



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0807384-8 A2



(22) Data de Depósito: 27/02/2008
(43) Data da Publicação: 20/05/2014
(RPI 2263)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/574

(54) Título: MÉTODO DE UMA ETAPA PARA DETECÇÃO DIRETA OU SIMULTÂNEA DE UMA CÉLULA CANCEROSA OU ELEMENTO DE CÉLULA CANCEROSA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, KIT PARA USO EM UM MÉTODO, BASE DE DADOS, MÉTODO PARA IDENTIFICAR CÉLULAS CANCEROSAS, E, USO DE UMA BASE DE DADOS.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 27/02/2007 US 60/903986

(73) Titular(es): Sentoclone AB

(72) Inventor(es): Magnus Thörn, Ola Winqvist

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008001542 de 27/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/104380 de 04/09/2008

REIVINDICAÇÕES

1. Método de uma etapa para detecção direta ou simultânea de uma célula cancerosa ou elemento de célula cancerosa em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 i) adicionar à dita amostra biológica um painel de agentes, que se ligam a dois ou mais marcadores extracelulares diferentes, em que pelo menos um dos agentes é específico de câncer,

 ii) submeter a amostra biológica assim obtida à citometria de fluxo.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para detectar células cancerosas disseminadas em tecidos.

 3. Método de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é para detectar células cancerosas no sistema linfático.

15 4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que é para detectar células cancerosas nos linfonodos sentinela ou *metinel*.

 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de precedentes, caracterizado pelo fato de que as células cancerosas são
20 detectadas com uma sensibilidade de 90 % ou mais, tal como, por exemplo, 91 % ou mais, 92 % ou mais, 93 % ou mais, 94 % ou mais, 95 % ou mais, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 %.

 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as células cancerosas são
25 detectadas com uma especificidade de 95 % ou mais, tal como, por exemplo, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 % significando que 95 % ou mais, tal como, por exemplo, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 % dos linfonodos sentinela ou metinel que estão livres de células cancerosas serão corretamente

diagnosticados como negativos.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as células cancerosas são detectadas com um valor prognosticado negativo de 90 % ou mais, tal como, por exemplo, 91 % ou mais, 92 % ou mais, 93 % ou mais, 94 % ou mais, 95 % ou mais, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 %.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que as células cancerosas são detectadas dentro de 25 minutos ou menos.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a variabilidade inter- e infra-ensaio é menor do que 10 %, tal como, por exemplo, menor do que 9 %, menor do que 8 %, menor do que 7 %, menor do que 6 %, menor do que 5 %, menor do que 4 %, menor do que 3 %, menor do que 2 % ou menor do que 1 %.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o painel de agentes contém dois ou mais agentes, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais ou oito ou mais agentes.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os agentes são selecionados de anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos Fab, fragmentos (Fab')₂, fragmentos Fv, peptídeos, proteínas, moléculas de RNA, polissacarídeos ou qualquer combinação dos mesmos.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos.

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

precedentes, caracterizado pelo fato de que o painel de agentes compreende dois ou mais agentes, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais ou oito ou mais agentes que se ligam a marcadores específicos do tipo de câncer

5 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os agentes são rotulados.

 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que os rótulos são selecionados de enzimas, moléculas fluorescentes, rótulos radioativos, biotina, oligonucleotídeos e/ou
10 polissacarídeos.

 16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que os agentes são rotulados com moléculas fluorescentes.

 17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações
15 precedentes, caracterizado pelo fato de que o painel contém um ou mais agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos de tecido.

 18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares específicos de tecido são marcadores extracelulares epiteliais e/ou mesenquimais gerais.

20 19. Método de acordo com as reivindicações 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são dos que se ligam a marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer e/ou específicos do subtipo de câncer.

 20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de
25 17 a 19, caracterizado pelo fato de que os marcadores epiteliais gerais são selecionados de antígeno específico epitelial, fator de crescimento epidérmico, Ep-CAM e/ou E-caderina.

 21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 20, caracterizado pelo fato de que os marcadores mesenquimais gerais

são selecionados de CD44, c-Kit e/ou receptor de VEGF 2.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para tumores sólidos e outros tipos de tumor.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para as células cancerosas colônicas, células cancerosas da bexiga urinária, células de melanoma malignas, células cancerosas mamárias, células cancerosas pulmonares, células cancerosas ovarianas, células cancerosas pulmonares, células cancerosas esofágicas, células cancerosas renais, células cancerosas hepáticas, células cancerosas pancreáticas, células cancerosas retais, células cancerosas estomacais e células cancerosas da tireóide.

24. Método de acordo com as reivindicações 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que os marcadores característicos para as células cancerosas colônicas são selecionados de antígeno carcino embrionário (CEA), antígeno de carboidrato 15-3 (CA15-3), antígeno de carboidrato 125 (CA125), antígeno de carboidrato 19-9 (CA19-9), antígeno de carboidrato 242 (CA242), Ep-CAM, G250, RCAS1, STN, TA-90.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para o câncer de cólon.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para o antígeno carcino embrionário (CEA), CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, Ep-CAM, G250, RCAS1, STN e TA-90.

27. Método de acordo com as reivindicações 22 ou 23,

caracterizado pelo fato de que os marcadores característicos para as células cancerosas da bexiga urinária são selecionados de BC-10, CA19-9, antígeno carcino embrionário (CEA) e NY-ESO-1.

5 28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para as células cancerosas da bexiga urinária.

10 29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para BC-10, CA19-9, antígeno carcino embrionário (CEA) e NYESO-1.

15 30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer que são selecionados de marcadores para as células de melanoma malignas são selecionados de MSH-R, NY-ESO-1 e TA-90.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para as células de melanoma malignas.

20 32. Método de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para MSH-R, NY-ESO-1 e TA-90.

25 33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer que são selecionados de marcadores para células cancerosas mamárias são selecionados de CA15-3, CA125, antígeno carcino embrionário (CEA), Ep-CAM, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN e TA-90.

34. Método de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou

fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para as células cancerosas mamárias.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para CA15-3, CA125, antígeno carcino embrionário (CEA), Ep-
5 CAM, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN e TA-90.

36. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer que são selecionados de marcadores para células cancerosas
10 pulmonares são selecionados de Ep-CAM, NY-ESO-1, PRL-R, PSMA, RCAS1 e B2M.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores
15 característicos para as células cancerosas pulmonares.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para Ep-CAM, NY-ESO-1, PRL-R, PSMA, RCAS1 e B2M.

39. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer que são selecionados de marcadores para as células cancerosas
20 ovarianas são selecionados de CA15-3, CA125, G250, RCAS1, STN e B2M.

40. Método de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores
25 característicos para as células cancerosas ovarianas.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para CA15-3, CA125, G250, RCAS1, STN e B2M.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 21, caracterizado pelo fato de que os marcadores específicos do tipo de câncer que são selecionados de marcadores para as células cancerosas pulmonares são selecionados de CA15-3, CA125, antígeno carcino embrionário (CEA), Ep-CAM, RCAS1 e TA-90.

43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são anticorpos monoclonais ou fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para as células cancerosas pulmonares.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que um ou mais agentes são selecionados de anticorpos monoclonais para CA15-3, CA125, antígeno carcino embrionário (CEA), Ep-CAM, RCAS1 e TA-90.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 44, caracterizado pelo fato de que um ou mais marcadores específicos do subtipo de câncer são selecionados de MDR1 e MDR2.

46. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 45, caracterizado pelo fato de que o painel de agentes compreende dois ou mais agentes, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais ou oito ou mais agentes que se ligam a marcadores específicos do tipo de câncer.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17 a 46 para a detecção de células cancerosas nos linfonodos sentinela ou *metinel*.

48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes para identificar a origem de uma metástase cancerosa.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase no fígado, pulmões, esqueleto, cérebro, ovários, glândulas adrenais, cavidade abdominal ou em um

linfonodo.

50. Método de acordo com as reivindicações 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer ou específicos do subtipo de
5 câncer compreendem um ou mais agentes.

51. Método de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares específicos de tecido são marcadores extracelulares epiteliais e/ou mesenquimais gerais.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de
10 48 a 51, caracterizado pelo fato de que os marcadores epiteliais gerais são selecionados de antígeno específico epitelial, fator de crescimento epidérmico, Ep-CAM e/ou E-caderina.

53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de
15 48 a 51, caracterizado pelo fato de que os marcadores mesenquimais gerais são selecionados de CD44, c-Kit e/ou receptor de VEGF 2.

54. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de
48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase cerebral.

55. Método de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares
20 específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para câncer pulmonar, câncer mamário, câncer renal, câncer colônico, câncer retal, melanoma maligno ou combinações destes.

56. Método de acordo com as reivindicações 54 ou 55, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados
25 de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

57. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de
48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase pulmonar.

58. Método de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer renal, câncer pulmonar, câncer mamário, câncer colônico, câncer retal, melanoma maligno, câncer ovariano, câncer prostático ou qualquer combinação dos mesmos.

59. Método de acordo com as reivindicações 57 ou 58, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

60. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase hepática.

61. Método de acordo com a reivindicação 60, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionada de marcadores para o câncer colônico, câncer mamário, melanoma maligno, câncer pancreático, câncer retal, câncer pulmonar, câncer renal, câncer ovariano, câncer prostático ou qualquer combinação dos mesmos.

62. Método de acordo com as reivindicações 60 ou 61, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

63. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase óssea.

64. Método de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer mamário, câncer pulmonar, câncer prostático, câncer renal, câncer colônico, câncer retal, melanoma maligno, câncer ovariano ou qualquer combinação

dos mesmos.

65. Método de acordo com as reivindicações 63 ou 64, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, PSMA, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase da cavidade abdominal.

67. Método de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer colônico, câncer retal, câncer ovariano, câncer estomacal, câncer pancreático, melanoma maligno, câncer estomacal, câncer esofágico, câncer renal, câncer hepático, câncer prostático, câncer estomacal ou qualquer combinação dos mesmos.

68. Método de acordo com as reivindicações 66 ou 67, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

69. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase mamária.

70. Método de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para melanoma maligno, câncer pulmonar, câncer ovariano, câncer prostático, câncer renal, câncer estomacal ou qualquer combinação dos mesmos.

71. Método de acordo com as reivindicações 69 ou 70, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R,

PSMA, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase adrenal.

5 73. Método de acordo com a reivindicação 72, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer pulmonar, câncer renal, câncer colônico, câncer retal, câncer mamário, melanoma maligno, câncer da tireóide ou qualquer combinação dos mesmos.

10 74. Método de acordo com as reivindicações 72 ou 73, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

75. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase ovariana.

15 76. Método de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer mamário, melanoma maligno, câncer estomacal, câncer colônico, câncer retal ou qualquer combinação dos mesmos.

20 77. Método de acordo com as reivindicações 75 ou 76, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN e TA-90.

25 78. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase da pleura.

79. Método de acordo com a reivindicação 78, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer pulmonar, câncer mamário, câncer ovariano, câncer renal, melanoma maligno

ou qualquer combinação dos mesmos.

80. Método de acordo com as reivindicações 78 ou 79, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de CA15-3, CA125, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

81. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 48 a 53, caracterizado pelo fato de que a metástase é uma metástase em um linfonodo.

82. Método de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que os agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer são selecionados de marcadores para o câncer colônico, câncer pulmonar, câncer mamário, câncer renal, câncer prostático, câncer pancreático, câncer retal, câncer ovariano, câncer estomacal, câncer esofágico, câncer hepático, melanoma maligno, câncer da tireóide ou qualquer combinação dos mesmos.

83. Método de acordo com as reivindicações 81 ou 82, caracterizado pelo fato de que os marcadores extracelulares são selecionados de BC-10, CA15-3, CA125, CA19-9, CA242, CEA, Ep-CAM, G250, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, PSMA, RCAS1, STN, TA-90 e B2M.

84. Kit para uso em um método como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende agentes para a identificação de marcadores extracelulares.

85. Kit de acordo com a reivindicação 84, caracterizado pelo fato de que compreende ainda fluidos, anticorpos e rótulos, em que os rótulos preferivelmente já estão conjugados com agentes/anticorpos.

86. Kit de acordo com as reivindicações 84 e 85, caracterizado pelo fato de que compreende ainda instruções para o uso.

87. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações de 84 a 86, caracterizado pelo fato de que as instruções estão na forma de software

de computador.

88. Kit de acordo com qualquer uma das reivindicações de 85 a 87, caracterizado pelo fato de que o software é para a avaliação ou monitoramento de resultados.

5 89. Kit de acordo com as reivindicações de 84 a 88, caracterizado pelo fato de que compreende um painel de agentes que se ligam a marcadores extracelulares, em que pelo menos um dos agentes é específico de câncer, para a detecção em um citômetro de fluxo.

10 90. Base de dados, caracterizada pelo fato de que contém uma pluralidade de conjuntos de dados, em que cada conjunto de dados compreende dados para uma pluralidade de marcadores de superfície extracelular e tipo ou tipos correspondentes de células cancerosas.

15 91. Método para identificar células cancerosas como definidas em qualquer uma das reivindicações de 1 a 83, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de armazenar o conjunto de dados obtido a partir do método de citometria de fluxo.

20 92. Método de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o conjunto de dados compreende dois ou mais de: i) número de células que carregam o agente que se liga a um ou mais marcadores extracelulares, ii) tipo de células cancerosas, iii) tipo de tecido e outros.

93. Uso de uma base de dados de acordo com a reivindicação 90, caracterizado pelo fato de ser para identificar células cancerosas pela citometria de fluxo usando um painel de dois ou mais agentes que se ligam a dois ou mais marcadores de superfície extracelular diferentes.

“MÉTODO DE UMA ETAPA PARA DETECÇÃO DIRETA OU
SIMULTÂNEA DE UMA CÉLULA CANCEROSA OU ELEMENTO DE
CÉLULA CANCEROSA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, KIT PARA USO
EM UM MÉTODO, BASE DE DADOS, MÉTODO PARA IDENTIFICAR
5 CÉLULAS CANCEROSAS, E, USO DE UMA BASE DE DADOS”

Campo da invenção

A presente invenção diz respeito a um método para a detecção
de célula cancerosa ou elemento de células cancerosas em uma amostra
biológica, em que o método compreende a adição de um painel de agentes que
10 se ligam a dois ou mais marcadores extracelulares e em que pelo menos um
agente é específico de câncer. A detecção é realizada por um método
espectrométrico

Fundamentos da invenção

Estudos de fatores de prognóstico de cânceres identificam a
15 situação histológica dos linfonodos regionais como um dos prognosticadores
mais importantes de sobrevivência do paciente. O conceito de nodo sentinela,
primeiro introduzido por Raymond Cabanas (Cabanas *et al.*, 1977), propõe
que a drenagem linfática de um tumor primário passa através de um linfonodo
regional particular - o nodo sentinela - e depois continua. O conceito de nodo
20 sentinela acarreta necessariamente a possibilidade de caminhos de drenagem
múltiplos de partes diferentes do tumor primário, assim um paciente pode ter
mais do que um nodo sentinela. O nodo sentinela é único para cada indivíduo.
A situação de tumor deste nodo reflete a situação do campo linfático regional
e tem um impacto forte sobre o prognóstico, como relatado em grandes
25 estudos de seguimento de melanoma maligno e câncer mamário.

Foi relatado que a taxa de sobrevivência de 5 anos é tão alta
quanto 89 % para pacientes com melanoma diagnosticados com um nodo
sentinela negativo em metástase de célula de tumor. Para pacientes
diagnosticados com nodo sentinela com metástase, a sobrevivência de 5 anos

é reduzida para 70 % (Morton *et al.*, 2003). Pode ser especulado que a diminuição de 11 % no grupo diagnosticado com nodos sentinelas isentos de metástases foram de fato casos diagnosticados falso-negativos.

5 Devido à evidência forte da situação do nodo sentinela como um fator de prognóstico, a biópsia de nodo sentinela e eventual avaliação da presença ou ausência de células de tumor metastáticas tem se tornado procedimento de rotina para a realização de exames e testes em muitos países.

10 O diagnóstico do nodo sentinela também tem impacto sobre a estratégia de tratamento selecionada uma vez que o nodo sentinela é diagnosticado. Se a situação do nodo sentinela pode ser rapidamente determinada esta também pode fornecer informação valiosa para a tomada de decisões durante a cirurgia.

15 Presentemente, o procedimento de rotina de avaliação do linfonodo sentinela é o exame histopatológico pós operativa de seções embutidas em parafina fixadas em formalina de diversos níveis do nodo. Entretanto, as micrometástases localizadas entre as seções podem ser perdidas. Um outro desenvolvimento é a investigação intraoperativa do nodo sentinela. Neste método, seções congeladas finas (de cerca de 5 µm de espessura) do linfonodo são manchadas com hematoxilina e eosina. As seções congeladas são
20 depois examinadas sob o microscópio por um patologista. O resultado é relatado de volta para o local da operação e decisões podem ser feitas por exemplo para prolongar a operação com a dissecação do linfonodo se o nodo contém células de tumor. Pós-operativamente, os espécimes são algumas vezes também imuno-histoquimicamente manchados quanto a marcadores
25 específicos para o tipo de câncer examinado, o que facilita a detecção de micrometástases. Os exemplos de marcadores alvejados são HMB-45 para o melanoma maligno e citoqueratina-20 para os cânceres colônico e mamário.

Estes procedimentos de rotina de detecção de célula de tumor sofrem de várias deficiências. Eles são consumidores de tempo, reduzindo a

possibilidade de fornecer informação importante durante a cirurgia do tumor primário. Caso pior, também é a imprecisão visto que apenas uma pequena fração (fatias muito finas) do linfonodo é examinada e micrometástases fora destas fatias inevitavelmente não serão detectadas. A probabilidade de detectar uma metástase usando a triagem de rotina de seções congeladas manchadas com citoqueratina-20 também é dependente do tamanho da metástase. Em um estudo específico com nodos sentinelas de câncer mamário (Weaver *et al.*, 2006), a probabilidade de perder uma metástase $\leq 0,10$ mm foi descoberta ser de 61 %. Para as metástases $\leq 0,05$ mm e $\leq 0,02$ a probabilidade de perder a presença de células de tumor foi de 69 % e 75 %, respectivamente. O método também conta com a habilidade individual do patologista para detectar células de tumor. Um problema comum final com o método corrente é o encurtamento da habilidade pessoal na técnica em laboratórios hospitalares, que tem implicações na disponibilidade e custo destes procedimentos.

As metodologias alternativas de detecção também foram relatadas, incluindo a reação da cadeia da polimerase na transcriptase reversa (RT-PCR) e métodos de citométricos de fluxo. A metodologia da RT-PCR é mais sensível do que o método histopatológico, mas também é consumidor de tempo e o método foi descoberto produzir resultados falso-positivos (Merrie *et al.*, 1999; Noguchi *et al.*, 1999). Além disso, o mRNA é sensível à degradação, uma característica que torna o manuseio e transporte do espécime difícil em um cenário clínico de rotina.

Os métodos citométricos de fluxo foram relatados possuir sensibilidade mais alta do que as técnicas convencionais (Leers *et al.*, 2002). Até agora, os métodos que envolvem a citometria de fluxo como uma ferramenta de detectar células de tumor em linfonodos têm contado com o manchamento com anticorpos monoclonais contra marcadores intracelulares tais como citoqueratina-20, uma proteína produzida por várias células

cancerosas (por exemplo câncer mamário e colônico) e DNA.

Confiar na citoqueratina-20 implica em um risco de um diagnóstico falso-positivo, visto que esta proteína não é exclusivamente expressada pelas células de tumor. Experimentos têm mostrado que esta
5 proteína também é expressada em células presentes no sangue periférico de pacientes saudáveis. Consequentemente, uma necessidade surge para determinar uma taxa de “corte” entre um diagnóstico positivo e um negativo, que inevitavelmente carrega com a mesma um risco de resultados falsos.

O uso de marcadores intracelulares como a citoqueratina-20 ou
10 HMB-45 também requer uma etapa extra no procedimento de manchamento do anticorpo. As células devem ser permeabilizadas por exemplo com saponina antes que os anticorpos monoclonais possam atingir os seus alvos adicionando pelo menos 30 minutos ao procedimento.

Além disso, o padrão de expressão varia dramaticamente entre
15 as células de tumor e usar apenas um único marcador implica em um risco de produzir resultados falso-negativos.

Descrição da invenção

A presente invenção diz respeito a um método para a detecção de célula cancerosa ou elemento de células cancerosas em um exemplo
20 biológico, em que o método compreende a adição de um painel de agentes que se ligam a dois ou mais marcadores extracelulares e em que pelo menos um agente é específico de câncer. A detecção é realizada por um método espectrométrico. A presente invenção abrange assim um processo de uma etapa pelo uso de um painel de agentes que é adicionado à dita amostra
25 biológica e permitindo deste modo a detecção simultânea direta de diversos marcadores específicos de câncer, omitindo assim a etapa de dissecação do nodo sentinela, manchamento da amostra de dissecação e a inspeção subsequente por um patologista experimentado. Como uma consequência a presente invenção permite um método analítico consideravelmente mais

rápido, robusto, padronizado com base nas características físicas não subjetivas com especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade mais altas.

A presente invenção tem várias aplicações. Em uma primeiro aplicação de diagnóstico, o método pode ser usado para a detecção de célula
5 de tumor em nodos sentinelas, nodos metinél ou outros linfonodos. Como descritos acima, a detecção de célula de tumor em nodos sentinelas é um procedimento comum para a realização de exames e testes de câncer. Aplicar um painel de agentes que se ligam a marcadores extracelulares que identificam um certo tipo de tumor permite a detecção de célula de tumor com
10 uma sensibilidade e especificidade muito alta. Um método similar pode ser aplicado para a detecção de células cancerosas também em outros tecidos.

Em um segundo diagnóstico de pedido, a presente invenção pode ser usada para determinar o tipo de tumor primário em pacientes com metástases de origem desconhecida. Pelo pedido de um painel ou painéis de
15 agentes que se ligam a marcadores extracelulares que são específicos para certos tipos de câncer e/ou tipos de tecido, o método pode fornecer indícios valiosos na pesquisa quanto ao sítio de tumor primário.

Já em um outro pedido da presente invenção, o método pode ser usado para o monitoramento de culturas de célula para a terapia de célula
20 contra o câncer (assim chamado imunoterapia adotiva). O uso de linfócitos de nodo sentinela em imunoterapia adotiva requer a necessidade quanto a detecção de células cancerosas em uma única suspensão de célula. Neste pedido, um painel de agentes que se ligam a marcadores extracelulares identificando o tipo de câncer que está sendo tratado pode ser usado de modo
25 a verificar quais as células cancerosas estão ausentes da cultura de célula antes de administrar as células de volta para o paciente. Este pedido também pode ser usado para o monitoramento de pacientes durante o tratamento e pode ser usada como uma ferramenta para avaliar a eficácia de um regime de tratamento assim como uma ferramenta decisiva para a seleção de terapia

apropriada.

O uso da presente invenção para o pedido na detecção de célula de tumor pode ser obtido preparando-se uma suspensão de célula única de diferentes tipos de tecido. Em uma etapa seguinte, a suspensão de célula
5 única ou uma amostra desta é incubada com um painel de anticorpos monoclonais conjugados com fluoróforo que se liga a marcadores que identificam o tipo de câncer que deve ser detectado. Depois do tempo de incubação e lavagem, a amostra é analisada usando citometria de fluxo e os resultados das análises são facilmente disponíveis.

10 Como mencionado, a suspensão de célula única pode ser preparada a partir de várias fontes, tais como, por exemplo, o sistema linfático, nodos sentinelas, nodos metinels, outros linfonodos, tecido de tumor, outros tecidos, sangue e/ou plasma.

No segundo pedido em diagnóstico, a identificação de tumor
15 primário, uma suspensão de célula única é preparada a partir de um linfonodo drenando a metástase de origem desconhecida ou a partir de uma biópsia da metástase. Dependendo de onde no corpo a metástase foi encontrada, diversos painéis de anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforo pode ser usado para identificar tipos de tumor primário específicos que são frequentemente
20 com metástases para o órgão ou tecido onde a metástase foi encontrada. A suspensão de célula única pode necessitar ser dividida em diversas amostras, todas incubadas com painéis diferentes de anticorpos, de modo a triar quanto ao tipo de tumor que teve metástase. As análises usando citometria de fluxo são possíveis também neste pedido da presente invenção.

25 A verificação da ausência de células de tumor em culturas de célula para a terapia de célula contra o câncer pode ser obtida usando um método similar como a detecção de células de tumor em linfonodos. Neste pedido da presente invenção, a suspensão de célula única é preparada a partir de uma amostra da cultura de célula. Usando o mesmo tipo de painel de

anticorpos monoclonais como para o pedido da detecção de célula de tumor, a suspensão de célula única é incubada, lavada e finalmente analisada usando a citometria de fluxo.

Definições

5 O termo “agentes” como aqui usado refere-se a todos os agentes capazes de se ligar ou interagir com um marcador extracelular, abrangendo tanto os agentes já conhecidos, tais como, por exemplo anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis quanto os agentes a serem gerados. Os exemplos de agentes adequados são anticorpos monoclonais, anticorpos
10 policlonais, fragmentos Fab, fragmentos (Fab')₂, fragmentos Fv, peptídeos, proteínas, moléculas de RNA, polissacarídeos ou qualquer combinação dos mesmos.

Pelo termo “painel de agentes” é intencionado significar um painel contendo dois ou mais agentes, tais como, por exemplo, três ou mais,
15 quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais agentes, nove ou mais ou dez ou mais agentes. O número de agentes escolhidos pode depender do número de marcadores a serem triados e/ou a capacidade do equipamento usado no método para quantificar o número de células individuais, isto é, quantos agentes o equipamento é capaz de detectar
20 simultaneamente. O número de agentes específicos de câncer no painel depende do uso específico, entretanto, um ou mais agentes específicos de câncer estão presentes, tais como, por exemplo, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais, cinco ou mais, seis ou mais, sete ou mais, oito ou mais agentes, nove ou mais ou dez ou mais agentes. Preferivelmente muito mais
25 agentes específicos são utilizados tais como por exemplo pelo menos 20, pelo menos 30, pelo menos 40, pelo menos 50, pelo menos 75 ou pelo menos 100 dependendo da disponibilidade dos agentes específicos de câncer. Os agentes específicos de câncer em um painel podem ser todos específicos para um tipo de câncer ou podem ter especificidades quanto a tipos de cânceres diferentes.

O termo “anticorpos” como aqui usado refere-se a todos os tipos de imunoglobulinas, incluindo IgG, IgM, IgA, IgD, IgE e IgY. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser de qualquer espécie de origem, incluindo (por exemplo) camundongo, rato, coelho, cavalo, galinha ou ser humano ou podem ser anticorpos quiméricos. Os anticorpos policlonais usados para realizar a presente invenção podem ser produzidos pela imunização de um animal adequado (por exemplo, coelho, cabra, etc.) com um antígeno, coletando o soro imune do animal e separando os anticorpos policlonais do soro imune, de acordo com procedimentos conhecidos.

Os anticorpos monoclonais usados para realizar a presente invenção podem ser produzidos em uma linhagem de célula de hibridoma de acordo com as técnicas conhecidas.

“Fragmentos de anticorpo” incluídos dentro do escopo da presente invenção incluem, por exemplo, fragmentos Fab, F(ab')₂ e Fv e os fragmentos correspondentes obtidos dos anticorpos outros que não IgG. Tais fragmentos podem ser produzidos pelas técnicas conhecidas.

O termo “marcador extracelular” como aqui usado refere-se a marcadores expressados na superfície de células.

O termo “marcador extracelular específico de tecido” como aqui usado refere-se a um marcador que é expressado na superfície de uma célula pertencente a um certo tipo de tecido, por exemplo tecido de origem epitelial ou mesenquimal.

O termo “marcador extracelular específico de câncer” refere-se a um marcador expressado na superfície de células cancerosas, enquanto o termo “marcador extracelular específico do tipo de câncer” refere-se a um marcador expressado na superfície de um certo tipo de célula cancerosa, isto é, na superfície de uma célula cancerosa colônica, uma célula cancerosa mamária, etc. O termo “marcador extracelular específico do subtipo de câncer” refere-se a um

marcador expressado na superfície de células cancerosas, onde o marcador é indicativo de uma característica específica das células cancerosas, tal como, por exemplo agressividade, propriedades metastáticas, invasibilidade, capacidade de imunossupressão, sensibilidade à quimioterapia e presença de antígenos de tumor relevantes para a imunoterapia.

Pelo termo “linfonodo sentinela” é intencionado a significar o(s) primeiro(s) linfonodo(s) a receber(em) a drenagem linfática de um tumor. O termo “linfonodo metinel” refere-se ao(s) primeiro(s) linfonodo(s) a receber(em) a drenagem linfática de uma metástase.

Pelo termo “positivos verdadeiros” é intencionado significar uma amostra de teste corretamente testada positiva.

Pelo termo “falsos positivos” é intencionado significar uma amostra de teste falsamente testada positiva.

Pelo termo “negativos verdadeiros” é intencionado significar uma amostra de teste corretamente testada negativa.

Pelo termo “falsos negativos” é intencionado a significar uma amostra de teste falsamente testada negativa.

Pelo termo “sensibilidade” é intencionado significar uma medida que é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Positivos verdadeiros}}{\text{Positivos verdadeiros} + \text{Falsos negativos}}$$

Pelo termo “especificidade” é intencionado significar uma medida que é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Negativos verdadeiros}}{\text{Negativos verdadeiros} + \text{Falsos positivos}}$$

Pelo termo “valor prognosticado negativo (NPV)” é intencionado significar uma medida que é calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{NPV} = \frac{\text{Negativos verdadeiros}}{\text{Negativos verdadeiros} + \text{Falsos negativos}}$$

Pelo termo “reprodutibilidade” é intencionada significar a

capacidade de um teste para ser independentemente reproduzidos com o mesmo resultado do teste, tal como, por exemplo, uma variabilidade inter- e intra-ensaio menor do que 10 %.

5 Pelo termo “rotulação de agentes” é intencionado significar a conjugação de um agente a uma molécula detectável por um instrumento, tal como, por exemplo, enzimas, moléculas fluorescentes, moléculas radioativas, biotina, oligonucleotídeos e/ou polissacarídeos.

10 Pelo termo “valor de corte” é intencionada significar um valor que é considerado ser um valor que dá uma distinção apropriada entre casos de pacientes positivos e negativos (situação de saúde).

O painel de agentes pode ser usado para detectar células cancerosas presentes em um corpo humano ou animal, tal como, por exemplo no sangue ou em tecidos. Entretanto, em uma forma de realização específica, o pedido diz respeito ao uso de um painel de agentes que se ligam a 15 marcadores extracelulares, em que pelo menos um dos agentes é específico de câncer, para detectar células cancerosas disseminadas em tecidos.

Embora o painel de agentes possa ser usado para detectar células cancerosas em qualquer lugar no corpo humano ou animal, o uso do painel de agentes no que segue será exemplificado e descrito em mais 20 detalhes para detectar células cancerosas no sistema linfático, sem limitar a invenção de nenhum modo ao especificamente descrito.

Como mencionado acima, a avaliação da presença ou ausência de células de tumor nos linfonodos sentinela ou metinel é muito importante para a realização de exames e testes do câncer e também tem impacto sobre a 25 estratégia de tratamento selecionada. Se a situação do(s) nodo(s) sentinela ou metinel pode ser rapidamente determinada isto pode fornecer também informação valiosa para a tomada de decisão durante a cirurgia. Consequentemente, a invenção diz respeito a um método para detectar uma célula cancerosa ou elemento de célula cancerosa em uma amostra biológica,

o método compreendendo adicionar à dita amostra biológica um painel de agentes, que se ligam a dois ou mais marcadores extracelulares diferentes, em que pelo menos um dos agentes é específico de câncer. A detecção de células ou elementos de célula cancerosos pode ser executada por um método espectrométrico. O método espectrométrico pode ser, mas não é limitado a, ser capaz de detectar dispersão avançada, dispersão lateral e fluorescência f da amostra. O método espectrométrico pode ser, mas não é limitado ao citômetro de fluxo.

Em uma forma de realização preferida da invenção o método espectroscópico é a citometria de fluxo.

Como mencionado acima, as técnicas conhecidas disponíveis para detectar células cancerosas em linfonodos sentinela ou metinel têm muitas desvantagens.

Vantagem: Sensibilidade mais alta

Nos métodos histopatológicos e imunoistoquímicos usados presentemente para o exame de linfonodos, os linfonodos são cortados em seções congeladas finas e manchados. Entretanto, visto que apenas uma fração pequena do linfonodo é examinada, micro-metástase fora das seções escolhidas inevitavelmente não serão detectadas. Também, mesmo se as células de tumor estiverem presentes dentro da triagem manual das seções pelos métodos histopatológicos e imunoistoquímicos frequentemente perde metástases pequenas ($\leq 0,10$ mm) e células cancerosas individuais (Weaver *et al.*).

Na presente invenção, uma suspensão de célula única de células do(s) nodo(s) sentinela ou metinel é preparada depois que o(s) linfonodo(s) sentinela ou metinel são removidos. As amostras da suspensão de célula única são incubadas com um painel de agentes que alvejam marcadores extracelulares e um alto número de células, tal como, por exemplo 100.000 células ou mais são depois analisadas por um método capaz

de quantificar o número e proporção de células individuais que expressam marcadores extracelulares específicos. Consequentemente, usando-se uma suspensão de células do um ou mais linfonodo(s) sentinela ou metinel uma população randomizada de células representativas para o um ou mais
5 linfonodo(s) inteiro é fornecida. Além disso, as análises de um número relativamente alto de células fornece evidência estatisticamente segura de ausência ou presença de células de tumor.

Consequentemente, uma das vantagens que a presente invenção fornece em relação às técnicas conhecidas é uma sensibilidade
10 muito alta. Isto é, pelo uso de um painel de agentes como aqui descrito, as células cancerosas podem ser detectadas com uma sensibilidade de 90 % ou mais, tal como, por exemplo, 91 % ou mais, 92 % ou mais, 93 % ou mais, 94 % ou mais, 95 % ou mais, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais, 99 %
15 ou mais ou 100 %, significando que 90 % ou mais, tal como, por exemplo, 91 % ou mais, 92 % ou mais, 93 % ou mais, 94 % ou mais, 95 % ou mais, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 % de nodos sentinela ou metinel contendo células cancerosas serão corretamente diagnosticados como positivos.

A vantagem da sensibilidade mais alta usando a presente
20 invenção é crescentemente significativa com tamanho diminuído de metástases. Visto que a presente invenção analisa um alto número de células individuais, a probabilidade de detectar uma metástase é apenas dependente do número total de células de tumor presentes no linfonodo. Para os métodos convencionais, a probabilidade de detecção foi mostrada ser dependente
25 também do tamanho da metástase. Como um exemplo, a sensibilidade de detecção pela imunoistoquímica anti-citoqueratina foi encontrada ser apenas 53 % para os nodos sentinelas do câncer mamário inicialmente classificado como negativa pela triagem histopatológica. O risco de perder uma metástase foi descoberto aumentar com a diminuição do tamanho. A probabilidade de

perder uma metástase $\leq 0,10$ mm foi descoberta ser 61 %. Para metástases $\leq 0,05$ mm e $\leq 0,02$ a probabilidade de perder a presença de células de tumor foi de 69 % e 75 %, respectivamente (Weaver *et al.*).

A sensibilidade global de histopatologia com manchamento com hematoxilina e eosina é de aproximadamente 50 %. Para a triagem com histopatologia seguida pela imunoistoquímica anti-citoqueratina a sensibilidade global é de aproximadamente 80 %. Isto é, o presente método fornece uma sensibilidade muito maior do que os métodos correntemente usados de identificar células de tumor em uma amostra de linfonodo.

Vantagem: Especificidade mais alta

Uma outra vantagem da presente invenção é que pela análise de diversos marcadores de uma vez, mais informação detalhada a cerca de cada amostra é obtida, reduzindo assim o risco de resultados falso-positivos levando-se em conta variações individuais na expressão de célula. O método também não conta com a detecção de citoqueratina-20 que como descrito mais no princípio não é um marcador específico de câncer, o que reduz mais ainda o risco de um diagnóstico falso-positivo.

Isto é, usando-se um painel de agentes como aqui descrito, as células cancerosas podem ser detectadas com uma especificidade de 95 % ou mais, tal como, por exemplo, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 % significando que 95 % ou mais, tal como, por exemplo, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 % dos linfonodos sentinela ou metinel que estão livres de células cancerosas serão corretamente diagnosticados como negativos.

Um outro caminho para expressar a sensibilidade e especificidade melhoradas da presente invenção é pelo valor prognosticado negativo, isto é, a probabilidade de um nodo sentinela ou metinel diagnosticado como livre de células cancerosas a serem corretamente diagnosticados. Este valor reflete a sensibilidade e especificidade altas

combinadas. Enquanto que outras técnicas conhecidas correntemente usadas presentemente estão priorizando especificidade em relação à sensibilidade, a presente invenção permite manter altos níveis de tanto da sensibilidade quanto especificidade.

5 Consequentemente, na presente invenção é possível combinar uma alta sensibilidade e especificidade, isto é, as células cancerosas podem ser detectadas com um valor prognosticado negativo muito alto.

 Consequentemente, a presente invenção diz respeito a um use, em que as células cancerosas podem ser detectadas com um valor
10 prognosticado negativo de 90 % ou mais, tal como, por exemplo, 91 % ou mais, 92 % ou mais, 93 % ou mais, 94 % ou mais, 95 % ou mais, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou 100 % significando que se uma amostra é identificada como sendo negativa para as células cancerosas pelo método aqui descrito, a probabilidade de que a amostra
15 verdadeiramente seja negativa é de 90 % ou mais, tal como, por exemplo, 91 % ou mais, 92 % ou mais, 93 % ou mais, 94 % ou mais, 95 % ou mais, 96 % ou mais, 97 % ou mais, 98 % ou mais ou 99 % ou mais ou ainda 100 %.

 Um valor prognosticado negativo alto é favorável em um método como aqui descrito visto que o risco do paciente ter removido
20 qualquer tecido saudável durante a cirurgia é enormemente diminuído.

Vantagem: Reprodutibilidade mais alta

 Uma outra vantagem da presente invenção é que é fácil realizar com uma alta reprodutibilidade. Assim, os ensaios de inter- e intra-variabilidade são menores do que 10 %, tal como, por exemplo, menores do
25 que 9 %, menores do que 8 %, menores do que 7 %, menores do que 6 %, menores do que 5 %, menores do que 4 %, menores do que 3 %, menores do que 2 % ou menores do que 1 %. Consequentemente, o procedimento pode ser padronizado e executado por uma ampla faixa de profissionais, tais como, por exemplo, cientistas biomédicos e cientistas de laboratório clínico. Em

comparação, os métodos histopatológicos correntemente usados requerem a presença de um patologista habilitado, que também leva a uma avaliação muito mais subjetiva das amostras visto que pode haver até 30 a 35 % de variabilidade entre as observações de dois patologistas diferentes.

5 Vantagem: Mais rápido

Uma outra vantagem da presente invenção é que as análises da presença ou ausência de células cancerosas em uma amostra humana ou animal podem ser realizada em tempo muito curto. Isto é especialmente relevante se o método é usado para diagnóstico intraoperativo de metástase e
10 micrometástase de linfonodo, permitindo que o diagnóstico seja fornecido, por exemplo, durante a cirurgia do tumor primário.

Consequentemente, na presente invenção as células cancerosas podem ser detectadas dentro de 25 minutos ou menos, tal como, por exemplo dentro de 20 minutos ou menos, dentro de 15 minutos ou menos, dentro de 10
15 minutos ou menos.

Por comparação, a técnica conhecida de manchamento por imunoistoquímica habitualmente requer várias horas para se completar.

O manchamento de células usando-se o marcador intracelular citoqueratina-20 sofre das desvantagens de que as células devam ser
20 permeabilizadas com saponina para permitir que os agentes entrem nas células, adicionando deste modo tempo ao procedimento. O tempo médio para realizar uma análise usando citoqueratina-20 é de cerca de 45 minutos. Consequentemente, usando-se agentes que se ligam a marcadores extracelulares o tempo das análises é significativamente reduzido.

25 As análises histopatológicas convencionais de seções de tecido congelado pode permitir um diagnóstico rápido dentro talvez de 20 minutos, mas a sensibilidade de tais método para detectar por exemplo micrometástase é muito mais baixa do que a sensibilidade do painel aqui descrito visto que apenas uma pequena fração do linfonodo é examinada e a avaliação das

amostras são subjetivas como descrito acima. Experimentos também foram realizados usando RT-PCR para o diagnóstico de metástase de linfonodo, levando a uma alta sensibilidade, entretanto a quantidade de tempo habitualmente requerido para conduzir tais ensaios os tornam completamente
5 inadequados para se tomar decisão intraoperativa. Em comparação com esse, o uso de um painel de acordo com a presente invenção fornece uma sensibilidade e especificidade muito altas combinadas com um tempo de análise curto.

Como mencionado acima, o painel de agentes para o uso na
10 presente invenção pode ter uma composição muito variável dependendo do uso específico. Nos seguintes exemplos de usos específicos e composições do painel serão dados de modo a melhor descrever a invenção. Entretanto, estes não devem ser interpretados como limitantes da invenção de nenhum modo.

Uso de painéis e seleção de agentes

15 A detecção de células cancerosas pelas suas propriedades fenotípicas podem seguir duas “estratégias” diferentes. A primeira estratégia é observar quanto aos marcadores que mudam o nível de expressão quando a célula se torna cancerosa. Com o suporte de dados mostrando que um certo tipo de câncer frequentemente expressa um certo marcador enquanto que a
20 célula normal que se origina do mesmo tecido não, uma pessoa é capaz de fazer a suposição de que a célula é cancerosa. Neste caso, o marcador pode ser chamado “específico de câncer” ou “tipo específico de câncer”.

A segunda estratégia é observar quanto às células ectópicas, isto é, observar quanto aos marcadores que normalmente não devem ser
25 expressados no tecido onde as células analisadas foram coletadas. Com suporte dos dados de que um certo marcador normalmente é expressado em um tipo de tecido e não expressado no tecido onde a célula foi coletada, mais uma vez uma pessoa é capaz de fazer suposições de que a célula é cancerosa. Neste caso, vocês estão olhando para os “marcadores específicos de tecido”.

Entretanto, a detecção de células cancerosas de seu fenótipo não é uma tarefa direta. As células cancerosas que se originam de células normais, “saudáveis”, e naturalmente muitos dos marcadores de superfícies são compartilhados entre a célula normal e a célula cancerosa. Além disso, as

5 células cancerosas demonstram um fenótipo imaturo que expressa proteínas desenvolvendo, proteínas que nos estágios de diferenciação iniciais são compartilhados entre muitas células tronco comprometidas com a linhagem celular. A diferença frequentemente reside no nível de expressão de alguns dos marcadores.

10 Também, visto que o evento de uma célula normal que se torna uma célula cancerosa é causado pelas disfunções genéticas, o perfil de expressão de uma célula cancerosa é único para cada indivíduo e pode mesmo variar entre as células cancerosas da mesma origem.

Em conclusão, o mesmo marcador pode em alguns casos

15 fornecer evidência de que uma célula que expressa aquele marcador é uma célula cancerosa e em outros casos não. Para designar um certo marcador um “marcador de câncer” deve ser assim fabricado com informação adicional, tal como, qual tipo de câncer deve ser detectado, em qual frequência um certo marcador é expressado por um certo tipo de câncer e em qual tecido a célula

20 que expressa o marcador foi encontrada.

A detecção de células cancerosas assim deve idealmente levar em conta as variações individuais. Um certo marcador pode ser expressado por muitas células de um certo tipo de câncer, mas nem todas as células. As células cancerosas que se originam de um certo tecido podem perder a

25 expressão de um certo marcador normalmente expressado por aquele tecido.

Ao contrário contar com apenas um marcador para a detecção de células cancerosas, o uso de painéis de agentes que se ligam a diversos marcadores reduz o risco de resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos. O uso da presente invenção permite a detecção de diversos

marcadores específico de câncer, marcadores específicos do tipo de câncer e marcadores específicos de tecido simultaneamente. A insuficiência de uma célula cancerosa para expressar um certo marcador pode ser depois compensada pela detecção de um outro marcador.

5 No pedido da presente invenção para a detecção de células cancerosas em nodos sentinelas, nodos metinel ou outros linfonodos, também é possível usar o tumor primário como um controle positivo para verificar o teste. Isto reduz ainda o risco de um resultado de teste falso.

Tumor primário conhecido: seleção de agentes

10 Uma configuração em que o painel aqui descrito é muito úteis é para a detecção da disseminação de câncer, isto é, a presença de metástase incluindo micrometástase no sistema linfóide, tal como nos linfonodos sentinela e/ou metinel.

15 O painel para o uso em uma tal configuração deve preferivelmente conter um ou mais agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos de tecido gerais, tais como, por exemplo, marcadores extracelulares epiteliais e/ou mesenquimais. Quase todas as células cancerosas expressarão pelo menos um destes marcadores visto que são derivados de células epiteliais ou mesenquimais. Ao contrário, a maioria
20 das células presentes em um linfonodo saudável não expressa normalmente tais marcadores. Consequentemente, pela inclusão de pelo menos um agente que se liga a um marcador epitelial e/ou mesenquimal geral, é garantido que qualquer célula não normalmente presente no linfonodo seja detectada. Entretanto, visto que algumas células não cancerosas tendo marcadores
25 extracelulares específicos de tecido também podem estar presentes nos linfonodos (por exemplo células de sinal de nascença contendo marcadores extracelulares mesenquimais) é importante incluir pelo menos um agente específico de câncer no painel.

Consequentemente, o painel deve conter um ou mais agentes

que se liguem aos marcadores extracelulares específicos de câncer, específicos do tipo de câncer e/ou específicos do subtipo de câncer. Em princípio, qualquer um de tais agentes ou marcadores pode ser usado que já seja identificado ou no presente desconhecido. No que segue, exemplos são dados sem limitar a invenção a estes.

Os marcadores que podem ser usados incluem marcadores extracelulares específicos, marcadores epiteliais gerais, antígeno específico epitelial, fator de crescimento epidérmico, marcadores extracelulares mesenquimais, marcadores específicos do tipo de câncer e marcadores específicos do subtipo de câncer assim como marcadores para “tumores sólidos e outros tipos de tumores”, células cancerosas colônicas, células cancerosas da bexiga urinária, células de melanoma malignas, células cancerosas mamárias, células cancerosas pulmonares, células cancerosas ovarianas, células cancerosas pulmonares. Os exemplos específicos de marcadores são BC-10, antígeno de carboidrato 125 (CA125), antígeno de carboidrato 15-3 (CA15-3), antígeno de carboidrato 19-9 (CA19-9), antígeno de carboidrato 242 (CA242), antígeno carcino embrionário (CEA), Ep-CAM, G250, MDR1, MDR2, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, PSMA, RCAS1, STN, TA-90 e Beta 2-microglobulina (B2M).

Os agentes que podem ser usados incluem agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos de tecido, marcadores epiteliais gerais, marcadores extracelulares mesenquimais, marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer e/ou específicos do subtipo de câncer e agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer selecionados de marcadores para o câncer mamário, câncer colônico, câncer esofágico, câncer renal, câncer hepático, câncer pulmonar, melanoma maligno, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer prostático, câncer retal, câncer estomacal, câncer da tireóide ou qualquer combinação dos mesmos. Além disso, os agentes possíveis incluem anticorpos monoclonais ou

fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para o câncer colônico, células de melanoma malignas, células cancerosas mamárias, células cancerosas pulmonares, células cancerosas ovarianas, células cancerosas pulmonares. Os exemplos específicos de
5 agentes são anticorpos monoclonais para o antígeno carcino embrionário (CEA), antígeno de carboidrato 15-3 (CA15-3), antígeno de carboidrato 125 (CA125), antígeno de carboidrato 19-9 (CA19-9), antígeno de carboidrato 242 (CA242), Ep-CAM, G250, RCAS1, STN, TA-90, BC-10, NYESO-1, MSH-R, PRL-R e PSMA.

10 Como mencionado acima, os agentes que se ligam a marcadores característicos para um subtipo específico de células cancerosas (marcadores específicos do subtipo de câncer extracelulares) também podem ser incluídos no painel. Os exemplos de tais marcadores podem ser marcadores que indicam as seguintes características do tumor/células de
15 tumor, a saber por exemplo agressividade, propriedades metastáticas, invasibilidade, capacidade de imunossupressão, sensibilidade à quimioterapia e presença de antígenos de tumor relevantes para a imunoterapia. Analisando-se quanto a presença de tais marcadores, o tratamento do câncer pode ser feito por encomenda com base no subtipo de
20 tumor específico. É por exemplo conhecido que existe uma série de proteínas de membrana chamadas de proteínas de Resistência a Multi Medicamento (MDR) que podem ser expressadas em grande quantidade em células cancerosas e são capazes de bombear agentes anticarcinogênicos para fora da célula cancerosa, deixando as células cancerosas insensíveis ou menos
25 sensíveis às substâncias anticarcinogênicas. Pela inclusão de um ou mais marcadores que se ligam a MDR é possível determinar se as células cancerosas serão sensíveis ao tratamento com produtos quimioterapêuticos e se assim o forem, administrar produtos quimioterapêuticos como parte do mesmo regime de tratamento. Entretanto, se as células cancerosas mostram

ser insensíveis aos produtos quimioterapêuticos, outros regimes de tratamento podem ser montados imediatamente.

Tumor primário desconhecido: seleção de agentes

5 Um outro uso de um painel como aqui descrito é para identificar a origem de uma metástase cancerosa. Isto é, uma situação onde uma ou mais metástases são identificadas em um paciente, entretanto, a localização do tumor primário que teve metástase não é conhecida.

10 Teoricamente os tumor primários se originam das células presentes no órgão ou tecido em que o tumor se desenvolve. Uma metástase de um tumor primário é definida como um câncer que resulta da disseminação de um tumor primário. O processo de metástase depende das células cancerosas adquirirem duas capacidades separadas - motilidade e capacidade de invasão aumentadas. As células que sofrem metástase são basicamente do mesmo tipo como aquelas no tumor original. Se um câncer surge por exemplo
15 no cólon e sofre metástase por exemplo para o fígado, as células cancerosas no fígado são células cancerosas colônicas. Entretanto, as células adquiriram motilidade aumentada e a capacidade para invadir um outro órgão.

Usando-se um painel de acordo com a invenção contendo um ou mais agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do
20 tipo de câncer e/ou específicos do subtipo de câncer pode ser possível determinar a origem da metástase, isto é, determinar em qual tecido o tumor primário se desenvolveu.

O painel pode compreender ainda um ou mais agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos de tecido, tais como, por
25 exemplo, marcadores extracelulares epiteliais e/ou mesenquimais gerais.

A metástase pode ser encontrada em qualquer lugar no corpo humano ou animal, entretanto, os sítios mais comuns para encontrar uma metástase é nos linfonodos, fígado, pulmões, esqueleto, cérebro, ovários, glândulas adrenais e cavidade abdominal.

Consequentemente, o painel deve conter um ou mais agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos de câncer, específicos do tipo de câncer e/ou específicos do subtipo de câncer. Em princípio, qualquer um de tais agentes ou marcadores podem ser usados que já são identificados ou no presente desconhecidos. No que segue, exemplos são dados sem limitar a invenção a estes.

Os marcadores que podem ser usados incluem marcadores extracelulares específicos, marcadores epiteliais gerais, antígeno específico epitelial, fator de crescimento epidérmico, marcadores extracelulares mesenquimais e marcadores específicos do tipo de câncer assim como marcadores para as células cancerosas colônicas, células cancerosas da bexiga urinária, células de melanoma malignas, células cancerosas mamárias, células cancerosas pulmonares, células cancerosas ovarianas, células cancerosas pulmonares. Os exemplos específicos de marcadores são BC-10, antígeno de carboidrato 125 (CA125), antígeno de carboidrato 15-3 (CA15-3), antígeno de carboidrato 19-9 (CA19-9), antígeno de carboidrato 242 (CA242), antígeno carcino embrionário (CEA), Ep-CAM, G250, MDR1, MDR2, MSH-R, NY-ESO-1, PRL-R, PSMA, RCAS1, STN, TA-90 e Beta 2-microglobulina (B2M).

Os agentes que podem ser usados incluem agentes que se ligam a marcadores extracelulares específicos de tecido, marcadores epiteliais gerais, marcadores extracelulares mesenquimais, marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer e/ou específicos do subtipo de câncer assim como agentes que se ligam aos marcadores extracelulares específicos do tipo de câncer selecionados de marcadores para o câncer mamário, câncer colônico, câncer esofágico, câncer renal, câncer hepático, câncer pulmonar, melanoma maligno, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer prostático, câncer retal, câncer estomacal, câncer da tireóide ou qualquer combinação dos mesmos. Além disso, os agentes possíveis incluem anticorpos monoclonais ou

fragmentos dos mesmos que se ligam a um ou mais dos marcadores característicos para o câncer colônico, células de melanoma malignas, células cancerosas mamárias, células cancerosas pulmonares, células cancerosas ovarianas e células cancerosas pulmonares. Os exemplos específicos de

5 agentes são anticorpos monoclonais para o antígeno carcino embrionário (CEA), antígeno de carboidrato 15-3 (CA15-3), antígeno de carboidrato 125 (CA125), antígeno de carboidrato 19-9 (CA19-9), antígeno de carboidrato 242 (CA242), Ep-CAM, G250, RCAS1, STN, TA-90, BC-10, NY-ESO-1, MSH-R, PRL-R e PSMA.

10 Rotulação de agentes

Como uma etapa importante no uso do painel aqui descrito está a identificação do número de células que carregam marcadores específicos, pode ser vantajoso rotular os agentes com um ou mais rótulos detectáveis. Tais rótulos podem ser de enzimas, moléculas fluorescentes,

15 rótulos radioativos, biotina e/ou oligonucleotídeos.

Em uma forma de realização preferida da invenção, os agentes são rotulados com moléculas fluorescentes tais como, por exemplo corantes específicos nucleicos, ficobiliproteínas, derivados de cianina, derivados de fluoresceína e derivados de rodamina. Os agentes diferentes usados no painel

20 são preferivelmente rotulados com rótulos diferentes, de modo que eles possam ser distinguidos um do outro. Quando moléculas fluorescentes são usadas para rotulação, o método pode ser preferivelmente realizado por um instrumento de medição da fluorescência, tal como, por exemplo um citômetro de fluxo.

25 Procedimento típico

Os linfonodos sentinela de um paciente com indicação de câncer são obtidos por cirurgia. Em resumo, o nodo sentinela é identificado durante a cirurgia pelas injeções peritumorais de uma substância traçadora, por exemplo corante azul patente, que segue a drenagem linfática e colore os

primeiros linfonodos da drenagem de azul.

As suspensões de célula única dos linfonodos sentinelas inteiros a serem investigados são obtidos pela pressão suave dos linfonodos usando um homogeneizador de vidro encaixe frouxo em 5 ml de PBS suplementado com 2 % de soro de bezerro fetal e 0,05 % de Azida de Sódio (tampão de manchamento) ou em meio de cultura de célula tal como X-Vivo 15 ou Aim 5.

Amostras de 1×10^6 células são lavadas em 2 ml de tampão de manchamento.

As amostras de célula são depois rotuladas em 100 μ l de tampão de manchamento com um painel de anticorpos conjugados a fluoróforo selecionado de marcadores extracelulares específicos de tecido, específicos do tipo de câncer e específicos do subtipo de câncer e incubados na temperatura ambiente 15 a 30 minutos. A quantidade suficiente de anticorpo usado é determinada pela titulação de cada anticorpo usando um controle positivo. Tipicamente esta quantidade está na faixa de 0,1 a 0,5 μ g. Para remover o anticorpo abundante, as amostras são lavadas com 2 ml de tampão de manchamento e recolocadas em suspensão em 300 μ l de tampão de manchamento antes da análise citométrica de fluxo.

A análise é realizada usando instrumentos tais como FACS Aria, FACSCanto (Becton Dickinson) ou Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). A análise citométrica de fluxo é realizada coletando 100.000 eventos de cada amostra de célula.

Kits

De modo a facilitar o uso da presente invenção, kits especializados podem ser desenvolvidos para numerosas aplicações da presente invenção. Tais kits podem incluir todos os agentes, rótulos e fluidos necessários e instruções necessárias para realizar um certo teste. O kit também pode incluir software para facilitar a interpretação dos resultados de teste,

com por exemplo taxas de corte pré-definidas entre um resultado de teste positivo e negativo.

Em uma forma de realização preferida da presente invenção, um kit incluiria um painel de anticorpos monoclonais rotulados, onde o painel
5 seria adequado para um certo tipo de teste. Além disso o kit incluiria fluidos necessário para realizar o teste usando citometria de fluxo e software capaz de interpretar confiavelmente os dados gerados a partir das análises.

Determinação de valores de corte, prevalência e uso de base de dados

10 Uso de um software para a interpretação de dados gerados por cada teste é dependente dos métodos estatísticos e dados de fundo confiáveis para encontrar o valor de corte ótimo para cada teste, visto que a sensibilidade e a especificidade são variáveis conforme o valor de corte entre um resultado de teste positivo e negativo varia.

15 Os dados de fundo podem ser obtidos realizando-se testes em um grande número de amostras com situação conhecida ou prevalência conhecida na população relevante da anormalidade pesquisada. Os dados gerados por cada teste, por exemplo a proporção de eventos testados positivo para cada marcador, será coletada junto com a informação para a
20 categorização da população à qual o objeto de teste pertence, por exemplo sexo, idade, doença, estágio de doença, etc. Os dados gerados podem ser usados para encontrar valores de corte ótimos.

Os valores de corte são necessários visto que as amostras negativas verdadeiras mostrarão graus variáveis de “positividade” devido às
25 razões biológicas (graus variáveis de expressão de marcadores também em estado normal) e técnicas (ruído de fundo).

No caso onde os dados de fundo foram gerados usando amostras com situação conhecida (positiva ou negativa) as descobertas de valores de corte ótimos é relativamente simples e podem ser obtidos

analisando-se como a sensibilidade e a especificidade do teste estão correlacionadas com o valor de corte.

Um método de escolha de corte é plotar a sensibilidade versus (1 - especificidade) para cada valor de corte possível, isto é, diversos valores de corte diferentes são primeiro arbitrariamente ou metodicamente escolhidos. A curva obtida é conhecida como a curva de “Características de Operação Receptor”, curva ROC. A precisão do teste é medida pela área sob a curva ROC. Uma área de 1 representa um “teste perfeito” e uma área de 0,5 representa um “teste sem valor”.

Se a tolerância de um resultado falso negativo é igual àquele de um resultado falso positivo, o valor de corte que maximiza a área sob a curva ROC deve ser escolhida. Entretanto, em muitos casos o uso clínico de um teste deve ser levado em conta quando da decisão do valor de corte. Para um teste de triagem, por exemplo, é importante minimizar o número de resultados falso negativos e um número moderado de falsos positivos é aceitável e o valor de corte será consequentemente ajustado, isto é, os valores de corte podem ser escolhidos com respeito ao uso/propósito clínico.

As curvas ROC não podem ser usadas sozinhas para decidir os valores de corte, visto que o método não leva a prevalência da anormalidade pesquisada em conta. Para otimizar a capacidade do teste para prognosticar o estado de doença verdadeiro, os dados de fundo na prevalência da anormalidade a ser detectada são necessários. A sensibilidade e a especificidade de um teste podem variar com a prevalência da condição pesquisada na população à qual o objeto de teste pertence. Assim, pode ser necessário decidir valores de corte diferentes para populações diferentes.

No caso onde a situação verdadeira da amostra é desconhecida, um método diferente para encontrar os valores de corte ótimos deve ser usado. Intervalos de referência podem ser usados para este propósito se a prevalência da anormalidade em populações diferentes é conhecida.

O intervalo de referência é a faixa estimada de valores que inclui uma certa porcentagem dos valores entre uma população relevante. A porcentagem mais habitualmente usada é 95 %.

- Dois intervalos de referência teriam que ser calculados para a
- 5 decisão de valor de corte, um intervalo para as amostras assumidas negativas e um intervalo para as amostras assumidas positivas. A categorização de cada amostra seria feita com base na prevalência da anormalidade na população de onde a amostra foi coletada. O tamanho proporcional de cada grupo de amostra deve se conformar com a prevalência da anormalidade na população.
- 10 Com base nos resultados de teste para cada nodo, cada amostra seria categorizada em um grupo assumido negativo e um grupo assumido positivo. Intervalos de referência podem ser gerados para cada grupo e o valor de corte pode ser ajustado para minimizar a sobreposição de um intervalo de referência ao outro. O valor de corte também pode ser ajustado para
- 15 minimizar o risco por exemplo de um diagnóstico falso negativo.

- Intervalos de referência podem ser calculados dois métodos básicos. Se os dados gerados se conforma a uma função distribucional tal como, por exemplo, a distribuição Normal, os intervalos de referência podem ser calculados usando um método paramétrico significando que a distribuição
- 20 conforma-se com uma distribuição estatística matematicamente definida, por exemplo a distribuição Normal. Usar métodos paramétricos é no geral preferido visto que os intervalos de confiança de intervalos de referência são no geral mais estreitos a menos que o tamanho da amostra seja muito grande.

- 25 Se os dados gerados não se conformam com nenhuma distribuição estatística matematicamente definida, um método não paramétrico (isento de distribuição) teria que ser usado, em que as distribuições estimadas são calculadas usando apenas os dados reais gerados pelas análises, de modo a atingir um valor de corte aceitável. De modo a

reduzir o intervalo de confiança um tamanho de amostra muito grande seria necessário.

5 A prevalência da anormalidade a ser detectada pode variar por exemplo com a idade, sexo e doença/indicação. Consequentemente, acesso a quantidades grandes de dados de fundo para determinar intervalos de referência para cada população relevante pode realçar ainda mais o desempenho de diagnóstico quando do uso da presente invenção para a detecção de células de tumor.

10 Comparar os dados gerados por uma análise com os dados mais no princípio sobre as amostras positivas verdadeiras e negativas verdadeiras pode otimizar a taxa de corte entre um resultado positivo e negativo, permitindo desempenho ainda mais alto com respeito à sensibilidade, especificidade e NPV.

15 Em uma forma de realização preferida da presente invenção, a interpretação de cada teste é realizada pelo uso de um software ligado a uma base de dados com dados de fundo para cada marcador testado em relação às populações relevantes. O software também pode ser capaz de gerar dados para o uso na mesma base de dados, que permitiria a sintonia fina contínua de valores de corte para cada população de teste e relevante.

20 Consequentemente, em aspectos separados a invenção diz respeito a uma base de dados que armazena os resultados obtidos pelo método da citometria de fluxo aqui reivindicado e software para calcular e refinar continuamente os valores de corte quando o material de dados aumenta. A base de dados contém uma pluralidade de conjunto de dados, em que cada
25 conjunto de dados compreende dados para uma pluralidade de marcadores de superfície extracelular e tipo ou tipos correspondentes de células cancerosas. Além disso, a invenção diz respeito a um método para identificar células cancerosas como aqui reivindicado compreendendo ainda uma etapa de armazenar o conjunto de dados obtido do método de citometria de fluxo (por

exemplo i) número de células que carregam um agente que se liga a um ou mais marcadores extracelulares, ii) tipo de células cancerosas, iii) tipo de tecido e outros). A etapa de armazenar os dados pode compreender ainda uma etapa de introduzir dados de origem conhecida com o conjunto de dados correspondente.

Além disso, em um outro aspecto a presente invenção diz respeito a um programa de software que quando rodado em um computador é i) adaptado para receber o conjunto de dados da citometria de fluxo compreendendo dados quanto aos marcadores extracelulares, ii) adaptado para comparar os dados recebidos com os dados em uma base de dados e iii) adaptado para fornecer uma saída indicando a) a presença ou ausência de células cancerosas e opcionalmente b) o tipo ou tipos de células cancerosas.

O exemplo de como os marcadores extracelulares seriam avaliados com propósito de comparação em uma base de dados é dado no exemplo 4.

Legendas das Figuras

A Figura 1 ilustra a identificação pela citometria de fluxo de células cancerosas colônicas em uma mistura de células cancerosas colônicas e leucócitos usando um único agente para a identificação. Vários números de células cancerosas colônicas CCL221 (de 0 a 3 %) foram introduzidos em leucócitos sanguíneos periféricos purificados pelo Ficoll e manchados usando anti CA19-9 conjugado direto como anticorpo de detecção de superfície celular. A presença de células de tumor foi detectada pela citometria de fluxo. SSC, dispersão lateral, indica granulosidade de células.

A Figura 2 ilustra a identificação pela citometria de fluxo de células cancerosas colônicas em uma mistura de células cancerosas colônicas e leucócitos usando um único agente para identificação. Vários números de células cancerosas colônicas CCL221 (de 0 a 3 %) foram introduzidas em leucócitos sanguíneos periféricos purificados pela Ficoll e manchadas usando

anticorpo tipo EpCAM conjugado direto para a detecção de superfície celular. A presença de células de tumor foi detectada pela citometria de fluxo. SSC, dispersão lateral, indica a granulosidade das células.

A Figura 3 ilustra a identificação pela citometria de fluxo de células cancerosas colônicas em uma mistura de células cancerosas colônicas e leucócitos usando um painel de quatro agentes para a identificação. As células cancerosas colônicas CCL221 10 % (A) ou 1 % (B) foram introduzidas em leucócitos sanguíneos periféricos purificados por Ficoll e manchados usando anticorpos conjugados diretos para a detecção de quatro cores simultânea de marcadores de superfície celular CA19-9, epítipo CEA 5 e epítipo CEA 4 e STN. A presença de células de tumor foi detectada pela citometria de fluxo. As células positivas duplas reconhecidas por CA19-9 e epítipo CEA 5 (painel esquerdo) foram eletronicamente ativadas e avaliadas pelo segundo par de anticorpos STN e epítipo CEA 4 (painel direito).

A Figura 4 ilustra a identificação pela citometria de fluxo de células cancerosas colônicas em uma mistura de células cancerosas colônicas e leucócitos usando um painel de quatro agentes para a identificação de células cancerosas colônicas CCL221 10 % (A) ou 1 % (B) foram introduzidos em leucócitos sanguíneos periféricos purificados por Ficoll e manchados usando anticorpos conjugados diretos para a detecção de quatro cores simultânea de marcadores de superfície celular CA19-9, CA242 e epítipo CEA 4 e STN. A presença de células de tumor foi detectada pela citometria de fluxo. As células positivas duplas reconhecidas pelo CA19-9 e CA242 (painel esquerdo) foram eletronicamente ativadas e avaliadas pelo segundo par de anticorpos STN e epítipo CEA 4 (painel direito).

A Figura 5 ilustra a identificação pela citometria de fluxo de células cancerosas colônicas em uma mistura de células cancerosas colônicas e leucócitos usando um painel de quatro agentes para a identificação. As

células cancerosas colônicas CCL221 10 % (A) ou 1 % (B) foram introduzidas em leucócitos sanguíneos periféricos purificados por Ficoll e manchadas usando anticorpos conjugados diretos para a detecção de quatro cores simultânea de marcadores de superfície celular CA19-9, CA15-3, tipo
5 EpCAM e STN. A presença de células de tumor foi detectada pela citometria de fluxo. as células positivas duplas reconhecidas por CA19-9 e CA15-3 (painel esquerdo) foram eletronicamente ativadas e avaliadas pelo segundo par de anticorpos STN e tipo EpCAM (painel direito).

A Figura 6 ilustra a identificação pela citometria de fluxo de
10 células cancerosas colônicas em uma suspensão de célula única de um linfonodo sentinela de um paciente com câncer colônico. A análise foi realizada usando um painel de anticorpos que reconhecem quatro marcadores colônicos diferentes CA19-9, CEA, STN e proteína tipo EpCAM.

A Figura 7 ilustra o risco diminuído de um resultado falso-
15 negativo quando da análise de uma suspensão de célula única obtida de um linfonodo ao invés de analisar seções finas de um linfonodo pela histoquímica. A ilustra uma situação onde uma metástase (indicada por um grupo vermelho) reside fora das seções que são eventualmente manchadas e avaliadas no microscópio. As células de tumor no linfonodo estarão ausentes
20 das seções e as análises produzirão um resultado falso-negativo. B ilustra como uma amostra de suspensão de célula única obtida do linfonodo inteiro representa a situação do linfonodo inteiro. A análise de um número de células estatisticamente relevante produzirá um resultado positivo verdadeiro.

A Figura 8 ilustra a avaliação de intervalos de referência para
25 marcadores EpCAM e CA19-9 em uma população de pacientes com câncer colônico, como descrito no Exemplo 4. A ilustra resultados de manchamentos de controle de isotipo realizados para cada nodo sentinela manchado. B ilustra os resultados de manchamentos de nodos sentinelas SN1, SN2 e SN3 do paciente 1. Resultados indicam níveis altos e moderados da presença de

ambos os marcadores SN1 e SN2, respectivamente, ao passo que a expressão em SN3 está próxima ao nível de detecção. C ilustra os resultados de manchamentos de nodos sentinelas SN1 e SN2 do paciente 2. Os resultados indicam a presença de ambos os marcadores em SN1. No SN2 a presença está próxima ao nível de detecção.

Fig. 9.

Detecção de células de tumor pela citometria de fluxo depois do manchamento para CK20. Uma série de diluição de PBMC reforçada com células cancerosas colônicas DLD-1 foi manchada intracelularmente para o marcador de célula epitelial CK20 e analisada usando citometria de fluxo (1A). As descobertas de células positivas em CK20 em PBMC de um paciente com câncer colônico e um indivíduo saudável são representadas (1B).

Fig. 10.

Detecção citométrica de fluxo de células de tumor pelo manchamento para os marcadores de superfície celular associados com tumor EpCAM e CA19-9. A linhagem de célula cancerosa de cólon DLD-1 foi diluída em PBMC em uma faixa de série de diluição de 0,012 a 9 % de células de tumor adicionadas, apenas PBMC sendo usado como controle negativo. A expressão de EpCAM foi analisada e plotada versus as propriedades de SSC; o número indica a porcentagem de eventos de EpCAM⁺ (2A). A análise da expressão de CA19-9 plotada versus as propriedades de SSC, o número indicando a porcentagem de eventos positivos para CA19-9 (2B). A co-expressão dos marcadores de tumor foi examinada plotando-se EpCAM versus CA19-9, os números na plotagem indicando a porcentagem de eventos nos respectivos quadrantes (2C). Nas colunas à direita de Fig. 2C o número total de células detectadas, isto é, a soma de células EpCAM⁺CA19-9⁻, EpCAM⁺CA19-9⁺ e EpCAM⁺CA19-9⁺, são apresentadas assim como a porcentagem esperada do número de células de tumor adicionadas.

Fig. 11.

Análise de inter-ensaio que correlaciona duas investigações individuais. PBMC reforçadas com a linhagem de célula cancerosa do cólon DLD-1 na faixa baixa de células de tumor adicionadas (0, 0,012, 0,037 e 0,11 respectivamente), foram analisadas quanto a variabilidade inter-ensaio coletando 10^6 eventos. As amostras foram manchadas com anticorpos contra EpCAM e CA19-9 e analisadas pela citometria de fluxo. A análise de regressão foi realizada comparando os testes 1 e 2 quanto a expressão de EpCAM (3A), expressão de CA19-9 (3B) e a expressão de EpCAM/CA19-9 (3C).

Fig. 12.

Correlação entre os números de células de tumor detectados e esperados. As amostras de PBMCs reforçadas com a linhagem de célula cancerosa do cólon DLD-1 (0,037, 0,11, 0,33, 1 e 3 %, respectivamente) e uma amostra apenas com PBMCs, foram divididas em 10 alíquotas para a avaliação da variabilidade intra-ensaio. As amostras foram manchadas com anticorpos específicos para EpCAM e CA19-9 e analisadas pela citometria de fluxo. A análise de regressão foi realizada para a porcentagem de expressão de EpCAM plotada versus as características de SSC (4A) e para a expressão de CA19-9 plotado versus as características de SSC (4B). A presença total de células positivas únicas e duplas, isto é, a soma de células $\text{EpCAM}^+\text{CA19-9}^-$, $\text{EpCAM}^+\text{CA19-9}^+$ e $\text{EpCAM}^-\text{CA19-9}^+$, como evidente em uma plotagem de pontos de EpCAM versus CA19-9 foi examinada (4C). Os dados estão apresentados como porcentagem média (tSD) de células de tumor detectadas no eixo y e o número de células esperadas indicado no eixo x.

Fig. 13.

Presença de metástases de câncer colônico em nodos sentinelas.

Quatorze nodos sentinelas de sete pacientes diagnosticados com

câncer colônico foram intracelularmente manchadas em paralelo para CK20 ou extracelularmente para EpCAM e CA19-9, antes da análise citométrica de fluxo. Para cada nodo sentinela manchamentos com controles de isotipos relevantes foram realizados, aqui exemplificado com o manchamento de SN1 a partir do

5 paciente 5 (5A). No paciente um, três nodos sentinelas foram identificados. A presença de células metastáticas foi detectada em SN1 e SN2 ao passo que SN3 apenas conteve um número baixo de eventos positivos próximos ao nível de detecção e foi considerado livre de metástases (5B). A análise citométrica de

10 fluxo dos dois nodos sentinelas obtidos do paciente dois indica disseminação metastática para SN1; em SN2 o número de eventos positivos foi próximo ao limite de detecção e SN2 foi assim considerado negativo (5C).

Exemplos

Exemplo 1

detecção citométrica de fluxo de células cancerosas

15 **colônicas em uma mistura de leucócitos e células cancerosas colônicas**

Resultados

De modo a avaliar a citometria de fluxo célula única de células de tumor manchadas na superfície da célula nodos adicionamos um número de células cancerosas colônicas conhecidos da linhagem de célula cancerosa do cólon

20 CCL221 aos leucócitos sanguíneos periféricos. Assim, nodos imitamos a situação em um linfonodo contendo uma metástase pequena. Primeiro nodos usamos o marcador de tumor CA19-9, conhecido ser expressado na superfície de células cancerosas colônicas. A análise da amostra foi melhor realizada usando a dispersão lateral (SSC) quanto ao tamanho e granulosidade e FL-1 refletindo as

25 células manchadas conjugadas a FITC. As células positivas duplas com respeito a um SSC aumentado e uma alta fluorescência foi identificada como exemplificado na Figura 1. Mesmo tão baixo quanto 0,33 % de células CCL221 adicionadas foi facilmente detectado. Entretanto, um pequeno número de manchamento não específico foi observado mesmo quando as células de tumor não estavam

presentes na amostra, indicando uma pequena fração de células falso positivas. De modo a melhorar o ensaio o experimento foi realizado usando um anticorpo que reconhece uma molécula de superfície celular tipo EpCAM expressada nas células de cólon adicionando de 0,0122 a 3 % de células de tumor ao PBL. Mais uma vez, a população de tumor foi facilmente detectada como um grupo de células que expressam alta quantidade da proteína tipo EpCAM e um SSC aumentado (Figura 2). Mesmo tão pouco quanto 0,0122 % de células foi detectado como uma população distinguida de células (Figura 2). Não houve nenhum problema em células falso positivas usando a proteína tipo EpCAM como um marcador de superfície de célula alvejada visto que nenhum evento foi registrado como duplo positivo quando nenhuma das células de tumor foram adicionadas. Visto que é bem conhecido que as células de tumor podem perder a expressão de moléculas com a sua perda de maturação, nós desejamos combinar um conjunto de moléculas de superfície celular para melhorar a precisão do diagnóstico do ensaio sem o risco de perder as células de tumor que perderam a expressão de uma certa molécula de superfície celular. Nós portanto testamos combinações de quatro marcadores de superfície celular diferentes. A combinação de CA19-9 e dois epítomos de CEA e STN detectaram a vasta maioria de células que são quádruplo positivas (Figura 3A, painel direito). Nós mencionamos que uma pequena maioria, menos do que 1 % foi triplo positiva (Figura 3A, painel direito, Q1) sugerindo que umas poucas células na verdade perderam a expressão de um dos epítomos de CEA. Quando menos células (1 %) foram adicionadas aos PBLs o mesmo resultado foi obtido (Figura 3B). Nós depois testamos uma combinação diferente de quatro proteínas de superfície celular expressadas nas células cancerosas colônicas CA19-9, CA242, STN e epítomo CEA 4. Esta combinação quadripolar comportou-se em uma maneira similar quando do reconhecimento da presença da linhagem de célula CCL221 em PBLs (Figura 4). Mais uma vez, a maioria das células foram positivas para todos os 4 marcadores CA19-9, CA242, STN e epítomo CEA 4 (Figura 4A, painel direito, Q2) e o resultado foi idêntico

quando menos células CCL221 foram adicionadas (Figura 4B, painel direito, Q2). Uma terceira combinação de superfície celular foi testada CA19-9, CA15-3, proteína tipo EpCAM e STN foram testados com resultados similares (Figura 5A e B). Quando o sistema foi testado em um nodo sentinela derivado de um paciente com câncer colônico nodos pudemos facilmente detectar a presença de células cancerosas colônicas pela citometria de fluxo. Usando marcadores CA19-9 e CEA identificamos 33 % das células no nodo sentinela como células que carregam marcadores de célula cancerosa do cólon (Figura 6). Além disso, as células CA19-9⁺ CEA⁺ eletronicamente ativadas e analisando quanto ao STN e a expressão tipo EpCAM revelaram que 24 % das células pareceram quádruplo positivas expressando todos os marcadores testados CA19-9⁺ CEA⁺ STN⁺ tipo EpCAM⁺. Entretanto, 1,7 % das células são triplo positivas para a combinação CA19-9⁺ CEA⁺ STN⁺ e 7,7 % positivas quanto a CA19-9⁺ CEA⁺ tipo EpCAM⁺, demonstrando que as células cancerosas colônicas podem perder a expressão de alguns marcadores de superfície celular em vários graus.

Tabela 1

Anticorpos contra marcadores de superfície em células cancerosas colônicas

Nome	Fluoróforo	Antígeno
B	Alexa647	CEA
C	Alexa488	CA242
D	PerCP	CA19-9
E	PE	STN
F	Alexa488	CA15-3
G	Alexa647	tipo EpCAM

Exemplo 2

Detecção citométrica de fluxo de células cancerosas colônicas metastáticas em linfonodos

Materiais e Métodos

Preparação de células

Leucócitos de sangue periférico foram obtidos por Ficoll paque. A linhagem de célula cancerosa de cólon CCL221 foi cultivada como

sugerido pelo fornecedor (ATCC). Um linfonodo sentinela de um paciente que é diagnosticado com câncer colônico foi obtido por cirurgia. A suspensão de células únicas dos linfonodos sentinelas inteiros a serem investigados foi obtida pela pressão suave dos linfonodos usando um homogeneizador de vidro de encaixe frouxo.

Citometria de fluxo

Amostras de 1×10^6 células foram lavadas em PBS suplementado com 2 % de soro de bezerro fetal e 0,05 % de Azida de sódio (FACS-tampão). As amostras de célula foram depois manchadas com um painel de anticorpos conjugados a fluoróforo selecionado de marcadores extracelulares específicos de tecido, específica do tipo de câncer e específicos do subtipo de câncer (ver os exemplos de marcadores adequados na Tabela 1 acima) e incubados na temperatura ambiente de 15 a 30 minutos. Para remover o anticorpo abundante, as amostras foram lavadas com tampão de FACS antes das análises citométricas de fluxo. Os resultados das análises foram imediatamente disponíveis. O linfonodo investigado foi mostrado conter uma carga pesada de células metastáticas visto que uma grande proporção conteve células quádruplo positivas (Figura 6).

Exemplo 3

Deteção citométrica de fluxo de células cancerosas colônicas em amostras de célula única e desempenho/robustez de ensaio

A suspensão de células únicas de linfócitos do nodo sentinela, células de tumor e PBMC foram analisadas a partir dos pacientes investigados. Para permitir a quantificação de células cancerosas colônicas, amostras de PBMC de voluntários saudáveis, reforçadas com a linhagem de célula cancerosa de cólon DLD-1, foram também investigadas. Uma série de diluição em série de 3 vezes em sete etapas, com uma concentração de partida de 9 % de células de tumor resultou nas concentrações de 9 %, 3 %, 1 %, 0,33 %, 0,11 %, 0,037 % e 0,012 %. Uma amostra de PBMC sozinha foi adicionada à série.

Para o manchamento intracelular do marcador de célula epitelial, as células CK20 foram primeiro lavadas em PBS suplementado com 2 % de BGS e 0,05 % (p/v) de Azida de sódio (tampão de manchamento) e em seguida tratados com Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida as células foram retidas em tampão de manchamento suplementado com 0,3 % de saponina (p/v) (Sigma). O manchamento primário foi realizado com anticorpo CK20 anti-ser humano de camundongo (Dakocytomation) ou controle de isotipo IgG2a (Dakocytomation) por 30 min. As células foram lavadas e incubadas por 30 min com um anticorpo anti-camundongo de cabra conjugado com alofococianina (APC) (Jackson ImmunoResearch) ou um anticorpo anti-camundongo de burro conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch).

O manchamento quanto aos marcadores de superfície celular foi realizado em tampão de manchamento. As células foram lavadas e depois incubadas por 30 min com marcador de adesão anti-célula epitelial (EpCAM) e Antígeno anti-carboidrato 19-9 (CA19-9) (Fujirebio diagnostics), conjugado com Alexa fluor 488 (AF488) (Molecular probes Invitrogen) ou complexo de Peridina-clorofila-proteína (PerCP) (Prozyme), respectivamente, de acordo com as descrições do fabricante. Os controles de isotipo usados foram IgG2a (clone G155-178) conjugado com AF488 e IgG1 (clone MOPC-21) conjugado com PerCP (Becton Dickinson). A aquisição de 100.000 eventos (Tabela 2, Tabela 4) ou 1.000.000 de eventos (Tabela 3), respectivamente, de cada amostra foi conduzida usando um FACS Aria (Becton Dickinson) e os dados coletados foram analisados usando o software FACSDiva. Os eventos positivos foram identificados pela respectiva plotagem de fluorescência na escala log contra as dispersões laterais lineares (SSC) características. Os quadrantes superiores esquerdo e direito foram ajustados para excluir as células mortas e fragmentos celulares inicialmente testados com PI. As amostras manchadas tanto para EpCAM quanto CA19-9 também foram

analisadas usando plotagens de pontos com log da fluorescência verde (AF488) versus log da fluorescência vermelha (PerCP)

Tabela 2. Variabilidade Intra-ensaio

números de célula esperados (%)	EpCAM ⁺			CA19-9 ⁺			EpCAM ⁺ CA19-9 ⁺ EpCAM ⁺ CA19-9 ⁻ EpCAM ⁻ CA19-9 ⁺		
	Média (n = 10)	SD	CV (%)	Média (n = 10)	SD	CV (%)	Média (n = 10)	SD	CV (%)
3	2,8	0,129	4,6	2,0	0,080	4,0	2,9	0,107	3,7
1	0,93	0,066	7,2	0,71	0,057	8,0	1,0	0,072	7,2
0,33	0,32	0,018	5,8	0,27	0,019	6,9	0,39	0,015	4,0
0,11	0,11	0,011	10,7	0,11	0,015	12,9	0,17	0,016	9,4
0,037	0,041	0,006	15,5	0,067	0,007	10,4	0,093	0,009	9,8
0	0,002	0,002	90,0	0,036	0,006	16,1	0,047	0,005	9,8

Tabela 3. Variabilidade intra- e inter-ensaio

números de célula esperados (%)	EpCAM ⁺ 1 ^a aquisição			EpCAM ⁺ 2 ^a aquisição		
	Média (n = 10)	SD	CV (%)	Média (n = 10)	SD	CV (%)
0,11	0,096	0,005	5,15	0,093	0,005	5,75
0,037	0,036	0,003	7,09	0,037	0,004	9,83
0,012	0,013	0,001	6,19	0,012	0,001	8,11
0	0,004	0,001	2,84	0,003	0,001	23,80

5

números de célula esperados (%)	EpCAM ⁺ 1 ^a aquisição			EpCAM ⁺ 2 ^a aquisição		
	Média (n = 10)	SD	CV (%)	Média (n = 10)	SD	CV (%)
0,11	0,124	0,015	12,23	0,085	0,006	6,53
0,037	0,089	0,016	17,87	0,072	0,011	14,82
0,012	0,018	0,002	8,70	0,017	0,001	4,29
0	0,020	0,002	11,07	0,013	0,001	10,07

números de célula esperados (%)	EpCAM ⁺ CA19-9 ⁺ EpCAM ⁺ CA19-9 ⁻ EpCAM ⁻ CA19-9 ⁺ EpCAM ⁺ 1 ^a aquisição			EpCAM ⁺ CA19-9 ⁺ EpCAM ⁺ CA19-9 ⁻ EpCAM ⁻ CA19-9 ⁺ EpCAM ⁺ 2 ^a aquisição		
	Média (n = 10)	SD	CV (%)	Média (n = 10)	SD	CV (%)
0,11	0,097	0,007	6,91	0,092	0,005	5,64
0,037	0,038	0,004	9,85	0,039	0,005	11,89
0,012	0,016	0,002	13,54	0,016	0,002	11,13
0	0,004	0,001	31,34	0,002	0,001	41,70

Tabela 4. Investigação de nodos sentinelas de pacientes com câncer colônico

Pat no:	nodo sentinela no:	CK20+ (%)	EpCAM+ (%O	CA19-9+ (%)	EpCAM+CA19-9 ⁺ EpCAM+CA19-9 ⁻ EpCAM-CA19-9 ⁺ (%)
1	SN1	5,6	1,9	5,6	11
1	SN 2	0,57	0,18	0,72	2,6
1	SN 3	0,17	0,051	0,093	0,41
2	SN 1	0,69	1,3	0,42	2,6
2	SN 2	0,13	0,15	0,13	1,0
3	SN	0,099	0,038	0,042	0,75
4	SN 1	0,17	0,088	0,024	0,90
4	SN 2	3,1	2,8	24,7	29
5	SN 1	1,9	0,79	1,7	3,9
5	SN 2	1,9	1,3	2,4	6,2
6	SN 1	0,20	0,26	0,078	1,1
6	SN2	0,30	0,55	0,27	1,6
7	SN 1	0,18	0,069	1,3	1,4
7	SN 2	0,18	0,064	0,65	0,76

Desempenho de Ensaio, Robustez

A variabilidade intra-ensaio para as análises citométricas de fluxo de marcadores de superfície de tumor foi testada dividindo-se uma amostra em dez alíquotas antes da análise citométrica de fluxo. A partir das amostras da série de diluição com 0,037 %, 0,11 %, 0,33 %, 1 % e 3 % de células de tumor DLD-1 adicionadas e amostras de PBMC sozinhas foram examinadas. Para EpCAM e CA19-9, quando apresentados separadamente, o número de eventos positivos foi determinado em plotagens de pontos da respectiva fluorescência na escala log versus as propriedades SSC lineares. A análise do número total de células detectadas foi realizada plotando-se o log da fluorescência verde versus o log da fluorescência vermelha e os eventos registrados como EpCAM⁺CA19-9⁻, EpCAM⁻CA19-9⁺ ou EpCAM⁺CA19-9⁺ foram acumulados. A detecção média resultante de células cancerosas colônicas, o desvio padrão e o coeficiente de variação são listados na Tabela 2.

Os valores médios de células de tumor detectadas com a expressão de EpCAM foram próximas daquelas esperadas, indicando que quase todas as células DLD-1 expressaram EpCAM (Tabela 2). Os

valores CV obtidos a partir das amostras com 0,11, 0,33, 1 e 3 % de células cancerosas colônicas DLD-1 adicionados foram na faixa de 4,6 a 10,7 %, indicando variabilidade intra-ensaio muito baixa. O número médio de células detectadas para 0,037 % de células adicionadas foi 0,041 % (faixa de 0,035 a 0,055 %) e para as PBMC sem nenhuma adição de células de tumor 0,002 (faixa de 0 a 0,004 %) (Tabela 2). Quando a expressão de CA19-9 foi investigada os valores médios de recuperação de célula de tumor foram mais baixos do que os números esperados, mais uma vez indicando que nem todas as células de tumor expressam CA19-9 (Tabela 2). O manchamento de fundo médio nas PBMCs foi de 0,036 %, o que interfere com a detecção de células de tumor nas concentrações baixas, mas para 0,33, 1 e 3 % células adicionadas 67, 71 e 82 %, respectivamente, parecem expressar CA19-9. Para a faixa de 0,037 a 3 % células adicionadas o CV médio para a detecção de CA19-9 foi de 8,4 %, indicando baixa variabilidade intra-ensaio.

Quando a expressão de $\text{EpCAM}^+\text{CA19-9}^-$, $\text{EpCAM}^+\text{CA19-9}^+$ e $\text{EpCAM}^-\text{CA19-9}^+$ foi examinada os meios resultantes estão próximos aos números esperados de células (Tabela 2). Além disso, 10^6 células/amostra foram coletadas para validar ainda mais o método em números de célula próximos ao limiar (Tabela 3). Os desvios padrão para as medições foram baixos (faixa de 0,001 a 0,016), demonstrando variabilidade intra-ensaio baixa quando do teste de 10 amostras. As CVs para a detecção de células EpCAM^+ e CA19-9^+ para a faixa inteira de células adicionadas (0 a 0,11 %) foram no geral baixas, indicando também a estabilidade de ensaio. Entretanto, quando da medição de números de célula próximos a zero, o coeficiente de variação é matematicamente sensível às pequenas mudanças no desvio padrão, limitando a sua utilidade para cálculos com respeito ao número de células baixo. A comparação do desempenho do teste 1 e teste 2 para a detecção de célula de tumor usando os anticorpos EpCAM, CA19-9 e

EpCAM/CA19-9 foram em boa conformidade com os coeficientes de regressão próximos a 1 (Fig. 11A-C).

A faixa dinâmica de 0 a 3 % de células foi testada realizando-se a análise de regressão (Fig. 12A-C). O coeficiente de amostra da determinação foi 1 para EpCAM⁺ (Fig. 12A), CA19-9⁺ (Fig. 12B) e para as células duplo positivas. (Fig. 12C), demonstrando um desempenho estável e confiável dentro da faixa investigada. A correlação entre os números observados e os números esperados de células de tumor para EpCAM⁺ (Fig. 12A) e para a soma das células EpCAM⁺CA19-9⁻, EpCAM⁺CA19-9⁺ e EpCAM⁺CA19-9⁺ (Fig. 12C) foi próxima àquela que é esperada do número teórico de células adicionadas. CA19-9 parece ser expressada em aproximadamente 73 % das células de tumor DLD-1.

Exemplo 4

Avaliação de marcadores em nodos sentinelas de pacientes com câncer colônico

Materiais e métodos

Linfonodos sentinelas de 7 pacientes foram identificados durante a cirurgia pelas injeções peritumorais de uma substância traçadora. As suspensões de célula única de cada linfonodo foram preparadas usando um homogeneizador de vidro de encaixe frouxo. O manchamento para os marcadores extracelulares foi realizado em tampão de manchamento. As células foram lavadas e incubadas por 30 minutos com anti-EpCAM e anti-CA19-9 conjugados com Alexa488 e PerCP, respectivamente.

Os controles de isotipo foram realizados para cada nodo sentinela manchado, exemplificado pelo manchamento de SN1 do paciente 5 (figura 8 A).

A análise foi realizada pela aquisição de 100.000 eventos de cada amostra usando um citômetro de fluxo FACS Aria.

Os resultados das análises foram apresentados como indicado

nas Figuras 8 B e 8 C (pacientes 1 e 2, respectivamente).

Os resultados da análise são apresentados na Tabela 2 abaixo:

Pat no:	nodo sentinela no:	EpCAM+ (% de eventos totais)	CA19-9+ (% de eventos totais)
1	SN1	1,9	5,6
1	SN 2	0,18	0,72
1	SN 3	0,051	0,093
2	SN 1	1,3	0,42
2	SN 2	0,15	0,13
3	SN1	0,038	0,042
4	SN 1	0,088	0,024
4	SN 2	2,8	24,7
5	SN 1	0,79	1,7
5	SN 2	1,3	2,4
6	SN 1	0,26	0,078
6	SN2	0,55	0,27
7	SN 1	0,069	1,3
7	SN 2	0,064	0,65

Os dados tais como aqueles apresentados na tabela acima podem ser usados para as descobertas de valores de corte ótimos para cada marcador e marcadores em combinação. De modo a descobrir valores de corte confiáveis, entretanto, o tamanho da amostra precisaria ser muito maior.

No caso a situação verdadeira de cada amostra foi conhecida, a sensibilidade e a especificidade para valores de corte diferentes podem ser facilmente calculadas. Um valor de corte ótimo para cada população pode ser então gerado usando, por exemplo curvas ROC, como apresentadas acima.

No caso da situação verdadeira ser desconhecida, a prevalência das células cancerosas colônicas em linfonodos sentinela em uma população de paciente relevante teria que ser conhecida. Com base no teste, os resultados para cada nodo, cada amostra pode ser categorizada em um grupo assumido negativo e um grupo assumido positivo onde o tamanho proporcional de cada grupo pode se igualar com a prevalência na população de paciente relevante. O intervalo de referências pode ser então calculado para ambos os grupos.

Se os dados gerados conformam uma função distributiva tal como, por exemplo, a distribuição Normal, os intervalos de referência podem ser calculados usando um método paramétrico. Usar métodos paramétricos é

no geral preferido visto que os intervalos de confiança dos intervalos de referência é no geral mais estreito a menos que o tamanho da amostra seja muito grande.

5 Se os dados gerados não se conformam com nenhuma função distributiva, um método não paramétrico teria que ser usado. De modo a reduzir o intervalo de confiança, um tamanho de amostra muito grande seria necessário.

10 A comparação dos intervalos de referência para ambos os grupos de amostras (assumidos positivos e assumidos negativos) pode ser usada para ajustar um valor de corte apropriado. O valor de corte seria ajustado, por exemplo, para minimizar a sobreposição dos intervalos ou para minimizar o risco de um diagnóstico de falso-negativo.

Exemplo 5

15 Manchamento intracelular para CK20 em uma linhagem de célula cancerosa do cólon. Experimento de Referência. O método padrão para a detecção de metástases em linfonodos de câncer colônico é o manchamento imunoistoquímica usando anticorpos CK20. De modo a avaliar este marcador para a detecção de metástases pela citometria de fluxo intracelular o manchamento de CK20 e detecção com um anticorpo secundário conjugado a
20 APC foi realizado.

25 Para o teste inicial números decrescentes da linhagem de célula cancerosa de cólon DLD-1 foram adicionados às PBMCs. Partindo com uma concentração de 9 % de células de tumor adicionadas foi determinado que todas as células positivas em CK20 foram detectadas (Fig. 9A, painel de topo). Usando uma série de diluição de três vezes foi possível detectar células de tumor positivas em CK20 abaixo de uma concentração de 0,037 % de células adicionadas (Fig. 9A). O manchamento de fundo em PBMC sem a adição de células DLD-1 foi de 0,009 % de células positivas em CK20 (Fig. 9A, painel de fundo) e o controle de isotipo deu um manchamento

não específico com uma média de 0,011 % de células positivas (dados não mostrados), indicando um número baixo de eventos falso positivos. As células positivas em CK20 foram descritas em PBMCs de indivíduos saudáveis, sugerindo uma existência transitória normal de células epiteliais positivas em citoqueratina no sangue. Quando nodos manchamos intracelularmente PBMCs quanto a CK20 fomos capazes de detectar 0,19 % e 0,16 % de células positivas em CK20 como exemplificado em um paciente com câncer colônico com doença metastática e um indivíduo saudável, respectivamente (Fig. 9B, painéis à esquerda). Ao contrário, 0,03 % e 0,02 % de positividade foram detectados quando um controle de isotipo foi usado (Fig. 9B, painéis à direita). Assim as células epiteliais positivas em CK20 foram observadas estar presentes no sangue em um nível baixo em indivíduos saudáveis.

Exemplo 6

Manchamento de marcadores de superfície em uma linhagem de célula cancerosa de cólon

Visto que as células positivas em CK20 foram identificadas em níveis baixos mesmo em indivíduos saudáveis e o manchamento intracelular é mais embaraçoso, a utilidade de anticorpos diretamente conjugados que reconhecem os marcadores de superfície de célula cancerosa do cólon foi investigada. A série de diluição de células de tumor suplementadas com DLD-1 foi portanto manchada com anticorpos específicos para os dois antígenos de superfície associados a tumor EpCAM e CA19-9, conjugados com os fluoróforos AF488 e PerCP, respectivamente.

EpCAM foi expressado em quase todas as células cancerosas colônicas DLD-1 (Fig. 9A). O número de células detectadas correlaciona-se bem com o manchamento para CK20. A detecção do número de células de tumor mais baixo adicionado (0,012 % de células DLD-1) foi identificado como 0,014 % de células positivas em EpCAM (Fig. 9A). Visto que o manchamento de fundo usando apenas PBMCs foi de 0,004 % de eventos

detectados, nodos concluimos que as células positivas em EpCAM podem ser detectadas com boa precisão dentro de amostras pequenas de células.

O antígeno CA19-9 é expressado em aproximadamente 80 % das células de tumor DLD-1 (Fig. 10B). A razão média entre CA19-9⁺ e o número de células adicionado para as 5 concentrações mais altas foi de 0,80 (faixa de 0,73 a 0,91). O manchamento de fundo nas PBMCs sem nenhuma célula cancerosa colônica adicionada foi levemente mais alto para CA19-9 do que para EpCAM, com 0,017 % das células sendo positivas em CA19-9 (Fig. 10B, painel de fundo), comparado com 0,004 % sendo positiva EpCAM (Fig. 10A, painel de fundo). A presença de células de tumor foi facilmente detectável em concentrações tão baixas quanto 0,11 % de células adicionadas sem interferir com o manchamento de fundo. Assim embora o fundo seja levemente mais alto do que aquele para o manchamento com EpCAM, CA19-9 parece ser um marcador útil para a detecção de células cancerosas colônicas pela citometria de fluxo.

A co-expressão dos dois marcadores associados a tumor foi avaliada pelas análises da expressão de EpCAM versus CA19-9, usando plotagens de pontos com o log da fluorescência verde (AF488) versus o log da fluorescência vermelha (PerCP). Houve uma boa correlação com o número de células detectadas de 9 % abaixo para 0,11 % de células adicionadas (Fig. 10C). Em média, 84 % das células adicionadas foram duplo positivas para a expressão de EpCAM e CA19-9 (Fig. 10C, quadrante direito superior), de acordo com os dados de manchamento único por meio do qual CA19-9 foi expressado em 80 % das células (Fig. 10B). Uma média de 24 % das células foi EpCAM⁺CA19-9⁻ na série de diluição (Fig. 10C, quadrantes direitos inferiores). Os números de células positivas únicas CA19-9 foram muito baixos (média 0,5 %) (Fig. 10C, quadrante esquerdo superior). Assim a vasta maioria de células DLD-1 CA19-9⁺ concorrentemente expressam EpCAM. O uso de fluorescência em ambos os eixos aumentou o manchamento de fundo

em PBMCs para 0,087 % (Fig. 10C, painel de fundo). Visto que a maior parte destes eventos (0,079 %) foram confinados ao quadrante esquerdo superior, o fundo aumentado é devido a um número mais alto de eventos CA19-9 falso positivos. Nenhum dos controles de isotipo, (IgG2a AF488 ou IgG1 PerCP) deu qualquer manchamento não específico significativo (dados não incluídos). A detecção de células de tumor em PBMCs reforçadas com a linhagem de célula cancerosa de cólon DLD-1 pode ser portanto facilitada pelo manchamento quanto aos marcadores de superfície celular múltiplos.

Exemplo 7

Detecção de células de tumor em nodos sentinelas

Para verificar a utilidade dos anticorpos diretamente conjugados específicos para EpCAM e CA19-9 em pacientes com câncer colônico, a suspensão de células únicas recém recuperadas de 14 nodos sentinelas de 7 pacientes foi analisada (Tabela 4). As células foram intracelularmente manchadas em paralelo para CK20 para possibilitar a comparação. Os controles de isotipo para citoqueratina 20, EpCAM e CA19-9 foram usados para determinar a presença de células positivas (Fig 13A). Em média, 0,32, 0,21 e 0,16 % células foram manchadas positivas quando controles de isotipo para CK20, EpCAM e CA19-9 foram usados, respectivamente.

No paciente 1 três nodos sentinelas foram identificados (SN1-3). No SN1 houve uma clara presença de células cancerosas colônicas metastáticas, das quais 5,6 % foram positivas em CK20 e a mesma fração de células foi identificada como sendo positiva em CA19-9 (Fig. 13A). EpCAM pareceu ser expressada em um terço (34 %) das células metastáticas (ou 1,9 % de eventos totais). As células metastáticas foram também presentes em SN2, 0,57 % das células sendo positivas em CK20 e 0,72 % sendo positivas para CA19-9. A expressão de EpCAM foi de 0,18 %, que em comparação com a expressão de citoqueratina representa 32 % das células metastáticas e 25 %

comparado com as células positivas em CA19-9. Entretanto, o número de células positivas em EpCAM detectadas está próximo ao nível de controle de isotipo. A investigação de SN3 revelou apenas muito poucos eventos positivos para CK20, EpCAM ou CA19-9, próximos aos níveis de detecção determinados pelos controles de isotipo e assim SN3 foi considerado como sendo negativo quanto a presença de células cancerosas colônicas metastáticas.

Dois nodos sentinelas foram identificados intra-operativamente no paciente 2 (Fig 13B). Em SN1 os manchamentos de CK20 e CA19-9 foram comparáveis com 0,69 % e 0,42 % das células metastáticas detectadas, ao passo que 1,3 % dos eventos detectados foram EpCAM⁺. Mais uma vez em SN2 o número detectado de eventos positivos usando todos os três marcadores foi próximo ao limite de detecção, como determinado pelos controles de isotipo e SN2 foi assim considerado livre de metástases. Comparado com o sistema de teste com PBMCs reforçadas com células de tumor (Fig 10), as amostras de tecido de linfonodo foram menos homogêneas, resultando em um fundo mais alto.

Discussão

Apresenta-se um novo método por multiplexação para a detecção rápida e reprodutível de células metastáticas em linfonodos. Até agora, a detecção de metástases está fundamentada na investigação microscópica de umas poucas seções de material de linfonodo avaliadas por um patologista. O método é consumidor de tempo, intensivo em trabalho, caro e subjetivo à avaliação do patologista individual. Por exemplo a pressão sobre o patologista para avaliar uma seção congelada tirada da sala de operação, com um cirurgião esperando o veredicto se continua ou não e expande o procedimento cirúrgico, causa uma situação com o risco de resultados falso positivos. Além disso, o procedimento permite apenas a análise de uma seção de uns poucos 6 µm criando uma situação onde os resultados falso negativos

são prováveis visto que partes do linfonodo não foram ainda investigadas. Para desviar estes obstáculos e permitir um método rápido, objetivo para a avaliação de células metastáticas em linfonodos nós montamos um sistema que investiga uma amostra estatisticamente relevante do linfonodo como um

5 todo onde a presença de células metastáticas é confiavelmente identificada pelo manchamento por multiplexação de moléculas de superfície celular presentes nas células de cólon (Figura 6), as células que sob as condições normais não estão presentes no linfonodo. A combinação de pelo menos quatro marcadores aumenta a sensibilidade e especificidade do ensaio pela

10 diminuição do número de amostras falso positivas e falso negativas. Assim, os resultados da investigação terão valores prognosticados positivos e negativos aumentados comparado com a avaliação microscópica, permitir que o cirurgião planeje com mais confiança a extensão da cirurgia de investigação de linfonodo. Além disso, visto que a extração de células únicas dos

15 linfonodos é um procedimento fácil e eficiente e que os anticorpos com altas afinidades e taxas de ligação altas (k_{on}) são usados, a ligação de reagentes de detecção é rápida permitindo tempos de incubação curtos e uma leitura objetiva dentro de uns poucos minutos pela citometria de fluxo. O uso de citometria de fluxo para a análise permite um grau mais alto de padronização

20 e simplifica o trabalho do controle de qualidade pelo uso de padrões.

Referências

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977; 39(2): 456-66.

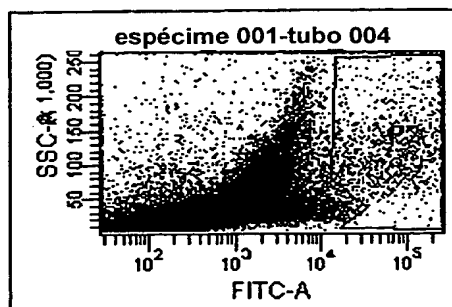
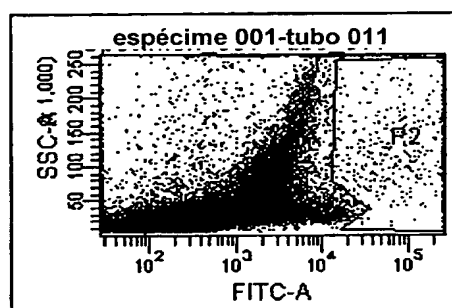
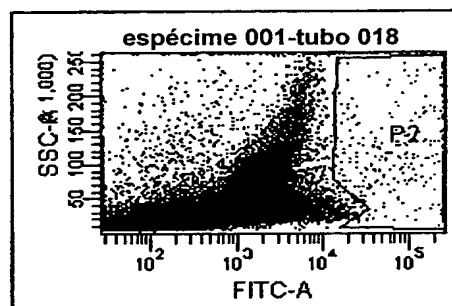
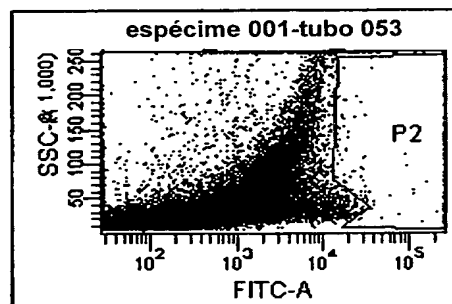
- 5 Morton D, Essner R, Hoon DS, *et al.* Long-Term Results of Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for Early-Stage Melanoma: Implications of Nodal Microanatomy and Molecular Staging on Detection of Nodal Micrometastasis. American Surgical Association 123rd Annual Meeting. Washington, DC: American Surgical Association, 2003: 60.

- 10 Merrie AEH, Yun K, Gunn J, Phillips LV, McCall JL: Analysis of potential markers for detection of submicroscopic lymph node metastases in breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 2019-2024.

- 15 Noguchi M, Tsugawa K, Bando E, Kawahara F, Miwa K, Yokoyama K, Nakajima K, Tonami N: Sentinel lymphadenectomy in breast cancer: Identification of sentinel lymph node and detection of metastases. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53: 97-104.

- 20 M P G Leers, R H M G Schoffelen, J G M Hoop, P H M H Theunissen, J W A Oosterhuis, H vd Bijl, A Rahmy, W Tan, M Nap: Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 359-366.

- 25 Donald L. Weaver, David N. Krag, Edward A. Manna, Takamaru Ashikaga, Brenda L. Waters, Seth P. Harlow, Kenneth D. Bauer, Thomas B. Julian: Detection of occult sentinel lymph node micrometastases by immunohistochemistry in breast cancer. *Cancer*. 15 de agosto de 2006; 107(4): 661-7.

CA-19-9**3% CCL221****1% CCL221****0.33% CCL221****0% CCL221****Fig. 1**

Tipo Epcam

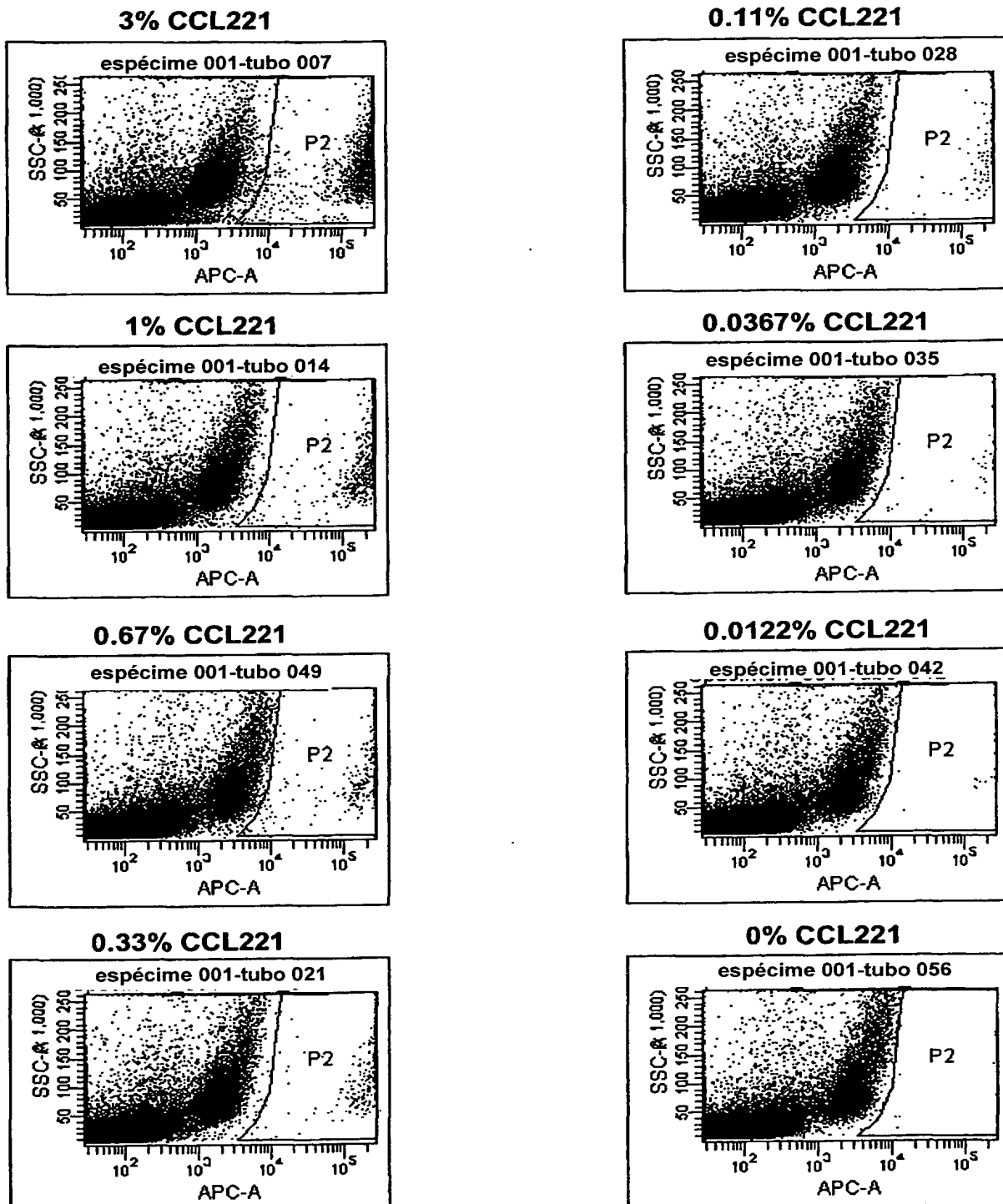
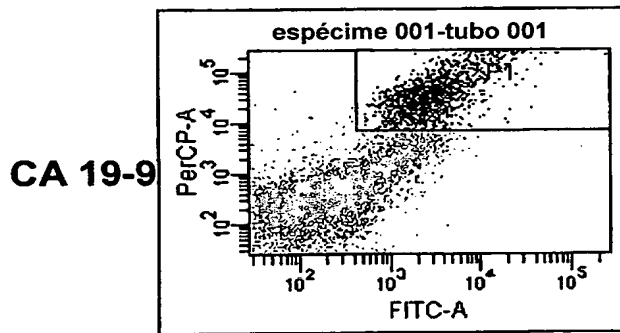
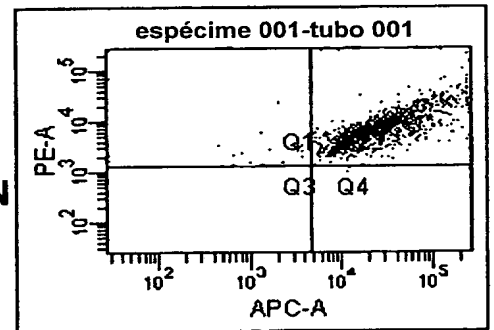
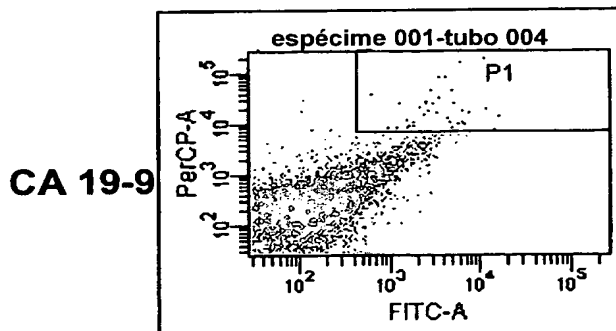
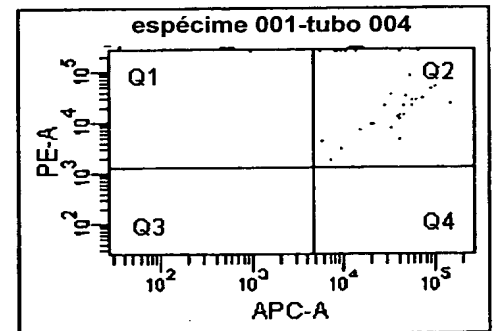
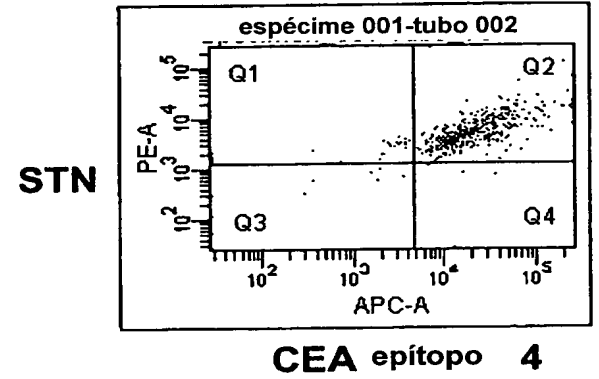
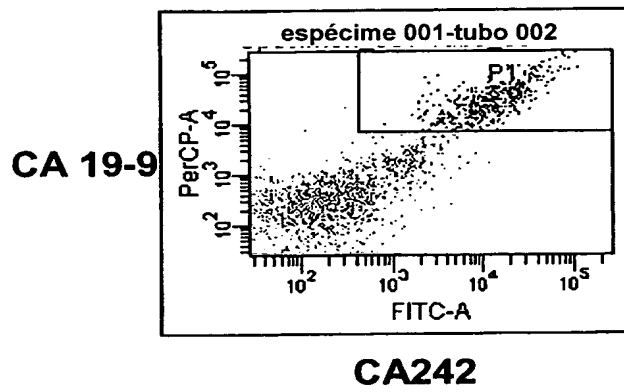
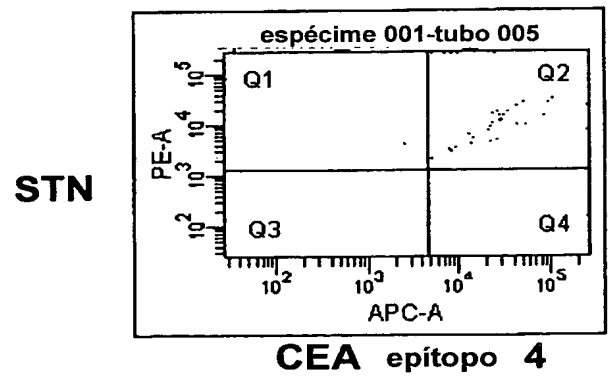
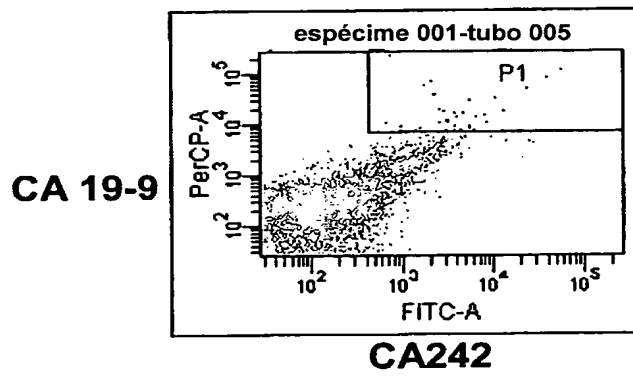
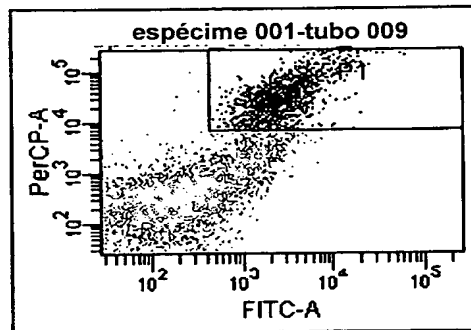
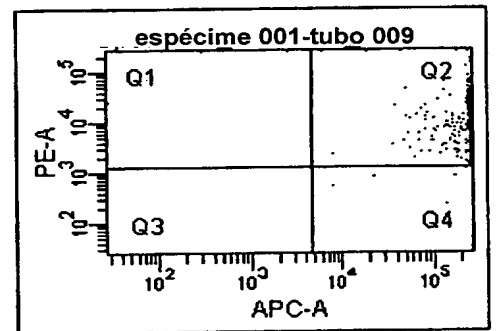
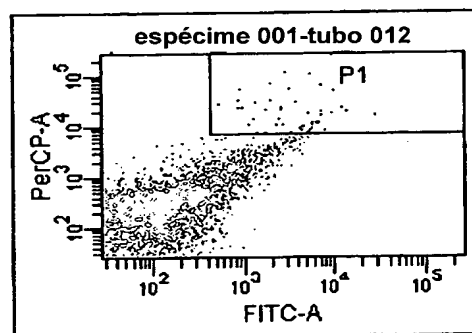
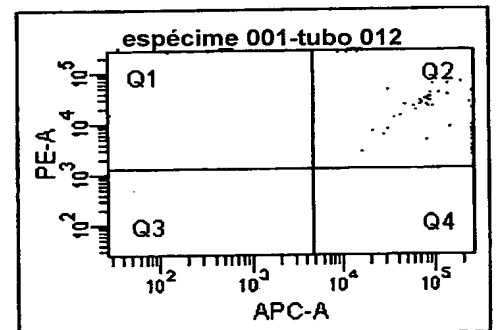


Fig. 2

A**CEA epítipo 5****STN****CEA epítipo 4****B****CEA epítipo 5****STN****CEA epítipo 4****Fig. 3**

A**B****Fig. 4**

A**CA 19-9****CA 15-3****STN****equivalente a Epcam****B****CA 19-9****CA 15-3****STN****tipo Epcam****Fig. 5**

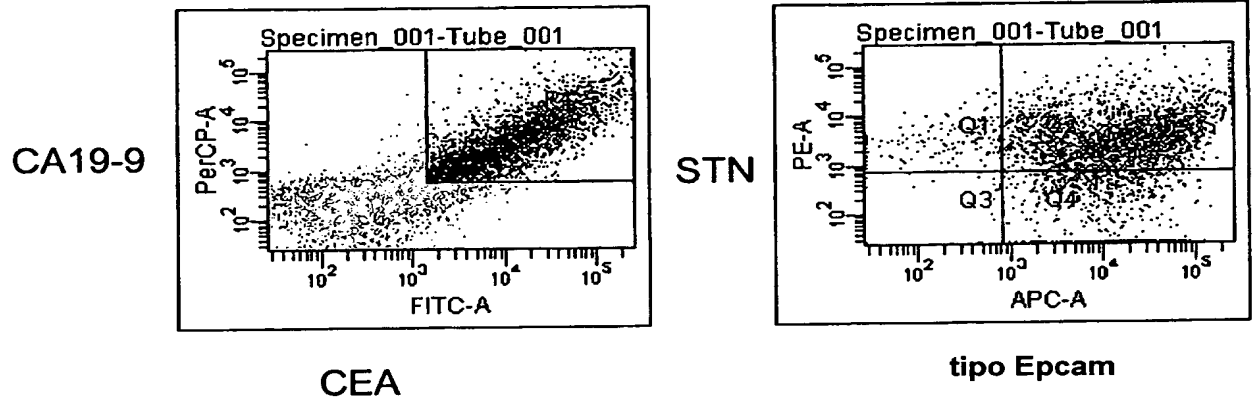
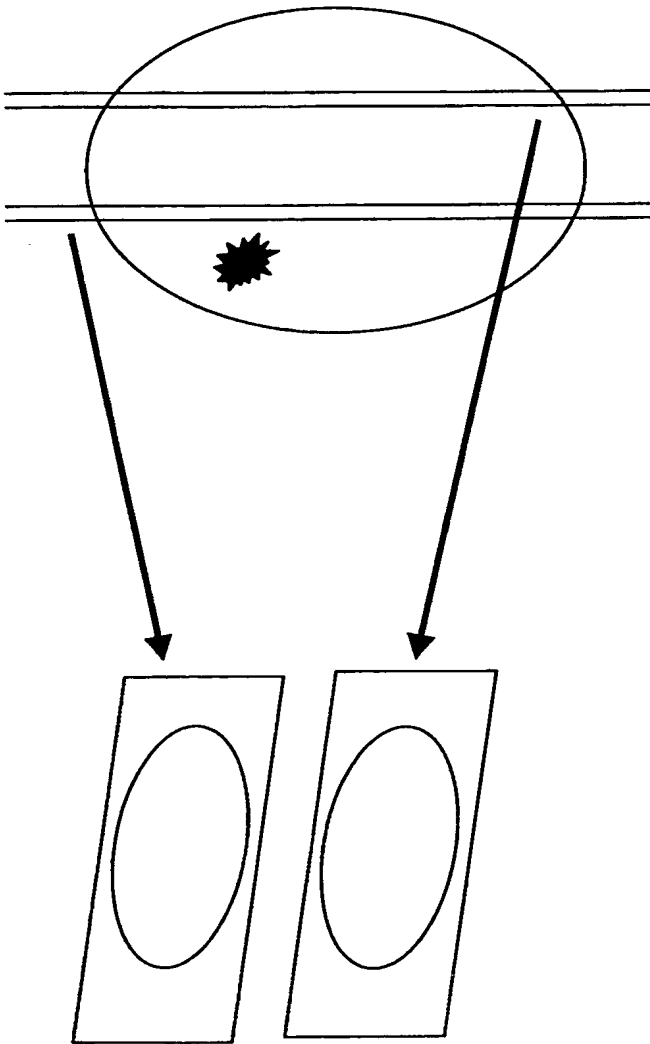
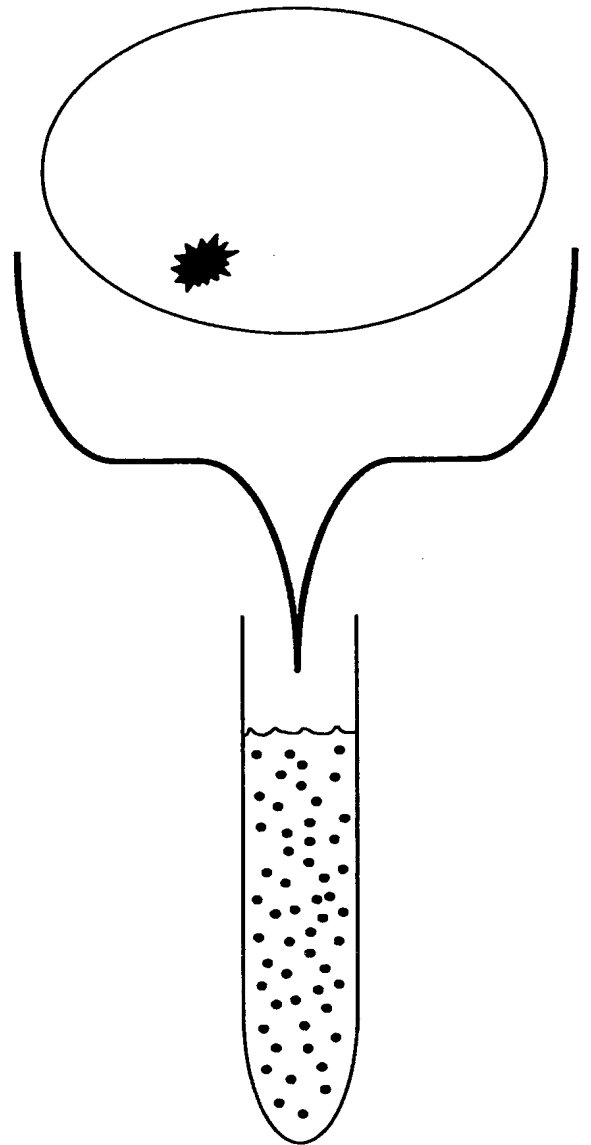


Fig. 6

A**B****Fig. 7**

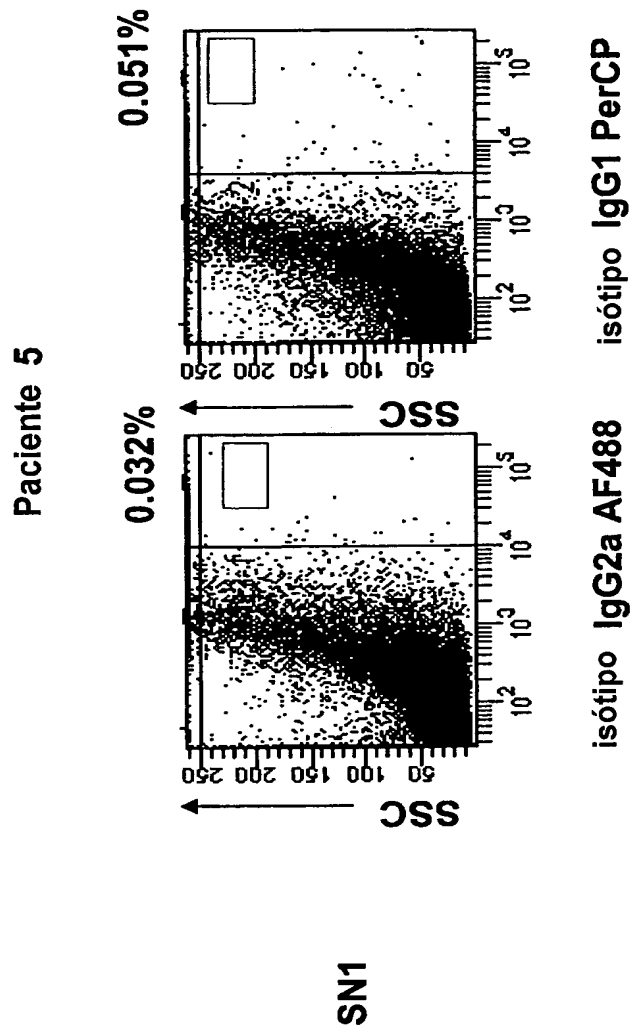


Fig. 8 A

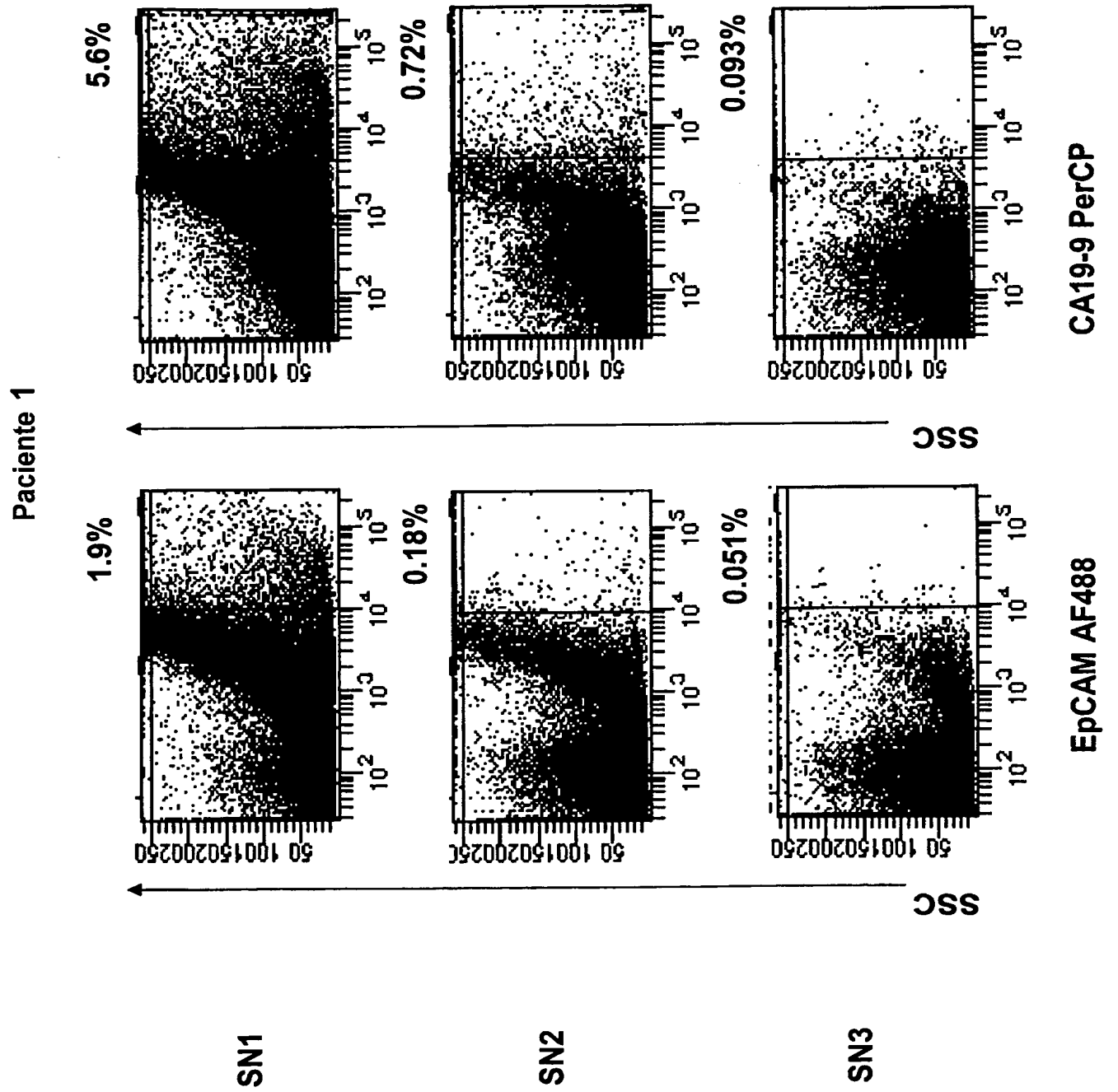


Fig. 8 B

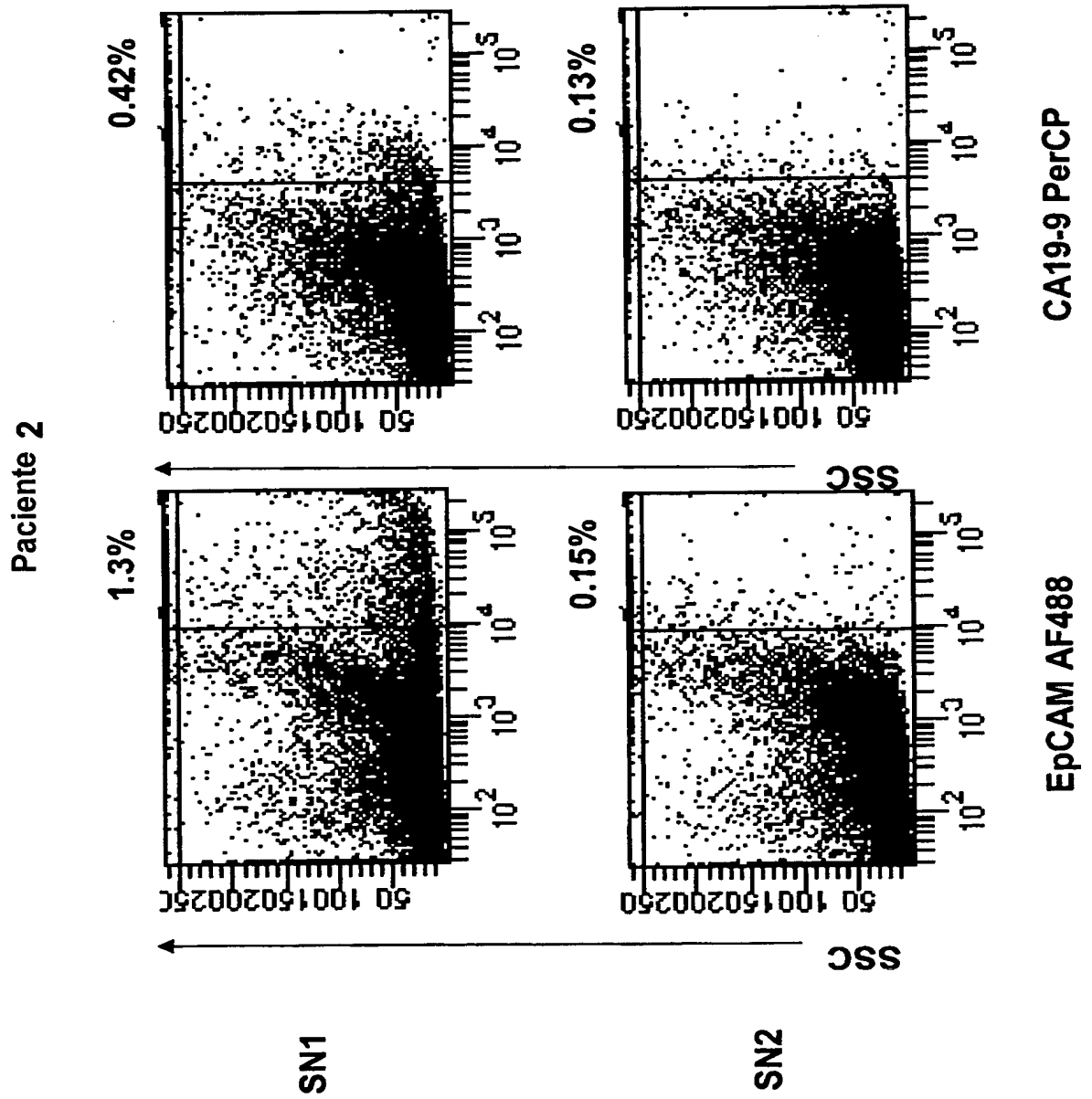


Fig. 8 C

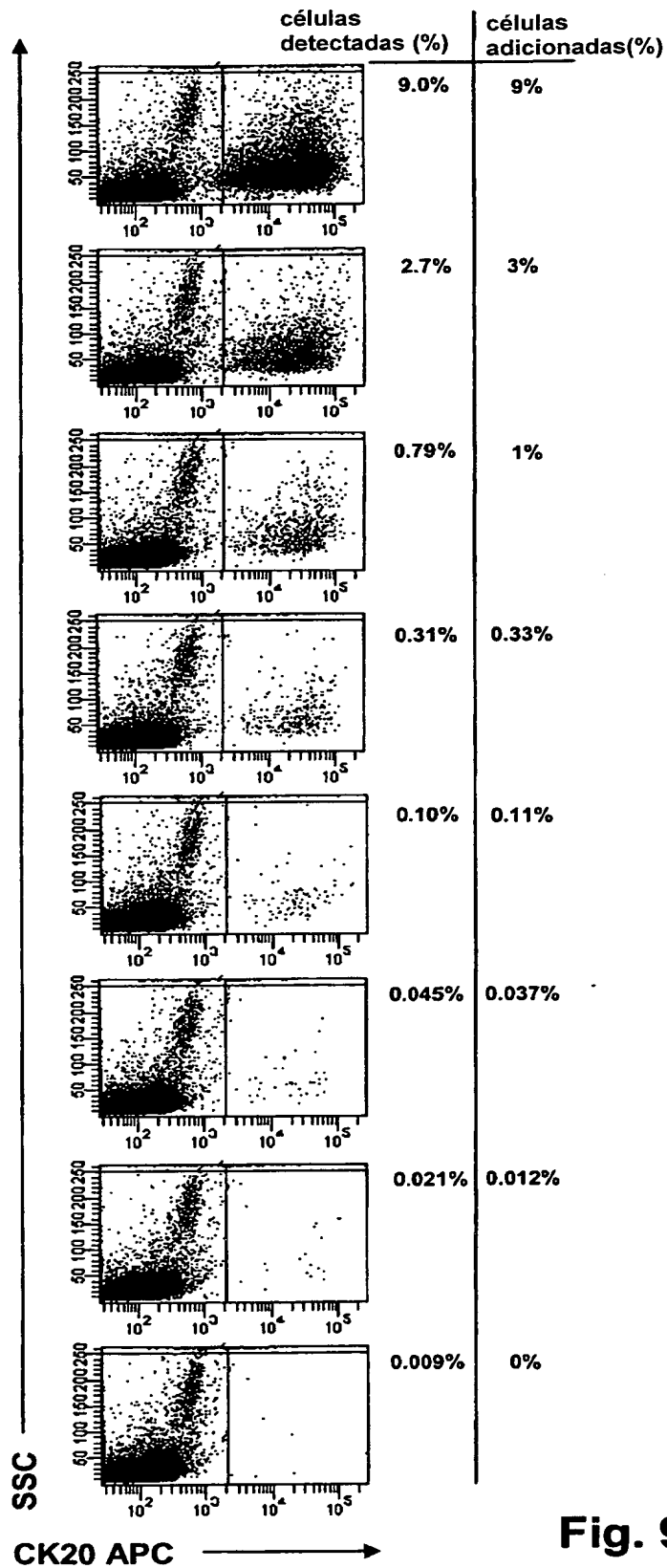
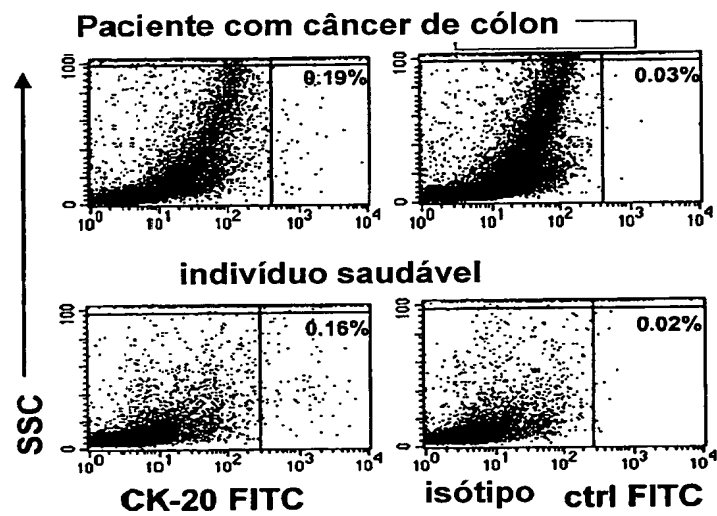


Fig. 9A

**Fig. 9B**

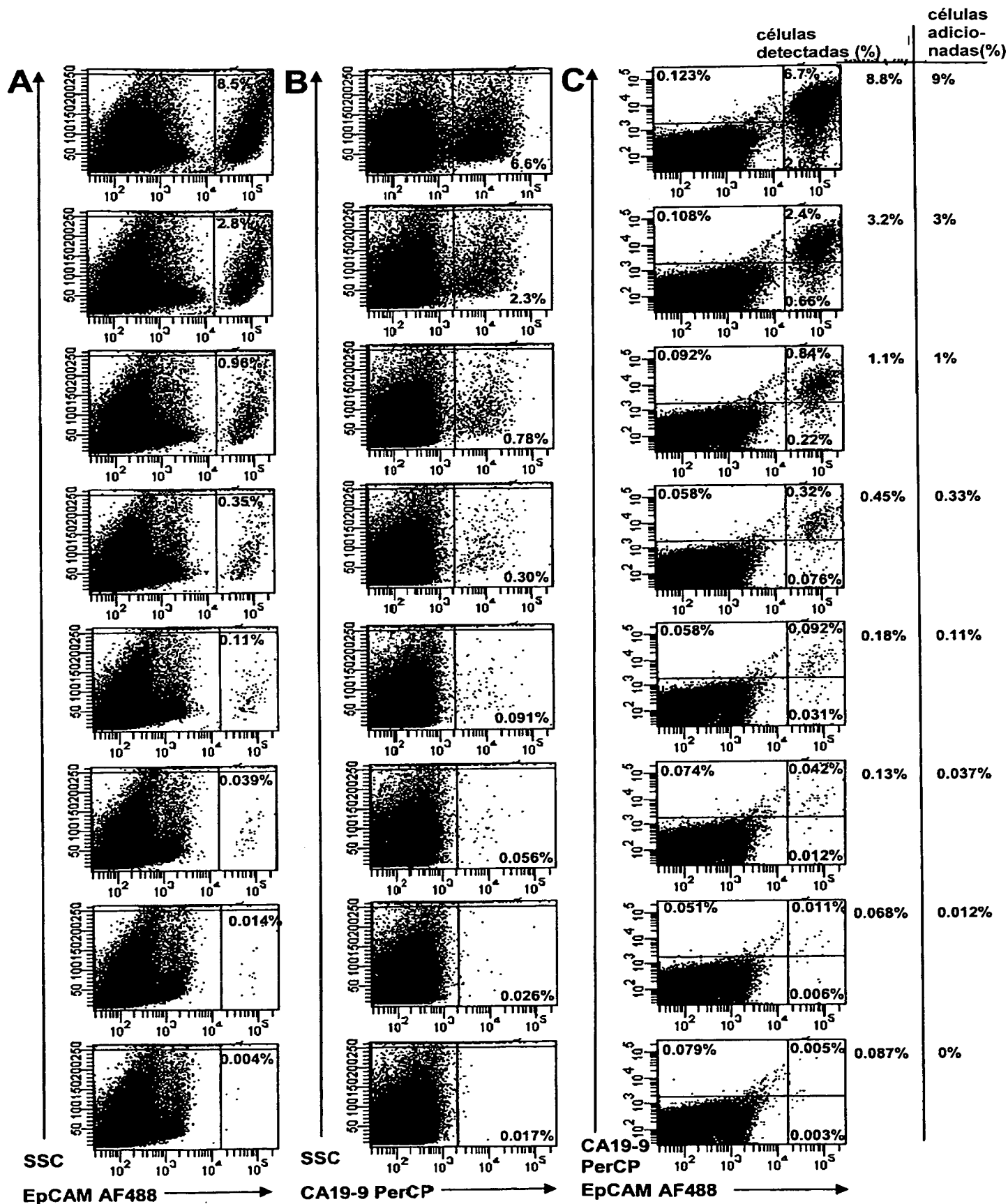
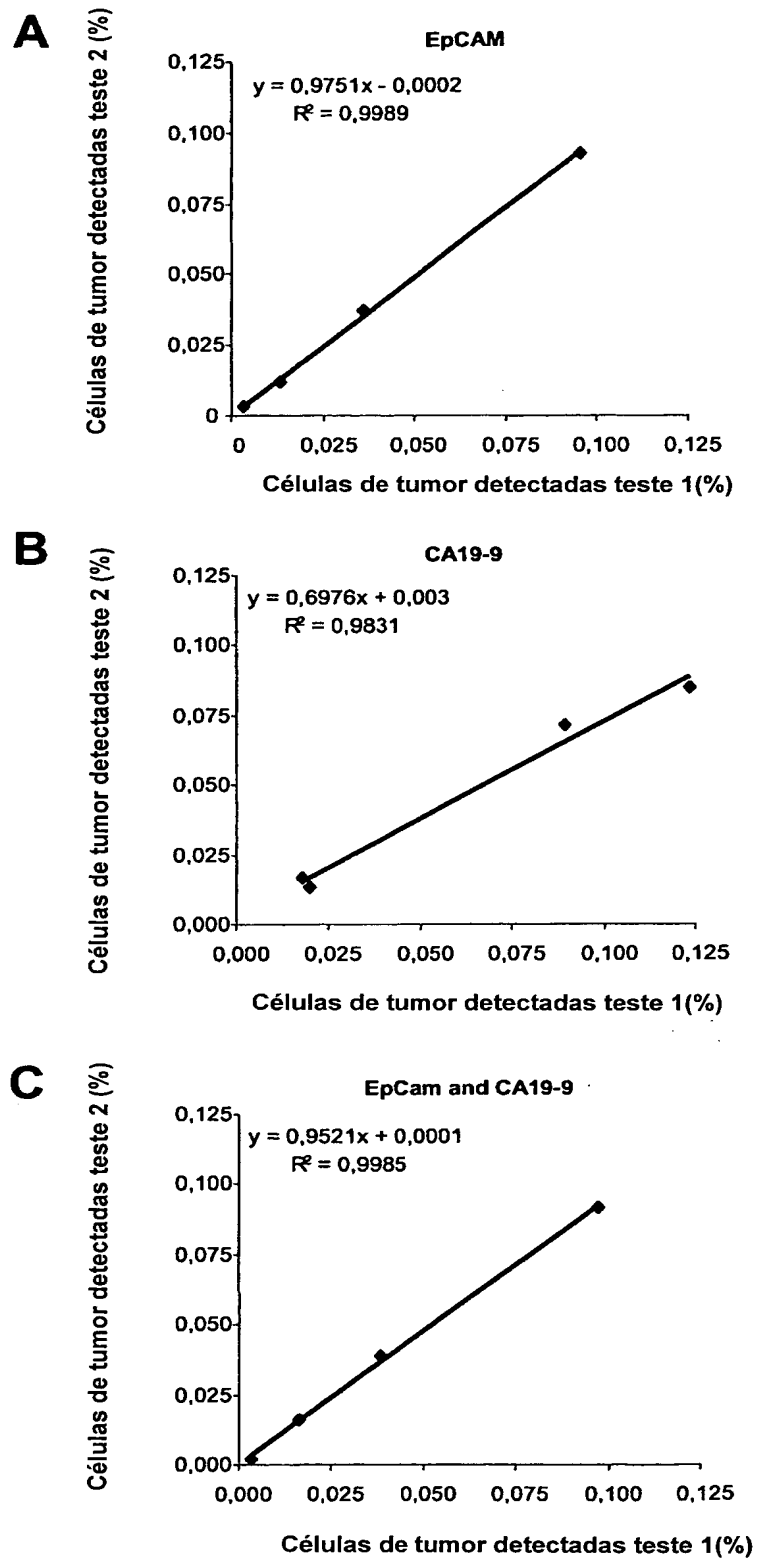


Fig. 10

**Fig. 11**

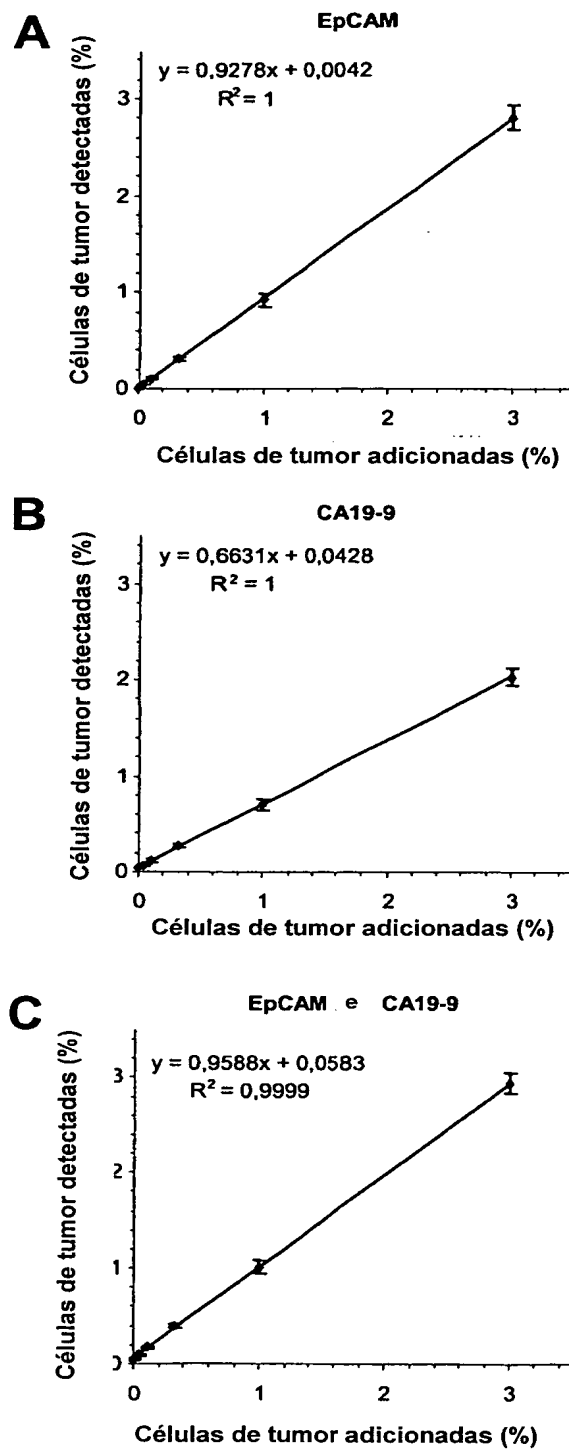


Fig. 12

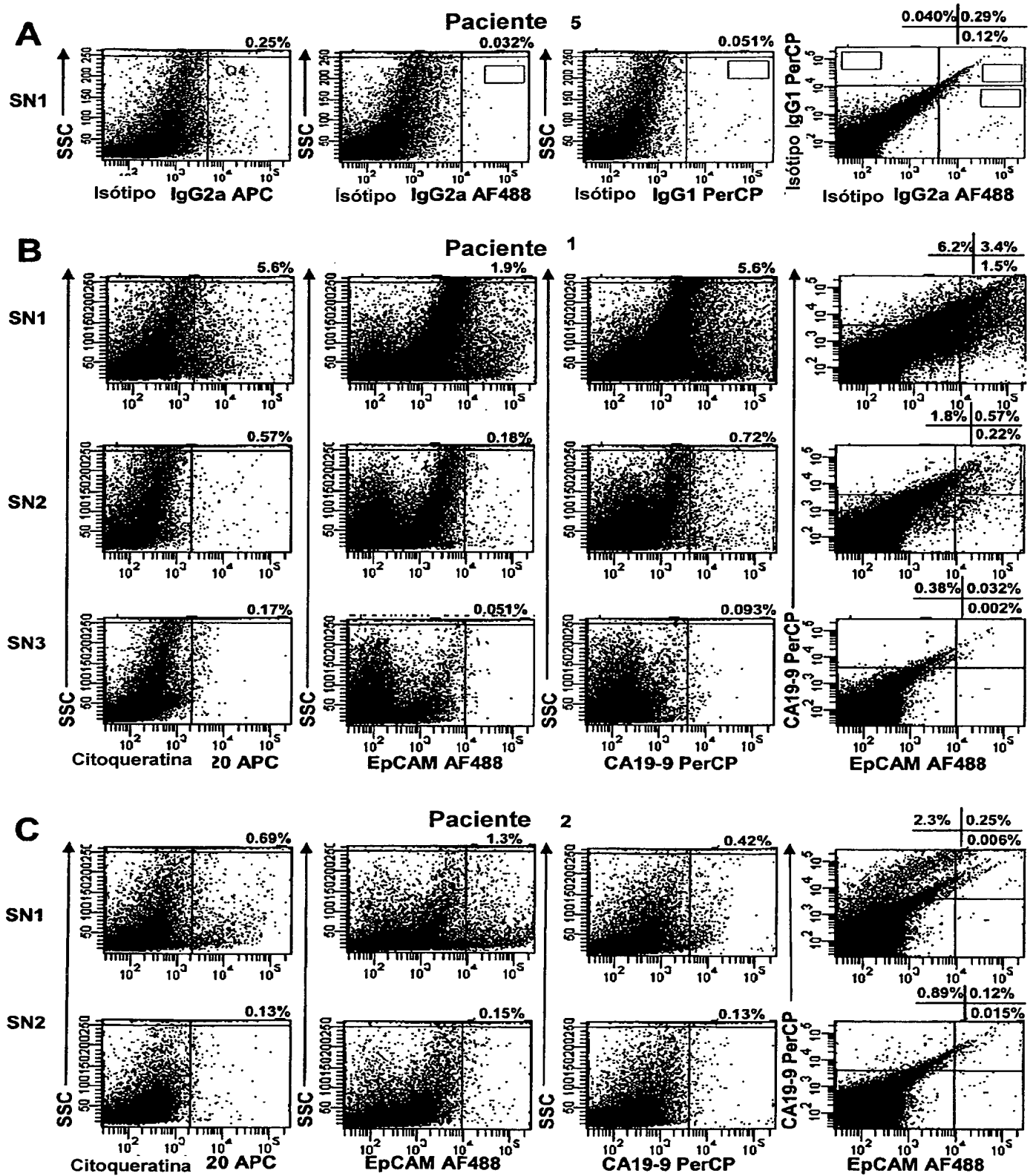


Fig. 13

RESUMO

“MÉTODO DE UMA ETAPA PARA DETECÇÃO DIRETA OU
SIMULTÂNEA DE UMA CÉLULA CANCEROSA OU ELEMENTO DE
CÉLULA CANCEROSA EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, KIT PARA USO
5 EM UM MÉTODO, BASE DE DADOS, MÉTODO PARA IDENTIFICAR
CÉLULAS CANCEROSAS, E, USO DE UMA BASE DE DADOS”

A presente invenção diz respeito à detecção pela citometria de
fluxo de uma célula cancerosa ou elemento de célula cancerosa pela ligação
de dois ou mais agentes aos marcadores extracelulares, em que pelo menos
10 um agente é específico de câncer.