ruido de fondo; p. ej., 2σ o 3σ sobre el ruido de fondo). En algunas realizaciones, un biomarcador se considera ausente si no es detectable por encima del ruido de fondo del método de detección utilizado (p. ej., <1,5 veces o <2,0 veces mayor que la señal de fondo; p. ej., <1,5σ o <2,0σ sobre el ruido de fondo).

En algunas realizaciones, la prevalencia de los marcadores inmunofluorescentes en células nucleadas se determina seleccionando los tiempos de exposición durante el proceso de barrido de la fluorescencia, de modo que todos los marcadores inmunofluorescentes alcancen un nivel preestablecido de fluorescencia en los glóbulos blancos en el campo de visión. En esas condiciones, los marcadores inmunofluorescentes específicos de CTCs, aunque estén ausentes en las WBCs, son visibles en las WBCs como señales de fondo con alturas fijas. Además, los marcadores inmunofluorescentes específicos de WBCs que están ausentes en las CTCs, son visibles en las CTCs como señales de fondo con alturas fijas. Una célula se considera positiva para un marcador inmunofluorescente (es decir, el marcador se considera que está presente) si su señal fluorescente para el marcador respectivo es significativamente mayor que la señal de fondo fija (p. ej., 2, 3, 5 o 10 veces más alto que el ruido de fondo; p. ej., 2σ o 3σ sobre el ruido de fondo). Por ejemplo, una célula nucleada se considera positiva para CD 45 (CD 45^+) si su señal fluorescente para CD 45 es significativamente mayor que la señal de fondo. Una célula se considera negativa para un marcador inmunofluorescente (es decir, el marcador se considera que está ausente) si la señal de fluorescencia de la célula para el marcador respectivo no está significativamente por encima de la señal de fondo (p. ej., <1,5 veces o <2,0 veces mayor que la señal de fondo; p. ej., <1,5σ o <2,0σ sobre el ruido de fondo).

Por lo general, cada campo microscópico contiene CTCs y WBCs. En ciertos casos, el campo microscópico muestra al menos 1, 5, 10, 20, 50 o 100 CTCs. En ciertos casos, el campo microscópico muestra al menos 10, 25, 50, 100, 250, 500 o 1.000 veces más glóbulos blancos que CTCs. En ciertos casos, el campo microscópico comprende una o más CTCs o agrupaciones de CTCs rodeadas por al menos 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 1.000 o más WBCs.

En algunos métodos descritos en el presente documento, la detección de CTCs comprende el recuento de las CTCs que están presentes en la muestra de sangre. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen la detección de al menos 1,0 CTC/ml de sangre, 1,5 CTCs/ml de sangre, 2,0 CTCs/ml de sangre, 2,5 CTCs/ml de sangre, 3,0 CTCs/ml de sangre, 3,5 CTCs/ml de sangre, 4,0 CTCs/ml de sangre, 4,5 CTCs/ml de sangre, 5,0 CTCs/ml de sangre, 5,5 CTCs/ml de sangre, 6,0 CTCs/ml de sangre, 6,5 CTCs/ml de sangre, 7,0 CTCs/ml de sangre, 7,5 CTCs/ml de sangre, 8,0 CTCs/ml de sangre, 8,5 CTCs/ml de sangre, 9,0 CTCs/ml de sangre, 9,5 CTCs/ml de sangre, 10 CTCs/ml de sangre o más.

En algunas realizaciones, las CTCs detectadas en una muestra biológica comprenden distintos subtipos de CTCs, incluidas las CTCs no tradicionales. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento incluyen la detección de al menos 0,1 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,2 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,3 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,4 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,5 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,6 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,7 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,8 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 0,9 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 1 agrupación de CTCs/ml de sangre, 2 agrupaciones de CTCs/ml de

sangre, 3 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 4 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 5 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 6 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 7 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 8 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 9 agrupaciones de CTCs/ml de sangre, 10 agrupaciones/ml o más. En una realización particular, los métodos descritos en este documento incluyen la detección de al menos 1 agrupación de CTCs/ml de sangre

El método para detectar PSMA sobre las células tumorales circulantes (CTCs) y los métodos relacionados descritos en este documento, pueden comprender además la caracterización molecular de las CTCs, por ejemplo, mediante fluorescencia en una hibridación *in situ* (FISH). Las técnicas convencionales de biología molecular conocidas en la técnica y no descritas específicamente, son las que se siguen generalmente como las de Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989)), y como las de Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989) y como las de Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, New York (1988), y como las de Watson et al., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York y como las de Birren et al. (eds) Genome Analysis: A Laboratory Manual Series, vols. 1-4 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede llevar a cabo generalmente como en PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Cualquier método capaz de determinar un perfil de número de copias de ADN de una muestra en particular puede usarse para el perfil molecular, siempre que la resolución sea suficiente para identificar los biomarcadores. El experto en la materia conoce y es capaz de utilizar varias plataformas diferentes para evaluar los cambios en el número de copias de un genoma completo con una resolución suficiente para identificar el número de copias de uno o más biomarcadores.

Los ensayos de hibridación in situ son bien conocidos y generalmente se describen en Angerer et al., Methods Enzymol. 152:649-660 (1987). En un ensayo de hibridación in situ, las células, por ejemplo, de una biopsia, se fijan a un soporte sólido, típicamente un portaobjetos de vidrio. Si se va a analizar el ADN, las células se desnaturalizan con calor o álcali. A continuación, las células se ponen en contacto después con una solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de sondas específicas que están marcadas. Las sondas se marcan preferentemente con radioisótopos o indicadores fluorescentes. FISH (hibridación fluorescente in situ) utiliza sondas fluorescentes que se unen solo a aquellas partes de una secuencia con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia.

FISH es una técnica citogenética utilizada para detectar y localizar secuencias de polinucleótidos específicas en las células. Por ejemplo, FISH se puede utilizar para detectar secuencias de ADN en los cromosomas. FISH también se puede utilizar para detectar y localizar ARNs específicos, por ejemplo, ARNm, dentro de muestras de tejido. En FISH se utilizan sondas fluorescentes que se unen a secuencias de nucleótidos específicas con las que muestran un alto grado de similitud de secuencia. La microscopía de fluorescencia se puede utilizar para averiguar si las sondas fluorescentes están unidas y dónde. Además de detectar secuencias de nucleótidos específicas, por ejemplo, translocaciones, fusiones, rupturas, duplicaciones y otras anomalías cromosómicas, FISH puede ayudar a definir los patrones espacio-temporales del número de copias de genes específicos y/o la expresión de genes dentro de células y tejidos.

En algunas realizaciones, el método para detectar PSMA sobre las células tumorales circulantes (CTCs) y los métodos relacionados descritos en este documento, incluyen el uso de un modelo predictivo. En realizaciones adicionales, el método descrito para detectar PSMA sobre células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente afectado por cáncer de próstata, así como los métodos relacionados descritos en el presente documento, incluyen la comparación de una característica medible con una característica de referencia. Como podrán apreciar los expertos en la materia, esa comparación puede ser una comparación directa con la característica de referencia o una comparación indirecta, en donde la característica de referencia se ha incorporado al modelo predictivo. En realizaciones adicionales, el análisis de una característica medible en un método para detectar PSMA en células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente que padece cáncer de próstata, así como los métodos relacionados descritos en este documento, incluyen uno o más de un modelo de análisis discriminante lineal, un algoritmo de clasificación automática vectorial de soporte, un modelo de eliminación de características recursivas, un análisis de predicción del modelo de micromatriz, un modelo de regresión logística, un algoritmo CART, un algoritmo de árbol flexible, un algoritmo LART, un algoritmo de bosque aleatorio, un algoritmo MART, un algoritmo de aprendizaje automático, un método de regresión penalizado, o una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, el análisis comprende una regresión logística. En realizaciones adicionales, la detección de mCRPC en un paciente afectado por cáncer de próstata se expresa como una puntuación de riesgo.

Un procedimiento de clasificación analítica puede usar cualquiera entre una variedad de métodos analíticos estadísticos para manipular los datos cuantitativos y permitir una clasificación de la muestra. Ejemplos de métodos útiles incluyen el análisis discriminante lineal, la eliminación de características recursivas, un análisis de predicción de micromatriz, una regresión logística, un algoritmo CART, un algoritmo FlexTree, un algoritmo LART, un algoritmo de bosque aleatorio, un algoritmo MART, algoritmos de aprendizaje automático y otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

La clasificación se puede realizar de acuerdo con métodos de modelos predictivos que establecen un umbral para determinar la probabilidad de que una muestra pertenezca a una clase determinada. La probabilidad es preferentemente de al menos el 50%, o al menos el 60%, o al menos el 70%, o al menos el 80%, o al menos el 90% o superior. Las clasificaciones también se pueden realizar determinando si una comparación entre un conjunto de datos obtenido y un conjunto de datos de referencia produce una diferencia estadísticamente significativa. Si es así,

la muestra a partir de la cual se había obtenido el conjunto de datos, se clasifica como no perteneciente a la clase de conjunto de datos de referencia. Por el contrario, si esa comparación no es significativamente diferente desde el punto de vista estadístico a partir del conjunto de datos de referencia, entonces la muestra a partir de la cual se había obtenido el conjunto de datos, se clasifica como perteneciente a la clase de conjunto de datos de referencia.

La capacidad predictiva de un modelo se puede evaluar de acuerdo con su capacidad para proporcionar una medida de calidad, p. ej., AUROC (área bajo la curva ROC) o precisión, de un valor particular, o de un intervalo de valores. Las mediciones del área bajo la curva son útiles para comparar la precisión de un agente clasificador en todo el intervalo de datos. Los agentes clasificadores con mayor AUC tienen una mayor capacidad para clasificar correctamente las incógnitas entre dos grupos de interés. El análisis ROC se puede utilizar para seleccionar el umbral óptimo bajo una variedad de circunstancias clínicas, equilibrando las compensaciones inherentes que existen entre la especificidad y la sensibilidad. En algunas realizaciones, un umbral de calidad deseado es un modelo predictivo que clasificará una muestra con una precisión de al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,75, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,85, al menos aproximadamente 0,9, al menos aproximadamente 0,95 o más elevada. Como medición alternativa, un umbral de calidad deseado puede referirse a un modelo predictivo que clasificará una muestra con una AUC de al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,75, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,85, al menos aproximadamente 0,9 o más elevada.

Tal y como se conoce en la técnica, la sensibilidad y la especificidad relativas de un modelo predictivo se pueden ajustar para favorecer la medida de la especificidad o la medida de la sensibilidad, en donde las dos medidas tienen una relación inversa. Los límites en un modelo como el descrito anteriormente se pueden ajustar para proporcionar un nivel de sensibilidad o de especificidad seleccionado, dependiendo de los requisitos particulares de la prueba que se está realizando. Una o ambas entre la sensibilidad y la especificidad pueden ser al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,75, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,85, al menos aproximadamente 0,9 o superior.

Los datos sin procesar se pueden analizar inicialmente midiendo los valores de cada característica medible o biomarcador, generalmente por triplicado o en múltiples triplicados. Los datos se pueden manipular, por ejemplo, los datos sin procesar se pueden transformar usando curvas estándar y el promedio de mediciones por triplicado se usa para calcular el promedio y la desviación estándar para cada paciente. Esos valores se pueden transformar antes de ser utilizados en los modelos, p. ej., transformada logarítmica, transformada de Box-Cox (Box y Cox, Royal Stat. Soc., Serie B, 26:211-246 (1964). Luego, los datos se incluyen en un modelo predictivo, que clasificará la muestra según el estado. La información resultante se puede comunicar a un paciente o a un profesional médico.

En algunas realizaciones, el método para detectar PSMA sobre las células tumorales circulantes (CTCs) y los métodos relacionados descritos en el presente documento, tienen una especificidad de >60%, >70%, >80%, >90% o superior. En realizaciones adicionales, el método para detectar PSMA sobre las células tumorales circulantes (CTCs) y los métodos relacionados descritos en el presente documento, tienen una especificidad >90% con un umbral de clasificación de 7,5 CTCs/ml de sangre.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, no de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Detección de PSMA en la superficie de CTCs que comprende formación de imágenes HD

Este experimento demuestra la detección de PSMA en la superficie de CTCs que comprende la formación de imágenes de alta definición de células nucleadas extendidas en placas, basándose en un análisis directo que comprende una tinción inmunofluorescente y características morfológicas de las células nucleadas.

Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes (pacs) con mCRPC. Las células se tiñeron para estudiar CK, CD45, PSMA y se clasificaron como CTCs tradicionales (CK+, CD45-, núcleos intactos/morfológicamente distintos) o CTCs apoptóticas (CK+, CD45-, morfología que sugiere apoptosis). Se recogieron datos clínicos, incluyendo el tratamiento, los sitios metastásicos, el recuento de CTCs de Veridex, PSA y fosfatasa alcalina.

Se analizaron 14 pacs con mCRPC, incluidos 8 con muestras en serie (33 muestras en total). En la primera extracción (t1), se detectaron CTCs tradicionales en 13 pacs (93%), (mediana 2,5 células/ml, intervalo 0-43) y CTCs apoptóticas en 14 pacs (100%) (mediana 4,5 células/ml, intervalo 1-32) incluidos 6 pacs (42%) sin CTCs mediante CellSearch® de Veridex. La expresión de PSMA se detectó en 5 pacs (36%) con CTCs tradicionales de las cuales una mediana de 33% de las células (intervalo 32-100%) expresaban el antígeno. Se observó una heterogeneidad intrapacientes similar para los 10 pacs (71,4%) con CTCs apoptóticas PSMA+ (mediana 33%, intervalo 11-75% de células).

Durante el tratamiento, a menudo con una supresión de andrógenos más completa (en t1: enzalutamida (n=2), abiraterona (n=4), ADT solo (n=1), Casodex (n=1), se detectó posteriormente PSMA en 3 de los 8 (38%) pacs sin CTCs tradicionales PSMA+ en t1. La presencia de expresión de PSMA en las CTCs apoptóticas no cambió.

Posteriormente se detectó PSMA en 3 de los 8 (38%) pacs sin CTCs tradicionales PSMA+ en t1; esos 3 pacs estaban

todos recibiendo abiraterona. La presencia de expresión de PSMA en las CTCs apoptóticas no cambió.

Se observó un mayor porcentaje de expresión de PSMA en pacientes con mCRPC con CTCs apoptóticas (10/14) que con CTCs tradicionales (5/14) en t1. La heterogeneidad celular intrapacientes de la expresión de PSMA existía tanto en las CTCs tradicionales como en las apoptóticas. Mediciones en serie sugieren cambios dinámicos en la expresión de PSMA a lo largo del tiempo. Se están llevando a cabo muestras más grandes de pacientes en puntos de tiempo discretos en la terapia para dilucidar aún más la relevancia clínica potencial.

Ejemplo 2. Heterogeneidad de la expresión de PSMA en las CTCs tradicionales y apoptóticas en mCRPC

A 36 pacientes (pacs) con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC) se les extrajo sangre como parte de un protocolo de muestras biológicas aprobado por el IRB, con un total de 92 muestras recogidas y enviadas a Epic Sciences. El primer punto temporal se denominó t1. Las células tumorales circulantes se identificaron utilizando el procedimiento de recogida y detección de CTCs de Epic (Figura 1). Las CTCs tradicionales o clásicas se identificaron como células CK+ CD45- con núcleos DAPI intactos después de una revisión patológica de su morfología, mientras que las CTCs apoptóticas se definieron como células CK+ CD45- con morfología compatible con la apoptosis. Después de un recuento de todas las células, se evaluó la expresión de PSMA en las CTCs candidatas a partir de células tradicionales y apoptóticas mediante inmunofluorescencia (IF). Se recogieron para cada muestra las características clínicas, incluido el historial de terapia actual y anterior, PSA y el recuento concomitante mediante CellSearch.

6/14 (42,9%) de los pacs con CTCs que no expresaban PSMA en t1, finalmente tenían expresión de PSMA en las CTCs en un punto temporal posterior. Casi todos (5/6) los casos de "conversión" de CTCs PSMA- a + se asociaban con un cambio en la terapia provocado por la progresión de la enfermedad. 8/14 (57,1%) de los pacs con CTCs que no expresaban PSMA en t1, continuaron teniendo CTCs negativas para PSMA en extracciones en serie. La mitad de esos pacs permanecieron con la misma terapia y la otra mitad cambió de tratamiento. Por el contrario, 10/13 (76,9%) pacs con CTCs que expresaban PSMA en t1 continuaron teniendo CTCs que expresaban PSMA en puntos temporales posteriores. Los 3 pacs (3/13) con CTCs que expresaban PSMA en t1 que "se convirtieron" a CTCs que ya no expresaban PSMA, todos ellos lo hicieron con un cambio en la terapia (en la Figura 4 se destaca un caso).

La exposición a una quimioterapia previa no parecía cambiar la presencia o ausencia de CTCs que expresaban PSMA: 12/27 (44,4%) pacientes sin tratamiento previo con quimioterapia tenían CTCs tradicionales que expresaban PSMA en t1, en comparación con 5/9 (55,6%) pacientes con un historial de exposición previa a la quimioterapia. El estado de la quimioterapia tampoco parecía alterar la presencia de CTCs apoptóticas PSMA+ (21/27 (77,8%) frente a 6/9 (66,7%) en los pacientes sin tratamiento previo con quimioterapia frente a los expuestos, respectivamente.

La expresión de PSMA se detectó tanto en las CTCs apoptóticas como en las CTCs tradicionales. El 81,5% y el 40,2% de todas las muestras extraídas tenían CTCs que expresaban PSMA en esas dos poblaciones de CTCs, respectivamente. La heterogeneidad celular intrapacientes de la expresión de PSMA era característica de ambas poblaciones de CTCs. Hay cambios dinámicos en la expresión de PSMA a lo largo del tiempo, no solo en pacientes que cambian de terapia, sino también en pacientes que continúan con el mismo tratamiento. La conversión de CTCs PSMA+ a CTCs PSMA- era poco común con las extracciones de sangre en serie, pero cuando esto tenía lugar, parecía estar relacionado con un cambio en la terapia. Se desconoce el umbral de células detectables y la proporción y el grado de expresión de PSMA que se asocia con la sensibilidad al fármaco.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar un antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) sobre células tumorales circulantes (CTCs) obtenidas a partir de un paciente afectado por cáncer de próstata que comprende:

(a) realizar un análisis directo que comprende una tinción inmunofluorescente y una caracterización morfológica de células nucleadas en una muestra de sangre obtenida a partir del paciente para detectar células tumorales circulantes (CTC), en donde el análisis directo significa la detección de CTCs en el contexto de todas las células nucleadas circundantes presentes en la muestra, en lugar de después de un enriquecimiento de la muestra de CTCs antes de la detección; y

(b) determinar el número de CTCs que expresan PSMA,

en donde el análisis directo en la etapa (a) identifica más de una subpoblación de CTC que expresa PSMA,

en donde una primera subpoblación de CTC que expresa PSMA comprende CTCs tradicionales,

en donde las CTCs tradicionales contienen un núcleo con diamidino-2-fenilindol (DAPI+), son positivas para citoqueratina (CK+), y negativas para una agrupación de diferenciación 45 (CD45-) y son morfológicamente distintas de los glóbulos blancos (WBCs) circundantes, y

en donde una segunda subpoblación de CTC que expresa PSMA comprende CTCs apoptóticas CK+CD45-.

2. El método según la reivindicación 1, en donde dichas CTCs apoptóticas carecen de núcleos intactos.

3. El método según la reivindicación 1, en donde la tinción inmunofluorescente de las células nucleadas comprende pan citoqueratina, CD45 y DAPI.

4. El método según la reivindicación 1, en donde determinar la presencia de las subpoblaciones de CTC que expresan PSMA en la etapa (b) comprende el análisis de las CTCs detectadas en la etapa (a) a nivel de célula individual.

5. El método según la reivindicación 1, en donde el cáncer de próstata es cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC).

6. El método según la reivindicación 1, en donde el análisis directo comprende microscopía de barrido fluorescente.

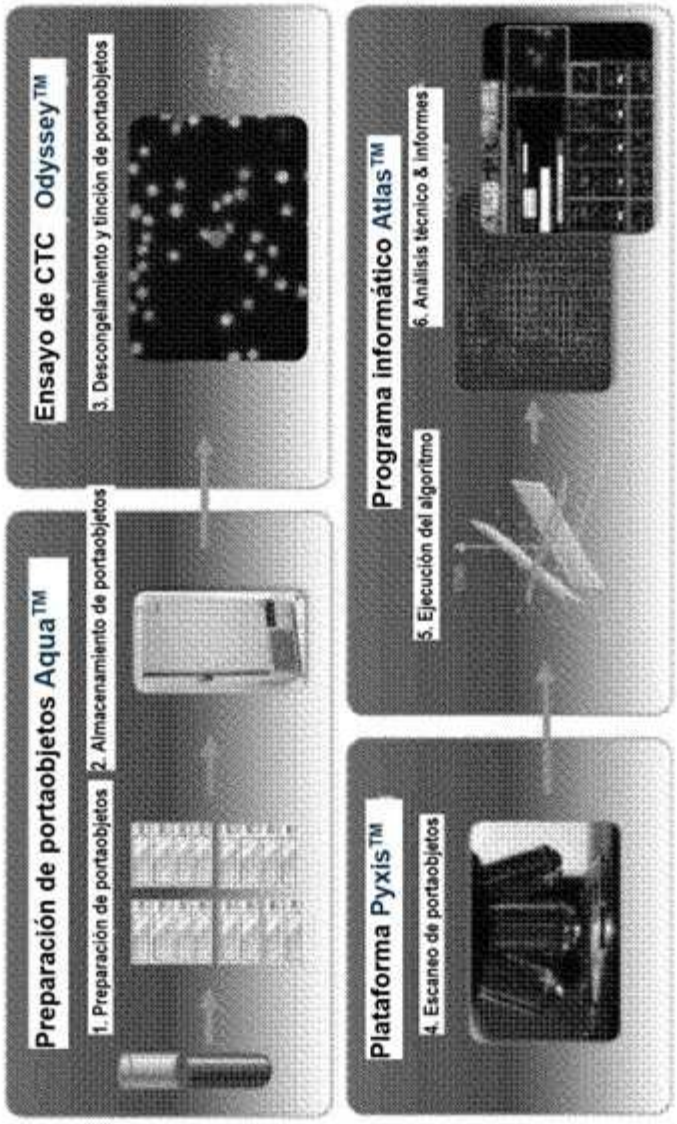

Preparación de portaobjetos Aqua™
1. Preparación de portaobjetos
2. Almacenamiento de portaobjetos
Ensayo de CTC Odyssey™
3. Descongelamiento y tinción de portaobjetos
Plataforma Pyxis™
4. Escaneo de portaobjetos
Programa informático Atlas™
5. Ejecución del algoritmo
6. Análisis técnico & informes

FIG. 1A

Característica	Nº (%) o Mediana (intervalo)
Número de pacientes	36
Edad, años	67 (47 - 91)
Tratamiento primario	
Prostatectomía	19 (53%)
Radiación	12 (33%)
Ninguna	5 (14%)
Terapias	
Terapias hormonales	
1-2 líneas	15 (42%)
3 líneas	13 (36%)
>4 líneas	8 (22%)
Sin quimio anterior	27 (75%)
Expuesto a quimio	9 (25%)
Enfermedad metastásica	
Hueso	35 (97%)
Ganglios linfáticos	23 (64%)
Hígado	4 (11%)
Pulmón	2 (5%)
Mediciones de laboratorio	
PSA, ng/mL	26.9 (0.51 - 807.0)
Hgb, (g/dl)	12.4 (7.7 - 14.1)
ALK, (unidades/L)	129 (50 - 1096)
LDH, (unidades/L)	228 (163 - 568)
ALB, (g/dl)	4.4 (3.7 - 4.7)
CTC usando CellSearch®, (células/7,5 ml)	4 (0 - >200)

FIG. 1B

ES 2 919 098 T3

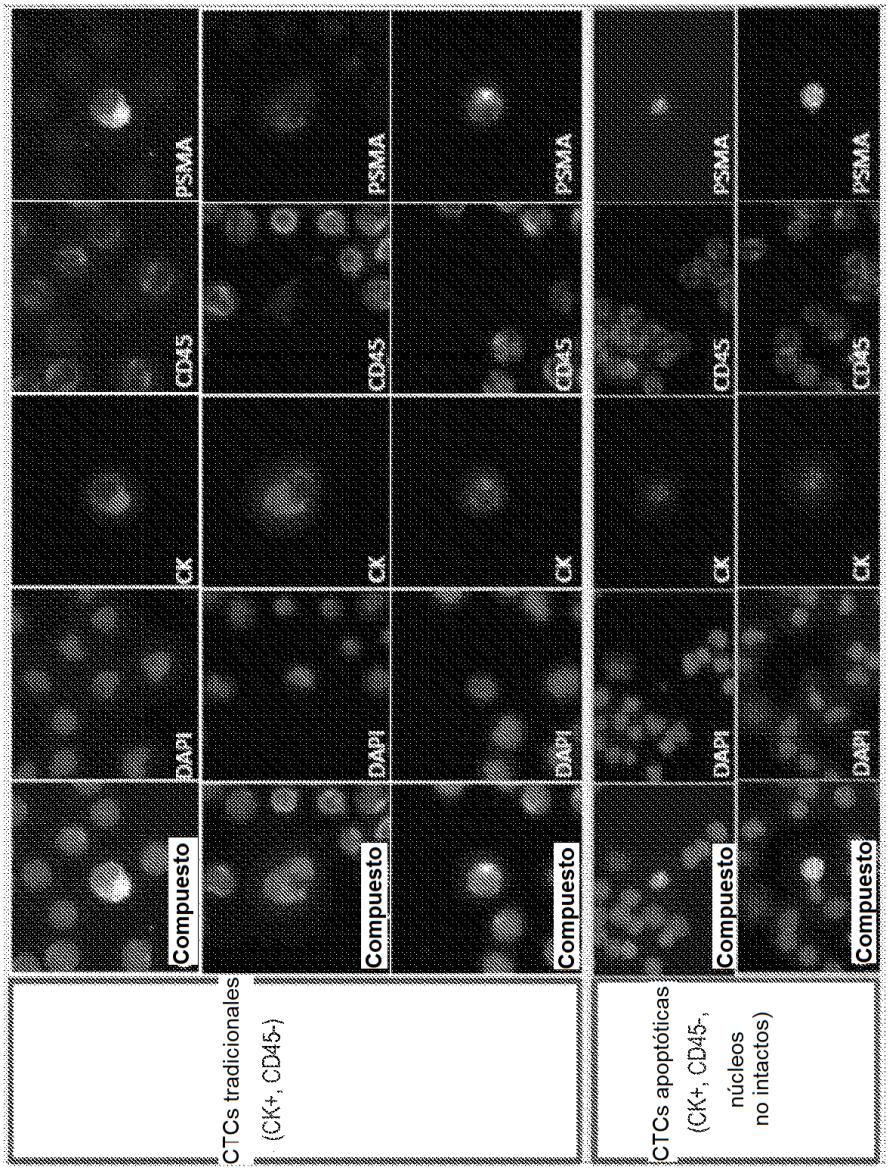

CTCs tradicionales
(CK+, CD45-)
CTCs apoptóticas
(CK+, CD45-,
núcleos
no intactos)
Compuesto
DAPI
CK
CD45
PSMA

FIG. 2A

Heterogeneidad entre 92 muestras de pacientes		
	CTC tradicional	CTC apoptótica
Mediana de número de células/mL de sangre	7.5	5.0
Intervalo de células/mL de sangre	0-896	0-267
% de muestras con CTC detectadas con EPIC	94.6%	96.7%
% de muestras con CTC detectadas con CellSearch®	77.3%	n/a
% de muestras con células positivas para PSMA	40.2%	81.5%
% de muestras con células negativas para PSMA	59.8%	15.5%

FIG. 2B

Pacientes con expresión de PSMA en CTC en la primera extracción de sangre (t1)		
	CTC tradicional	CTC apoptótica
Pacientes con células positivas para PSMA	17 (47.2%))	27 (75%)
Pacientes solo con células negativas para PSMA	19 (52.8%)	9 (25%)

FIG. 2C

ES 2 919 098 T3

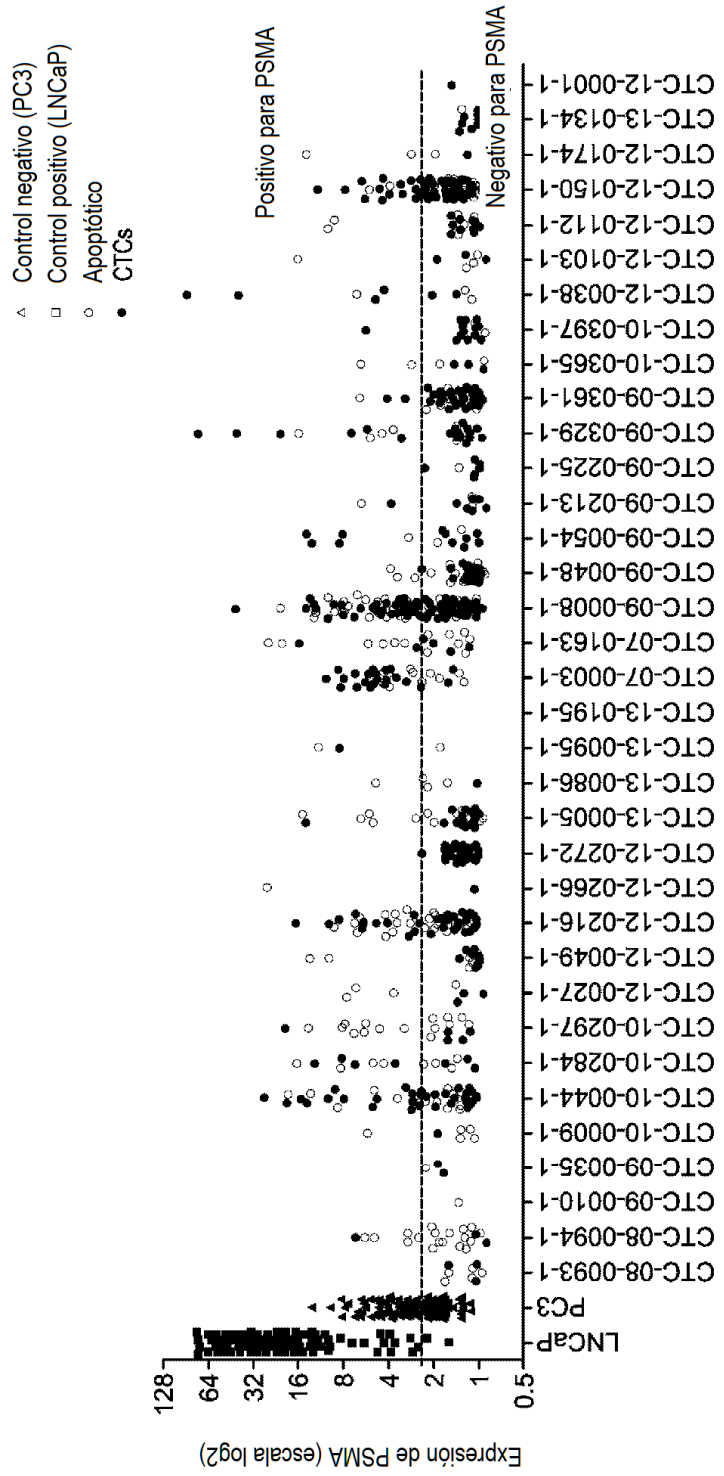

Control negativo (PC3)
Control positivo (LNCaP)
Apoptótico
CTCs
Positivo para PSMA
Negativo para PSMA
Expresión de PSMA (escala log2)
128
64
32
16
8
4
2
1
0.5
LNCaP
PC3
CTC-08-0093-1
CTC-08-0094-1
CTC-09-0010-1
CTC-09-0035-1
CTC-10-0009-1
CTC-10-0044-1
CTC-10-0284-1
CTC-10-0297-1
CTC-12-0027-1
CTC-12-0049-1
CTC-12-0216-1
CTC-12-0266-1
CTC-12-0272-1
CTC-13-0005-1
CTC-13-0086-1
CTC-13-0095-1
CTC-13-0195-1
CTC-07-0003-1
CTC-07-0163-1
CTC-09-0008-1
CTC-09-0048-1
CTC-09-0054-1
CTC-09-0213-1
CTC-09-0225-1
CTC-09-0329-1
CTC-09-0361-1
CTC-10-0365-1
CTC-10-0397-1
CTC-12-0038-1
CTC-12-0103-1
CTC-12-0112-1
CTC-12-0150-1
CTC-12-0174-1
CTC-13-0134-1
CTC-12-0001-1

FIG. 3

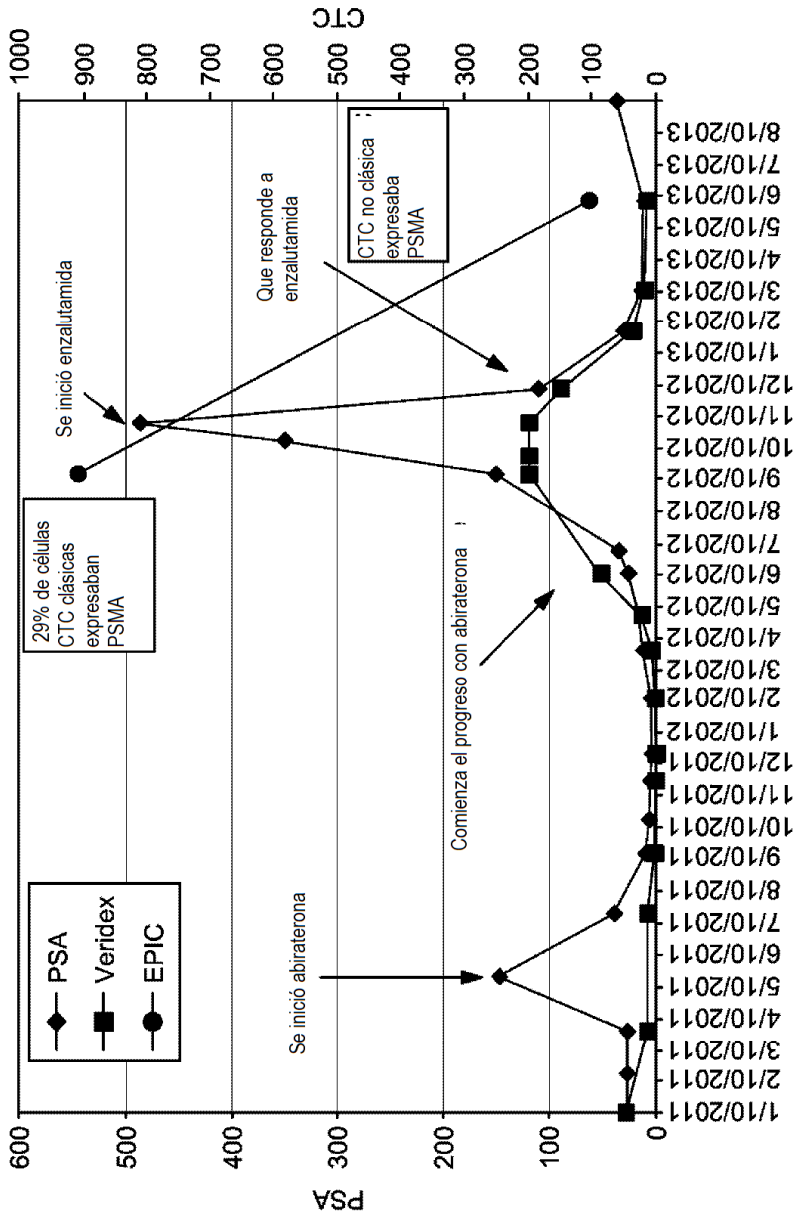

PSA
CTC
PSA
Veridex
EPIC
29% de células CTC clásicas expresaban PSMA
CTC no clásica expresaba PSMA
Se inició enzalutamida
Que responde a enzalutamida
Se inició abiraterona
Comienza el progreso con abiraterona

FIG. 4