

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 456**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2016** **PCT/US2016/024367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16154600**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2016** **E 16769818 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3274476**

54 Título: **Análisis digital de células tumorales circulantes en muestras de sangre**

30 Prioridad:

25.03.2015 US 201562137891 P

16.09.2015 US 201562219339 P

10.11.2015 US 201562253619 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2023

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**HABER, DANIEL A.;
KAPUR, RAVI;
TONER, MEHMET;
MAHESWARAN, SHYAMALA;
HONG, XIN;
MIYAMOTO, DAVID TOMOAKI;
TODOROVA KWAN, TANYA y
JAVOID, SARAH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 954 456 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análisis digital de células tumorales circulantes en muestras de sangre

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a técnicas de muestreo de sangre, y más particularmente a métodos para detectar y analizar células en muestras de sangre.

10 **Antecedentes**

La capacidad de detectar la presencia de células tumorales circulantes (CTC) infrecuentes usando un análisis de sangre simple, o "biopsia líquida", tiene el potencial de potenciar enormemente la supervisión de cánceres epiteliales, proporcionando muestreo instantáneo de los números de células tumorales, la composición genética y los parámetros de respuesta a fármacos, sin que se requieran biopsias invasivas de los tumores. Por tanto, la detección de CTC para detección temprana del cáncer tiene el potencial de revolucionar el tratamiento del cáncer, posibilitando el diagnóstico de cáncer invasivo en un estadio anterior a que haya metastatizado, cuando se espera tratamiento curativo.

Sin embargo, las CTC son muy infrecuentes, e identificar, visualizar y puntuar estas células tumorales mezcladas con los componentes sanguíneos normales sigue siendo un reto importante, incluso después de purificación parcial con dispositivos microfluídicos conocidos o tecnologías similares. Por ejemplo, por mililitro de sangre completa, hay solamente 1-10 CTC entre más de 5 mil millones de glóbulos rojos (RBC) y más de 5 millones de glóbulos blancos (WBC) (Plaks *et al.*, "Cancer Circulating Tumor Cells", Science, 341:1186; 2013). Además, la tinción de células tumorales con anticuerpos es muy variable, debido a la alta heterogeneidad entre las células cancerosas, incluso dentro de un paciente individual, así como el mal estado físico de muchas células tumorales que circulan en el torrente sanguíneo, de las que muchas han empezado a experimentar muerte celular programada o anoikis. Además, la puntuación precisa de las células tumorales teñidas con anticuerpo requiere diferenciación de grandes números de glóbulos blancos contaminantes, de los que algunos se unen a reactivos de anticuerpo no específicamente. Por tanto, solamente un subconjunto de células tumorales candidatas puede identificarse de forma robusta mediante tinción con anticuerpos, y tanto como la mitad de los pacientes ensayados no tienen células detectable, a pesar de tener cáncer ampliamente metastásico.

Por tanto, los protocolos actuales para imágenes de CTC están buscando niveles cada vez mayores de pureza en el aislamiento de CTC, especialmente de otros glóbulos nucleados, tales como glóbulos blancos (WBC).

Stott, SL *et al.* describen en Science Translational Medicine, vol. 2, n.º 25, 31 de marzo de 2010, en las páginas 111-120 un aislamiento y caracterización de CTC de pacientes con cáncer de próstata localizado y metastásico.

El documento WO 2011/112903 A2 describe una detección cuantitativa de genes implicados en transición epitelial mesenquimatoso en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama.

El documento WO 2009/051734 A1 describe dispositivos basados en microchip para capturar CTC.

45 **Sumario**

La presente invención se define por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan realizaciones adicionales de la invención.

La presente divulgación se refiere a métodos, usos y sistemas para obtener la mayor sensibilidad posible de datos relacionados con CTC infrecuentes en muestras convencionales de sangre, evitando al mismo tiempo la necesidad de niveles extremadamente altos de pureza de las CTC. En particular, los nuevos métodos no necesitan que las CTC estén completamente aisladas de los WBC contaminantes y, en su lugar, pueden detectar de forma fiable tan poco como una CTC en productos que contienen, por ejemplo, hasta 10 000 WBC o más. Los nuevos métodos y sistemas de ensayo combinan (1) un sistema de aislamiento que puede obtener coherentemente CTC como células completas intactas (con ácido ribonucleico (ARN) de alta calidad) de la sangre con (2) un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital en nanogotas centrado en marcadores de ácido ribonucleico ARN de linajes cancerosos específicos para cada tipo de tumor que están ausentes en la sangre de pacientes sanos.

Cuando se combinan como se describe en este documento, estos dos conceptos proporcionan un método de ensayo por PCR digital en nanogotas de CTC ("CTC ddPCR") o simplemente indicado ensayo "digital-CTC" ("d-CTC"). En algunas realizaciones, el sistema de aislamiento es un sistema microfluídico, tal como un sistema microfluídico de reducción negativa (por ejemplo, un denominado "CTC-Chip", que usa reducción negativa de células hematopoyéticas, por ejemplo, glóbulos rojos (RBC), WBC y plaquetas, para revelar las células no hematopoyéticas sin marcar tales como CTC en una muestra de sangre).

Los métodos y ensayos descritos en este documento pueden usarse para amplificar y detectar CTC en una amplia diversidad de métodos diagnósticos, pronósticos y tratanósticos.

Como se usa en este documento, la expresión "células tumorales circulantes" (CTC) se refiere a células cancerosas derivadas de tumores sólidos (cánceres no hemáticos) que están presentes en números muy infrecuentes en el torrente sanguíneo de pacientes (por ejemplo, aproximadamente 1 CTC en aproximadamente 10 000 000 WBC en sangre completa). Los CTC pueden surgir de cánceres tanto metastásicos como primarios/localizados.

Como se usa en este documento, un "producto" significa un grupo de células infrecuentes aisladas y otros glóbulos contaminantes, por ejemplo, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, leucocitos), por ejemplo, en algún tipo de líquido, por ejemplo, un tampón, tal como un tampón pluronic, que surgen del procesamiento en los métodos descritos en este documento, por ejemplo, usando los sistemas descritos en este documento. Un producto típico puede contener no solamente aproximadamente de una a diez CTC mezcladas con 500 a 2500 o más WBC, por ejemplo, de una a diez CTC en una mezcla de 1000 a 2000 WBC. Sin embargo, el límite de detección de los presentes métodos puede ser de aproximadamente 1 CTC en 10 000 WBC. Por tanto, aunque los presentes métodos pueden conseguir un nivel de pureza de aproximadamente 1 CTC en 500 WBC, los presentes métodos no requieren CTC altamente purificadas, como se requiere en algunos métodos conocidos de análisis de CTC.

Como se usa en este documento, una limpieza por inmovilización reversible en fase sólida (SPRI) es una técnica que usa microesferas magnéticas recubiertas para realizar selección por tamaño en ADNc creado por PCR con retrotranscripción (RT) de un producto. En los nuevos métodos de ensayo descritos en este documento, esto consigue el doble propósito de (a) seleccionar solamente el ADNc del tamaño correcto, y (b) eliminar los detergentes de lisis rigurosos incompatibles con la estabilidad de las nanogotas.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un proceso de amplificación de fragmentos de ADN conocidos por hibridación y rehibridación en serie de pequeños cebadores oligonucleotídicos, produciendo una señal molecular detectable.

La PCR con retrotranscripción (RT) se refiere al uso de retrotranscripción para generar una molécula de ADNc complementaria a partir de un molde de ARN, posibilitando de ese modo que la reacción en cadena de la polimerasa del ADN funcione sobre el ARN. Un aspecto importante de los nuevos métodos divulgados en este documento es la disponibilidad de ARN de alta calidad a partir de células completas CTC que no se lisan o tratan de tal manera que pudiera destruir o degradar el ARN.

Como se usa en este documento, "nanogotas positivas" son moléculas encapsuladas en líquido en que una reacción de PCR realizada con cebadores marcados permite la visualización del producto amplificado por PCR. Por tanto, una nanogota que contenga una sola molécula de ADNc de molde de un gen diana particular puede llegar a ser visible usando microscopia de fluorescencia, mientras una nanogota "vacía" o "negativa" es una que no contiene ADNc diana.

Los nuevos métodos y sistemas proporcionan numerosas ventajas y beneficios. Por ejemplo, los métodos y sistemas actuales proporcionan resultados que son bastante más precisos y robustos que cualquiera de los sistemas conocidos previos cuando se usan en solitario. Descomponiendo la señal de una sola CTC en cientos o miles de nanogotas intensamente fluorescentes, cada una derivada de una sola molécula de ADNc, los nuevos ensayos de CTC digitales posibilitan amplificación drástica de la señal. Dados los estrictos criterios en la selección y optimización de los genes biomarcadores descritos en este documento, la señal del fondo de los glóbulos normales es despreciable en d-CTC. Por tanto, d-CTC posibilita una señal enormemente amplificada de pacientes con cáncer avanzado (casi un 100 % de los pacientes con cáncer de próstata, pulmonar, mama e hígado). No solamente la fracción de pacientes con una puntuación positiva se aumenta significativamente, sino que el alto nivel de señal posibilita mediciones dinámicas según se reduce la carga tumoral después de tratamiento contra el cáncer. Además, la amplificación de la señal permite la detección de rasgos distintivos derivados de CTC incluso en pacientes con una carga tumoral muy baja (algo que no se consigue fácilmente con imágenes de células CTC), posibilitando, por tanto, una detección significativamente más temprana del cáncer.

En resumen, esta plataforma microfluídica novedosa proporciona un método mejorado, de rendimiento ultralegado, rápido (por ejemplo, 3 horas por ciclo) y de sensibilidad extremadamente alta de enriquecimiento, detección y análisis de CTC en muestras de sangre de los pacientes. La plataforma proporciona información rica, clínicamente aplicable, y con optimización adicional puede posibilitar la detección temprana del cáncer.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto entre la presente memoria descriptiva y otras referencias mencionadas en este documento, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no están destinados a ser limitantes.

Otros rasgos característicos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La figura 1A es un gráfico que muestra diluciones de ADNc preparadas a partir de ARN total de células de cáncer de próstata LNCaP, mezcladas con leucocitos y analizadas por PCR en nanogotas usando dos conjuntos diferentes de cebadores de próstata. Los resultados representan varias purezas y muestran buena respuesta de número de nanogotas positivas en este intervalo.

La figura 1B es un gráfico de células LNCaP aisladas manualmente añadidas en muestras de sangre de donador sano (HD), procesadas a través del CTC-iChip, y sometidas a RT-PCR en nanogotas (conjunto de cebadores KLK3). Los resultados muestran excelente sensibilidad hasta bajos números de células diana.

La figura 1C es un gráfico que muestra el análisis de muestras de sangre de controles sanos, pacientes con cáncer de próstata localizado (resecable) y cáncer de próstata metastásico, procesadas a través del CTC-iChip, sometidas a TA-PCR y análisis de nanogotas usando tres biomarcadores específicos de próstata y uno específico epitelial (KLK3, AMACR, FOLH1, EpCAM). Los resultados se muestran para el número total de nanogotas/ml para los cuatro marcadores combinados.

La figura 2 es un diagrama de la intensidad de la señal que muestra las nanogotas KLK3 positivas derivadas de células de cáncer de próstata LNCaP añadidas en sangre y recuperadas usando el CTC-iChip.

La figura 3 es un gráfico de barras que muestra la variación mínima entre réplicas experimentales y la retención de la señal después del procesamiento de la muestra a través del CTC-iChip y muestra sensibilidad de detección aumentada usando los nuevos ensayos descritos en este documento.

La figura 4 es un diagrama de la intensidad de la señal que muestra la ausencia de cuatro diferentes nanogotas positivas a marcador específico de cáncer en donadores sanos usando los nuevos métodos de ensayo de PCR digital en nanogotas de CTC descritos aquí (ensayo "CTC ddPCR" o simplemente ensayo "d-CTC").

La figura 5 es un diagrama de la intensidad de la señal que muestra un ensayo d-CTC combinado para cuatro transcritos específicos de linaje diferentes para detectar líneas celulares de cáncer de próstata añadidas a sangre.

Las figuras 6A a 7B son diagramas de la intensidad de la señal que muestran ensayos d-CTC combinados para cuatro diferentes transcritos específicos de cáncer de próstata por reacción. Tanto el modelo teórico (figuras 6A y 7A) como los datos de la línea celular cancerosa (figuras 6B y 7B) mostrados para dos reacciones de este tipo, reacciones 1 y 2, demuestran que el modelo teórico predice de forma precisa los datos experimentales.

Las figuras 8A a 13B son diagramas de la intensidad de la señal que muestran ensayos dCTC combinados para cuatro diferentes transcritos específicos de cáncer de mama y pulmonar por reacción. Tanto los modelos teóricos (figuras 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, y 13A) como los datos de la línea celular cancerosa (figuras 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, y 13B) mostrados para seis reacciones de este tipo, reacciones 1 a 6, cada una con diferentes combinaciones de marcadores, demuestran que el modelo teórico predice de forma precisa los datos experimentales.

La figura 14 es un gráfico de barras que muestra la señal de PCR en nanogotas para siete diferentes biomarcadores (PIP, PRAME, RND3, PKP3, FAT1, S100A2 y AGR2) a partir de 1 ng de ADNc de línea celular no amplificada y a partir de 1 µl de producto preamplificado después de 10, 14 y 18 ciclos de preamplificación por amplificación de diana específica (STA), lo que demuestra la potenciación significativa de la señal de PCR en nanogotas a partir de preamplificación por STA.

Las figuras 15A a 15C son gráficos que muestran los resultados de detección de CTC en pacientes usando los nuevos métodos de ensayo d-CTC para tres conjuntos diferentes de pacientes con cáncer pulmonar (figura 15A), cáncer de mama (figura 15B) y cáncer de próstata (figura 15C). En cada uno, los pacientes sanos no tenían CTC.

La figura 16 es un gráfico de barras horizontal que muestra los resultados de datos de pacientes con cáncer de próstata usando un método de ensayo d-CTC combinado descrito en este documento que ensaya nueve biomarcadores indicados en la figura (AGR2, Dual, FAT1, FOLH1, HOXB 13, KLK2, KLK3, STEAP2 y TMPRSS2). Un 91 por ciento de los pacientes con cáncer tenían CTC detectables (10 de 11 pacientes), 24 de 28 muestras contenían CTC detectables (86 %) y 0 de 12 (0 por ciento) de muestras de sangre de donadores sanos (HD) contenían CTC.

La figura 17 es una serie de diagramas de la intensidad de la señal que muestran ensayos d-CTC combinados para dos reacciones diferentes (reacción 1 (TMPRSS2, FAT1, KLK2 y STEAP2), columna de la izquierda y reacción 2 (KLK3, HOXB 13, AGR2 y FOLH1), columna de la derecha) para muestras de sangre de un paciente con cáncer de próstata metastásico (fila superior), un paciente con cáncer de próstata localizado (fila central) y de una muestra de control de donador sano (fila inferior). En cada caso, no había CTC en las muestras de donadores sanos (HD), pero claras evidencias de CTC en las muestras de cáncer.

La figura 18 es un gráfico de barras múltiple que ilustra la proporción relativa de genes de señalización del receptor de andrógenos en CTC medida a lo largo del tiempo para proporcionar una lectura de la respuesta al fármaco en un paciente con cáncer de próstata tratado con Abiraterona®.

Las figuras 19A y 19B son gráficos que muestran la ausencia de amplificación frente a 18 ciclos de preamplificación por SMARTer. La figura 19A es un gráfico de barras que muestra el nivel de eficacia de amplificación del amplicón para diferentes regiones diana, que es coherente entre las tres réplicas (WTA1, WTA2, WTA3). La figura 19B es un gráfico que muestra que usar 18 ciclos de preamplificación por SMARTer proporciona un aumento en la señal de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud (10^8 frente a 10^4) en comparación con una muestra no preamplificada.

Las figuras 20A a 20C son gráficos que muestran los resultados de ensayar 11 marcadores en un ensayo combinado de cáncer de hígado. Las figuras 20A a 20C muestran los números de nanogotas totales en 21 pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) (figura 20A), 13 pacientes con hepatopatía crónica (CLD) (figura 20B, sin nanogotas detectables significativas) y 15 donadores sanos (HD) (figura 20C, sin nanogotas detectables significativas).

Las figuras 21A y 21B son gráficos que muestran los resultados de un ensayo combinado de 14 marcadores de cáncer pulmonar. La figura 21A muestra los resultados de ensayo para los 8 pacientes con cáncer pulmonar metastásico y 8 donadores sanos (todos negativos). La figura 21B muestra que todos los recuentos de nanogotas por ml de sangre en los pacientes con cáncer (8 de 8) eran mayores que en todos los donadores sanos, dando una tasa de detección de un 100 % en este ensayo.

La figura 22 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de cáncer de mama para un ensayo combinado de once marcadores usado en un ámbito de 9 pacientes con cáncer de mama metastásico, 5 pacientes con cáncer de mama localizado y 15 donadores sanos. Los resultados muestran que el ensayo detecta cáncer en 7 de 9 pacientes con cáncer de mama metastásico, 2 de 5 pacientes con cáncer de mama localizado y ninguna de las muestras de donadores sanos.

Las figuras 23A y 23B son gráficos que muestran los resultados de detección de ARv7 en pacientes con cáncer de mama metastásico. La figura 23A es un gráfico de barras que muestra los resultados para muestras de 10 pacientes con cáncer de mama metastásico y 7 donadores sanos procesadas a través de CTC-Chip como se describe en este documento. La figura 23B muestra que cinco de las diez muestras de pacientes con cáncer estaban por encima del nivel de fondo de donadores sanos, dando una tasa de detección de 5 en 10, o un 50 %.

La figura 24A es un gráfico de barras que muestra la tasa de detección de marcadores individuales (PMEL, MLANA, MAGEA6, PRAME, TFAP2C y SOX10) y un cóctel de marcadores combinados (SUM) en 34 pacientes con melanoma.

La figura 24B es una distribución en gráfico de puntos de las señales de nanogotas detectadas en 34 pacientes con melanoma para 182 puntos dibujados en comparación con 15 donadores sanos, lo que demuestra una sensibilidad de detección global por encima de la señal de fondo de donadores sanos de un 81 % (en función de los puntos dibujados) y una especificidad de un 100 % (por los puntos dibujados).

Descripción detallada

La presente divulgación se refiere a métodos y sistemas para obtener información de células cancerosas en muestras de sangre. Estos métodos y sistemas combinan la potencia de las técnicas de aislamiento tales como técnicas microfluídicas de rendimiento ultraelevado, por ejemplo, técnicas de reducción negativa, por ejemplo, las que usan reducción negativa de células hematopoyéticas para aislar CTC sin marcar en una muestra de sangre, con técnicas de análisis, tales como ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital en nanogotas centrados en marcadores de ácido ribonucleico (ARN) de líneas cancerosas específicas. Esta estrategia también puede aplicarse a otras tecnologías de aislamiento de CTC que proporcionan purificación parcialmente de células (por ejemplo, filtración, selección positiva de células tumorales), aunque la calidad del ARN y, por tanto, la sensibilidad del ensayo serán inferiores a las tecnologías microfluídicas. Asimismo, otras tecnologías de PCR digital aplicadas a ARN pueden detectar cebadores específicos de linaje, aunque la sensibilidad del ensayo en nanogotas es probable que sea la máxima.

Los nuevos métodos descritos en este documento pueden usarse no solamente para detección temprana de cánceres en función de la presencia de las CTC en la sangre, pero también para la cuantificación de la carga tumoral, así como para supervisar las CTC de un tumor particular a lo largo del tiempo, por ejemplo, para determinar cualquier cambio potencial en genes marcadores tumorales específicos presentes en las CTC, así como cambios en el tumor como resultado de tratamientos específicos, por ejemplo, en el contexto de un ensayo clínico o un tratamiento particular.

Conceptos generales de los métodos de ensayo

Las técnicas de aislamiento se usan para enriquecer CTC a partir de una muestra de sangre, por ejemplo, usando microfluídica de rendimiento ultraelevado tal como el denominado "CTC-iChip" descrito en, por ejemplo, la solicitud PCT internacional WO 2015/058206 y en Ozkumur *et al.*, "Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and -Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells", *Sci. Transl. Med.*, 5:179ra47 (2013). El CTC-iChip usa una estrategia independiente de antígenos de CTC en que los WBC en la muestra de sangre se marcan con microesferas magnéticas, y la muestra entonces se procesa a través de dos fases de enriquecimiento. La primera fase usa desplazamiento lateral determinístico para retirar células/partículas pequeñas y flexibles (RBC, plaquetas, microesferas magnéticas no unidas y plasma) mientras se retienen células más grandes (CTC y WBC). La segunda fase mueve todas las células en una corriente de fluido estrecha usando centrado inercial y después usa un campo magnético para extraer los WBC marcados con microesferas de la corriente centrada, dejando CTC altamente enriquecidas. El producto CTC-iChip de 10 ml de sangre completa típicamente contiene <500 000 RBC, <5000 WBC y un número variable de CTC.

Algunas técnicas de análisis enriquecen más y analizan las CTC aisladas, por ejemplo, obtenidas del CTC-iChip, por ejemplo, usando microfluídica en nanogotas. alguna información básica sobre microfluídica en nanogotas se describe en general en Jeremy *et al.*, "Ultrahigh-Throughput Screening in Drop-Based Microfluidics for Directed Evolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107:4004 (2010).

Como se usa en este documento, las técnicas microfluídicas en nanogotas, en determinadas implementaciones, pueden incluir encapsulación de células individuales, reactivos de RT-PCR y tampón de lisis en nanogotas de típicamente líquidos no acuosos (por ejemplo, fluorocarbonos, hidrofluorocarbonos, aceite mineral, aceite siliconado y aceite hidrocarbonado; los tensioactivos también pueden incluir en el líquido no acuoso, por ejemplo, Span80, monoleína/ácido oleico, Tween20/80, SDS, n-butanol, ABIL EM90 y fosfolípidos), en el intervalo de tamaño de, por ejemplo, aproximadamente 0,5 pl a 15 nl de volumen y, por ejemplo, de 10 a 300 µm, por ejemplo, de 20 a 100 µm, por ejemplo, de 30 a 50 µm, por ejemplo, 35 µm de diámetro. Como se usa en los nuevos métodos descritos en la presente divulgación, estas técnicas incluyen además la amplificación de transcritos específicos de cáncer dentro de las nanogotas para producir una señal fluorescente, y clasificación de las gotas positivas a la amplificación. Esta estrategia provoca el aislamiento de CTC puras que pueden secuenciarse y analizarse para los propósitos de diagnóstico y tratamiento individualizado con fármacos. Debido a la alta heterogeneidad de las CTC, es útil usar amplificación combinada para detectar la mayor cantidad de CTC posible. Por tanto, en lugar de usar un par de cebadores en la mezcla de PCR, se puede aumentar la probabilidad de detección y clasificación de CTC usando una combinación de cebadores específicos de tumor. Para información adicional sobre el uso de PCR para clasificar células cancerosas, véase, por ejemplo, Eastburn *et al.*, "Identification and genetic analysis of cancer cells with PCR-activated cell sorting", *Nucleic Acids Research*, 2014, Vol. 42, n.º 16 e128.

En los nuevos métodos de ensayo, las CTC se lisan para liberar moléculas de ARN, que son representativas de los genes expresados en una célula cancerosa. La mayoría son específicos de "linaje", en lugar de específicos de cáncer, por ejemplo, cualquier célula de próstata (sea cancerosa o no) expresa estos marcadores. Sin embargo, los glóbulos normales no, y el hecho de que la señal derive de una célula en circulación en el torrente sanguíneo la define como una señal anómala. Al convertir el ARN en un ADNc, ahora se puede amplificar por PCR esta señal de linaje. Se usa PCR digital en nanogotas, que es extraordinariamente sensible, lo que permite convertir la señal de una sola célula cancerosa (es decir, una señal en un ensayo de imágenes) en miles de nanogotas inmunofluorescentes positivas. La combinación de múltiples transcritos génicos altamente seleccionados garantiza una alta sensibilidad y especificidad por cáncer, y también permite apreciaciones funcionales (como en el estado de rutas sensibles a hormonas en cánceres de próstata y mama).

Como se indica, los nuevos métodos de ensayo se centran en la detección y análisis de ARN de alta calidad en lugar de ADN. Aunque ha habido trabajo considerable sobre la detección de mutaciones de ADN en plasma y en CTC, los presentes métodos dependen de marcadores de ARN por las siguientes razones:

1. Las mutaciones de ADN no son específicas de tumor, y el descubrimiento de que un individuo sano tiene algunas células cancerosas sin identificar en la sangre es una situación clínica muy difícil. En contraste, al seleccionar ARN específicos de tumor (por ejemplo, próstata frente a pulmón), los nuevos métodos pueden identificar la fuente de las células cancerosas en la sangre.
2. Las mutaciones de ADN son muy heterogéneas y además de unas pocas mutaciones recurrentes compartidas por muchos cánceres, la mayoría de las estrategias de detección de mutaciones en la sangre requieren

conocimiento preexistente de las mutaciones presentes en el tumor primario (es decir, no apropiadas para cribar cánceres desconocidos). En contraste, todas las células tumorales derivadas de órganos específicos expresan marcadores de linaje comunes a nivel de ARN. Por tanto, se usa un solo cóctel de marcadores en los nuevos métodos para cada tipo individual de cáncer.

3. Se desprenden bajos niveles de CTC por cánceres invasivos antes de que se establezcan metástasis (es decir, no es demasiado tarde para detección en la sangre), pero la presencia de células tumorales en la sangre connota invasión vascular (es decir, cáncer invasivo en lugar de inactivo). Este no es el caso para ADN en el plasma o marcadores proteínicos en el plasma, que se filtran de células que mueren en el tumor primario, y no indican necesariamente invasión vascular. Por ejemplo, la proteína PSA sérica en la sangre se desprende tanto de células de próstata benignas como de cánceres de próstata primarios. Por otro lado, se desprenden CTC que expresan PSA solamente por cánceres de próstata invasivos.

4. El análisis de ARN usando las tecnologías novedosas de puntuación digital descritas en este documento es extraordinariamente sensible. Sin embargo, el ARN libre se degrada en el torrente sanguíneo, y el uso de sistemas de aislamiento como se describe en este documento, tales como sistemas de reducción negativa microfluídicos (por ejemplo, el sistema CTC-Chip) es único puesto que las células tumorales no marcadas tienen ARN de alta calidad que se puede extraer.

La elección de ADNc como molécula diana sobre el ADN se hizo no solamente para reforzar la señal originaria de cada célula tumoral, sino también para abordar específicamente solo transcritos de células tumorales para la exclusión de transcritos de glóbulos blancos (WBC). El refuerzo en la señal es una ventaja significativa, ya que evita la necesidad del aislamiento de CTC hasta niveles muy altos de pureza. Es decir, posibilita resultados robustos y repetibles con productos que contienen una o más CTC "aisladas" que aún están rodeadas por cientos o miles de WBC contaminantes, por ejemplo, leucocitos, en el mismo producto. No obstante, la estrategia de abordar ADNc generado a partir de ARN como se usa en los nuevos métodos permite que los nuevos métodos de ensayo estén excelentemente adaptados para una especificidad máxima con niveles mínimos de pureza de CTC en comparación con estrategias previas.

La tecnología CTC-iChip es muy eficaz en aislar células no hematopoyéticas por reducción microfluídica de leucocitos marcados con anticuerpo. Este rasgo característico del CTC-iChip proporciona ARN intacto derivado de tumor (a niveles muy por encima de los obtenidos usando otras tecnologías), y es independiente de epítomos superficiales de células tumorales (que son muy heterogéneos entre los cánceres y entre subtipos de células epiteliales frente a mesenquimatosas dentro de un cáncer individual). Además, incluso las células cancerosas preapoptóticas cuya tinción con anticuerpo y selección es subóptima para análisis de imágenes pueden proporcionar una fuente de ARN específico de tumor que pueden puntuarse usando los métodos descritos en este documento. Por todas estas razones, una tecnología o sistema de aislamiento que proporcione ARN de alta calidad a partir de CTC intactas con al menos algo de reducción en los WBC encontrados en la muestra junto con las CTC infrecuentes, tal como un sistema de reducción negativa microfluídico, por ejemplo, el CTC-iChip, es un aislamiento de primera etapa importante antes de aplicar la lectura digital específica de tumor al producto.

La detección digital en nanogotas de moléculas extremadamente infrecuentes dentro de una mezcla heterogénea se desarrolló originalmente para amplificación por PCR de moléculas de ADN individuales que están por debajo de los niveles de detección cuando están presentes dentro de una mezcla heterogénea, pero que se identifican fácilmente cuando se secuestran dentro de una nanogota lipídica antes de someterlas a PCR. La tecnología básica para PCR digital en nanogotas ("Droplet Digital PCR (ddPCR)") se ha comercializado por RainDance y Bio-Rad, que proporciona equipo para encapsulación lipídica de moléculas diana seguida de análisis por PCR. Los avances científicos importantes que hicieron esto posible incluyen el trabajo en el laboratorio de David Weitz en Harvard y Bert Vogelstein en Johns Hopkins. Por ejemplo, véanse las patentes de Estados Unidos n.º 6.767.512; 7.074.367; 8.535.889; 8.841.071; 9.074.242; y la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2014/0303005. Véase también la patente de Estados Unidos n.º 9.068.181.

Sin embargo, la propia PCR digital en nanogotas no es biológicamente significativa salvo que se acople a una fuente biológica de material, que es la clave para los nuevos métodos descritos en este documento. Por ejemplo, la detección de ARN específicos de linaje (el foco central de nuestra estrategia de detección) no distingue entre células epiteliales normales de próstata y células cancerosas de próstata. Por tanto, la detección de transcritos derivados de próstata en la sangre no es significativa: están presentes dentro de los desechos de células normales de próstata o exosomas. Es solamente cuando se acopla con el aislamiento de CTC completas (es decir, CTC intactas en la sangre) que el ensayo ddPCR consigue tanto sensibilidad como especificidad extraordinarias. Por tanto, estas dos tecnologías son idealmente adecuadas entre sí, porque los sistemas de aislamiento proporcionan ARN de alta calidad y los ensayos de PCR digital en nanogotas se centran en marcadores de ARN en los nuevos métodos.

Un aspecto adicional es importante para el éxito global de los nuevos métodos de ensayo. Como se indica, los nuevos métodos de ensayo descritos en este documento usan ADNc generado a partir de ARN total, pero la clave para este uso es la identificación de biomarcadores apropiados que sean específicos de linaje tumoral para cada tipo de cáncer, pero son tan únicos que están completamente ausentes de glóbulos normales (incluso con la sensibilidad de ddPCR).

La selección, ensayo y validación de los múltiples biomarcadores de ARN diana para cada tipo de cáncer descrito en este documento posibilitan el éxito de los nuevos métodos de ensayo.

Etapas del método de ensayo

Los nuevos métodos de ensayo empiezan con el aislamiento de CTC parcialmente puras usando un sistema de aislamiento, tal como un sistema de reducción negativa microfluídico, hasta e incluyendo el análisis de los datos de un instrumento de PCR digital en nanogotas. Hay ocho etapas principales del ensayo, de las que algunas son opcionales, aunque en general proporcionan mejores resultados:

1. aislamiento de la muestra de sangre un producto que incluya CTC y otras células presentes en la sangre; por ejemplo, de un paciente o un sujeto;
2. reducción del volumen del producto que contiene células infrecuentes (opcional);
3. aislamiento de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) del producto, por ejemplo, por lisis celular, y generar moléculas de ADNc en solución a partir del ARN aislado; por ejemplo, por RT-PCR del ARN liberado de las células contenidas en el producto;
4. limpieza del ADNc sintetizado durante la etapa de RT-PCR (opcional);
5. preamplificación del ADNc usando sondas de preamplificación dirigidas específicas de gen, por ejemplo, usando la estrategia de PCR con cebadores internos Fluidigm BioMark™, o amplificación no específica de todo el transcriptoma, por ejemplo, usando la estrategia Clontech SMARTer™ (opcional);
6. encapsulación de moléculas de ADNc en nanogotas individuales, por ejemplo, junto con reactivos de PCR;
7. amplificación de moléculas de ADNc dentro de cada una de las nanogotas en presencia de grupos indicadores configurados para unirse específicamente a ADNc de CTC y no a ADNc de otras células, por ejemplo, usando PCR;
8. detección de nanogotas que contienen los grupos indicadores (por ejemplo, nanogotas "positivas") como un indicador de la presencia de moléculas de ADNc a partir de las CTC en las nanogotas; y
9. análisis de las CTC en las nanogotas detectadas, por ejemplo, para determinar la presencia de una enfermedad particular en un paciente o sujeto.

Como se describe en más detalle a continuación, uno de los rasgos característicos importantes de los nuevos métodos de ensayo d-CTC es la selección cuidadosa de varios biomarcadores de genes diana (y los cebadores correspondientes) que aportan excelente sensibilidad, mientras se mantiene simultáneamente una especificidad casi perfecta. Se determinó una lista única de biomarcadores de genes diana descritos en este documento (**tabla 1**, a continuación) usando análisis bioinformáticos de conjuntos de datos disponibles al público y datos de CTC de secuencia de ARN patentada. Se tuvo gran cuidado en seleccionar marcadores que no se expresaran en ninguna subpoblación de leucocitos, pero se expresaran a una frecuencia e intensidad suficientemente elevadas en las CTC para proporcionar una señal fiable en una matriz razonablemente amplia de pacientes diferentes e inconfundibles. Se seleccionó un conjunto específico de marcadores para cada tipo de cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata, cáncer de mama, melanoma, cáncer pulmonar, cáncer pancreático, entre otros).

Las etapas separadas de los métodos de ensayo se describirán ahora en más detalle.

1. Aislamiento de CTC

La sangre del paciente se procesa a través del CTC-iChip, por ejemplo, versión 1.3M o 1.4.5T y se recoge una muestra en un tubo cónico de 15 ml en hielo. Se diseñaron y fabricaron CTC-iChips como se describe previamente (Ozkumur *et al.*, "Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and -Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells", Science Translational Medicine, 5(179): 179ra47 (DOI: 10.1126/scitranslmed.3005616) (2013)).

Las muestras de sangre (~20 ml por paciente con cáncer) se recogen en tubos de EDTA usando protocolos aprobados. Estas muestras entonces se incuban con anticuerpos biotinilados contra CD45 (R&D Systems) y CD66b (AbD Serotec, biotinilados en el propio laboratorio) y seguido de incubación con Dynabeads® MyOne® estreptavidina T1 (Invitrogen) para conseguir marcaje magnético de glóbulos blancos (Ozkumur *et al.*, 2013).

La muestra entonces se procesa a través del CTC-iChip, que separa los componentes de la sangre (glóbulos rojos y blancos y plaquetas), así como las microesferas no conjugadas de las CTC. Las CTC se recogen en solución mientras los glóbulos rojos, las plaquetas, las microesferas no conjugadas y los glóbulos blancos marcados se recogen en una cámara de residuos. El proceso está automatizado y se procesan 10 ml de sangre en 1 hora.

2. Reducción del volumen y almacenamiento del producto que contiene células infrecuentes

Para lisar completamente todas las células aisladas en el producto, es preferible reducir el volumen del producto desde un punto de partida típico de varios mililitros hasta un volumen final de aproximadamente 100 µl. Esto puede conseguirse, por ejemplo, centrifugando el producto, y resuspendiendo en tampón pluronic en la preparación para la lisis celular y generación de ADNc. En este punto, las muestras pueden procesarse para almacenamiento a largo plazo añadiendo RNAlater™ (ThermoFisher), seguido de congelación instantánea en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80 °C.

3. Aislamiento de ARN y generación de ADNc a partir de células en el producto

La etapa de aislamiento de ARN es importante para el proceso para liberar completamente todas las moléculas de ARN de las células en la preparación para RT-PCR. En la etapa uno, puede usarse reacción en el tubo para minimizar el riesgo de pérdida de células y ARN en la que se incurre probablemente durante etapas convencionales de transferencia. Por ejemplo, se puede usarse la Invitrogen SuperScript III® First-Strand Synthesis Supermix® para el kit de qRT-PCR, añadiendo la mezcla fundamental de RT-PCR directamente al producto sedimentado, pipeteando para lisar completamente, y realizando la reacción de acuerdo con el protocolo del kit que aborda una relación de ARN:ADNc de 1:1. Una vez se ha sintetizado el ADNc, se aplica RNasa H a la reacción para retirar cualquier ARN restante. Como alternativa, si se quiere realizar preamplificación de todo el transcriptoma de la muestra en una etapa posterior, puede sintetizarse ADNc usando el protocolo SMARTer™ Ultra Low Input RNA Kit, que usa oligonucleótidos y enzima retrotranscriptasa patentados.

4. Limpieza del ADNc sintetizado durante RT-PCR

Otra etapa útil, aunque opcional en el proceso implica la eliminación de los reactivos de lisis de la solución que contiene ADNc. La presencia de detergentes rigurosos puede dar lugar a la desestabilización de las nanogotas usadas en el método ddPCR, una vez que la solución que contiene ADNc se transfiere al instrumento de ddPCR. La eliminación del detergente puede conseguirse, por ejemplo, a través del uso de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI). Esta técnica usa microesferas magnéticas recubiertas para unir en primer lugar el ADNc de un intervalo de tamaño específico, después permite la eliminación del sobrenadante que contiene detergente, y finalmente elución del ADNc puro para introducirlo en el instrumento de ddPCR. Además de la limpieza de la RT-PCR, el proceso de SPRI también consigue una selección de tamaño de ADNc, que reduce el número de moléculas de ADNc no diana que entran en la fase de ddPCR del proceso, lo que a su vez reduce el fondo y el ruido.

5. Preamplificación

La preamplificación del ADNc es una etapa opcional que aumenta el número de moléculas de molde que pueden detectarse en la etapa de PCR en nanogotas, mejorando, por tanto, la relación de señal a ruido y reforzando la confianza en una lectura positiva. Puede ser una estrategia muy potente para la detección de marcadores que se expresan a bajos niveles en CTC, y para analizar muestras que contienen números muy pequeños de CTC posiblemente apoptóticas, tal como en el contexto de detección temprana de enfermedad premetastásica. Estas dos estrategias se han modificado para aplicarlas en el flujo de trabajo del ensayo d-CTC. La amplificación dirigida específica (STA), basada en el protocolo de PCR con cebadores internos Fluidigm BioMark™, depende del uso de cebadores diseñados específicamente para amplificar la región abordada por las sondas usadas en la etapa de PCR en nanogotas (véase la tabla 2). Estos cebadores se diseñaron cuidadosamente y se ensayaron en conjunto con sus sondas fluorescentes respectivas para garantizar la amplificación eficaz y específica sin aumento en el ruido en controles sanos. Como alternativa, la amplificación de todo el transcriptoma, basado en el protocolo del SMARTer™ Ultra Low Input RNA Kit, depende de la amplificación de cada transcrito en el producto, incluyendo los encontrados en WBC y también los encontrados en CTC, usando cebadores aleatorios.

6. Encapsulación de ADNc más reactivos de PCR en nanogotas

Una vez se ha sintetizado el ADNc y se ha purificado de detergentes contaminantes, el agregado completo de moléculas de ADNc en solución más reactivos de qPCR se divide en muchas pequeñas reacciones compartimentadas, por ejemplo, mediante un instrumento que genera nanogotas, por ejemplo, un generador de nanogotas tal como el generador de nanogotas automatizado Biorad, que genera 20 000 nanogotas por muestra. Cada reacción consiste en una nanogota extremadamente pequeña de líquido no acuoso, por ejemplo, aceite (estable en PCR, por ejemplo, formulación patentada del proveedor), que contiene reactivos de PCR de tipo Taqman con cebadores específicos de gen y una sonda oligonucleotídica, y una pequeña cantidad de muestra. Una vez completa la generación de nanogotas, la muestra consiste en una emulsión que contiene una inmensa cantidad de reacciones individuales listas para PCR.

Para esta etapa, se pueden usar las sondas de PCR y cebadores relacionados para uno cualquiera o dos o más genes diana diferentes enumerados en la tabla 1 a continuación para la determinación global de la carga tumoral, por ejemplo, para determinar la progresión del tumor o la respuesta al tratamiento, en reacciones individuales o múltiples. Por tanto, aunque en algunos casos puede incluirse un solo conjunto de cebadores de PCR y sondas para un gen

particular de la tabla 1 en cada nanogota, también es posible combinar cebadores de PCR y sondas para dos o más genes diferentes en cada nanogota usando diferentes sondas fluorescentes para cada conjunto de cebador/sonda, para maximizar la detección de células tumorales, dada la heterogeneidad de la expresión génica en CTC. También es posible combinar cebadores de PCR y sondas para múltiples genes, que abordan diferentes tipos de cáncer en cada nanogota, posibilitando, por tanto, la detección amplia, aunque específica, de múltiples tipos de tumor en un solo ensayo.

7. PCR de moléculas de ADNc encapsuladas en nanogotas

Se realiza ciclado convencional de PCR sobre la muestra en emulsión completa usando condiciones de ciclado de qPCR. La reacción se realiza hasta 45 ciclos para garantizar que la inmensa mayoría de volúmenes de PCR en nanogotas individuales se llevan al punto final. Esto es importante porque, aunque la reacción se realiza con reactivos de qPCR de tipo Taqman y se cicla en condiciones de qPCR, la intensidad fluorescente de la muestra no se medirá durante el ciclado de PCR, sino más bien en la siguiente etapa.

8. Detección de nanogotas positivas

Como cada PCR repartida individual se lleva completamente al punto final antes de realizar cualquier medición de fluorescencia, cada nanogota individual será una nanogota completamente fluorescente o contendrá casi nada de fluorescencia en absoluto. Esto posibilita la enumeración simple de todas las nanogotas positivas (fluorescentes) y negativas (no fluorescentes).

9. Análisis

Como la RT-PCR anterior está dirigida a una relación de ARN:ADNc de 1:1, cada nanogota positiva debe representar un solo transcrito ARN originario. Esta interpretación depende del número de nanogotas individuales que exceden con mucho el número de moléculas de ADNc diana. En el nuevo proceso, en un extremo consideramos la posibilidad de aislar una sola CTC y lisarla, liberando alguna cantidad de transcritos de ARN que después se retrotranscriben 1:1 en ADNc, se reparten, se amplifican por PCR y se enumeran.

Estimamos que, en el caso de un gen expresado moderadamente, tal como el gen KLK3 en células de cáncer de próstata, cada célula contiene aproximadamente 80-120 copias de ARNm de KLK3. El sistema Biorad QX200 ddPCR genera 20 000 nanogotas, lo que garantiza que para números pequeños de CTC aisladas y genes diana expresados moderadamente nunca haya más de una molécula de ADNc diana por nanogota. Por otro lado, en casos donde los números de CTC alcanzan docenas o cientos, para genes que se expresan moderadamente, probablemente habrá múltiples copias de ADNc diana por nanogota. En dichos casos, pueden estimarse números aproximados de transcrito originario usando estadística de Poisson.

Paneles génicos novedosos para posibilitar la identificación específica de linaje de CTC

Como se analiza anteriormente, la identificación de transcritos génicos que son muy específicos para células cancerosas dentro del contexto de glóbulos normales circundantes es central para los nuevos métodos. Aunque se sabe que muchos genes se expresan más elevadamente en células cancerosas, la inmensa mayoría de estos genes también tienen típicamente al menos expresión limitada en tejidos normales, incluyendo la sangre. Dada la extraordinaria sensibilidad requerida para este ensayo, la ausencia completa de señal en glóbulos normales es esencial para una identificación de alta confianza de células tumorales en el torrente sanguíneo.

En primer lugar se seleccionan transcritos candidatos específicos de tumor usados para detectar CTC en la sangre analizando conjuntos de datos de expresión génica disponibles al público derivados de cáncer de mama, próstata, pulmonar, páncreas e hígado y melanoma, así como nuestros datos de secuencia de ARN de células individuales generados en laboratorio de CTC aisladas de pacientes con cáncer de mama, próstata y pancreático y modelos de ratón de estos cánceres. Los transcritos cuya expresión está restringida a tumores y ausente o indetectable en componentes sanguíneos se eligen para análisis posterior adicional. Demostrar y validar la ausencia total de expresión (con el máximo nivel de sensibilidad, es decir, ensayos de PCR digital) en glóbulos normales es importante. En general, encontramos que solamente -10 % de los genes candidatos previstos en función de modelos computacionales o los datos de secuencia de ARN son verdaderamente negativos en muestras de sangre humana.

En particular, los transcritos candidatos de ARNm específico de tumor para la detección de CTC se identificaron inicialmente a través de los análisis de conjuntos de datos de expresión génica (micromatriz y secuencias de ARN) derivados previamente para cáncer humano de mama, próstata, pulmonar, páncreas, hepatocelular y melanoma. Los conjuntos de datos disponibles al público específicos usados para este análisis incluyen The Cancer Genome Atlas (TCGA) (The Cancer Genome Atlas, disponible en línea en tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp) y la Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (disponible en línea en broadinstitute.org/ccle/home; véase también, Barretina *et al.*, The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity, *Nature* 483:603-607 (2012)). Además, se analizaron los datos de expresión génica de secuencias de ARN de células individuales de CTC aisladas de pacientes humanos con cáncer de mama, próstata y pancreático (números de acceso GEO GSE51827,

GSE60407 y GSE67980) (Aceto *et al.*, Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis, *Cell*, 158:1110-1122 (2014); Ting *et al.*, Single-Cell RNA Sequencing Identifies Extracellular Matrix Gene Expression by Pancreatic Circulating Tumor Cells, *Cell Rep*, 8:1905-1918 (2014); y Miyamoto *et al.*, RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance, *Science* 349:1351-1356 (2015). Los transcritos específicos de tumor identificados a través de estas bases de datos entonces se compararon con los datos de expresión génica de secuencias de ARN de leucocitos humanos (números de acceso GEO GSE30811, GSE24759, GSE51808, GSE48060, GSE54514 y GSE67980). Los transcritos que presentaban expresión diferencial significativa, con alta expresión en tumores y expresión baja o indetectable en leucocitos, entonces se seleccionaron para análisis posterior adicional. Además, se realizó una investigación de la bibliografía para seleccionar transcritos candidatos adicionales específicos de tumor. Se seleccionaron entre 50 y 100 genes candidatos para cada tipo de cáncer humano.

Para cada gen candidato dentro de cada tipo de cáncer específico, se diseñaron de dos a cuatro conjuntos de cebadores de PCR para abarcar regiones por todo el transcrito diana. Los cebadores se sintetizan mediante IDT (Integrated DNA Technologies), las sondas se marcan con FAM o HEX, ZEN e IABkFQ para crear una sonda que se dirija al centro del amplicón. Los rasgos característicos únicos de nuestra metodología de diseño de cebadores de PCR necesaria para la aplicación satisfactoria de detección de transcritos de ARNm basada en PCR digital en CTC humanas incluyen los siguientes: 1) la dirección específica al extremo 3' de cada transcrito de ARNm, dada la propensión de los transcritos de ARNm celular a degradarse desde el extremo 5', particularmente en células frágiles no fijadas tales como CTC; 2) el diseño de cebadores para generar amplicones que abarcan intrones para excluir la amplificación no intencionada de ADN genómico contaminante, por ejemplo, de leucocitos contaminantes en exceso en la mezcla enriquecida de CTC; y 3) el diseño de cebadores para amplificar de forma inclusiva múltiples variantes de empalme de un gen dado, dada la incertidumbre en algunos casos con respecto a la relevancia clínica de variantes de empalme específicas.

La especificidad de los cebadores se ensayó en primer lugar por qRT-PCR usando ADNc derivado de líneas celulares cancerosas (que representan cáncer de mama, próstata, pulmonar, páncreas e hígado y melanoma). Para cada tipo de cáncer humano, se cultivaron de 2 a 5 líneas celulares cancerosas establecidas y se usaron para ensayo inicial para evaluar el rendimiento de los cebadores de PCR y analizar la expresión del transcrito diana en el cáncer específico. Para proporcionar un ensayo inicial de especificidad, se usaron los mismos cebadores para evaluar la expresión del transcrito diana en leucocitos de individuos sanos que no tienen un diagnóstico de cáncer. Se ensayaron los leucocitos de un mínimo de cinco individuos sanos diferentes en esta fase de ensayo (mezcla de individuos masculinos y femeninos, esto dependía del tipo de cáncer; es decir, los genes candidatos de cáncer de próstata y cáncer de mama requerían el uso de donadores sanos masculinos o femeninos únicamente, respectivamente).

Se aislaron los leucocitos de individuos sanos de sangre completa usando tubos de preparación celular con heparina sódica (CPT) (Becton, Dickinson, and Co., NJ) siguiendo las instrucciones de la ficha del producto. La extracción del ARN y la síntesis del ADNc de primera hebra se realizó para líneas celulares cancerosas y leucocitos aislados usando métodos convencionales. La especificidad de la expresión de cada gen (usando de 2 a 4 conjuntos distintos de cebadores para cada gen) se ensayó usando qRT-PCR (ADNc de la línea celular como controles positivos, ADNc de leucocitos de donadores sanos como controles negativos, y agua como control negativo adicional). Los transcritos presentes en líneas celulares cancerosas, pero ausentes en leucocitos en función del ensayo de qRT-PCR, se seleccionaron entonces para validación adicional por PCR digital en nanogotas. Los criterios de selección para pasar esta fase de ensayo fueron altamente rigurosos, y requerían que la señal de qRT-PCR estuviera presente en al menos una línea celular cancerosa y ausente en todas las muestras de leucocitos de donadores sanos ensayadas.

Los transcritos diana y los pares de cebadores específicos que pasaron la fase de qRT-PCR de ensayo se validaron adicionalmente usando PCR digital en nanogotas. Para esta fase de ensayo, el CTC-iChip (véase, por ejemplo, Ozkumur *et al.*, "Inertial focusing for tumor antigen-dependent and -independent sorting of rare circulating tumor cells", *Sci Transl Med*, 5, 179ra147 (2013) se usó para procesar muestras de sangre completa donadas por individuos sanos. El CTC-iChip realiza reducción negativa de glóbulos rojos, plaquetas y leucocitos de la sangre completa, y genera un producto de muestra que está enriquecido de células en la sangre que no expresan marcadores de leucocitos, incluyendo CTC (que no deben estar presentes en individuos sanos). Para cada muestra de sangre, el producto del CTC-iChip se complementó con una solución de estabilización de ARN (RNAlater®, Life Technologies) y se procesó para la extracción del ARN y la síntesis de ADNc usando métodos convencionales. La PCR digital en nanogotas (Biorad, CA) entonces se usó para cuantificar el número de transcritos presentes en cada muestra en función del par de cebadores específico que se esté ensayando. Las muestras evaluadas por PCR digital en nanogotas durante esta fase de ensayo incluían ADNc de líneas celulares cancerosas, ADNc de leucocitos de donadores sanos procesados a través del CTC-iChip (ensayándose al menos cuatro individuos sanos por par de cebadores), y agua como control negativo.

Los criterios para pasar el ensayo de PCR digital en nanogotas fueron rigurosos, e incluyeron: 1) la presencia de señal de transcrito en líneas celulares cancerosas (al menos una línea celular con >10 nanogotas positivas); 2) excelente relación de señal a ruido representada por separación de señal entre nanogotas positivas y negativas (vacías); 3) señal de nanogotas mínima o ausente en donadores sanos (<3 nanogotas por donador sano); y 4) señal de nanogotas ausente en agua (0 nanogotas positivas).

Los cebadores que amplificaban los transcritos específicamente en las líneas celulares y no en leucocitos en el ensayo de PCR digital en nanogotas anterior se sometieron entonces a ensayo detallado de la sensibilidad de la señal. Usando micromanipulación de células individuales, se añadieron números precisos de células cancerosas (1, 5, 10, 25 y 50 células) en sangre completa donada por individuos sanos, y después se procesaron a través del CTC-iChip. Cada muestra entonces se procesó como anteriormente para ensayo con PCR digital en nanogotas, y se evaluó para la sensibilidad para garantizar que la señal era suficiente para la aplicación clínica deseada.

El procedimiento riguroso anterior de evaluación de los genes candidatos y cebadores usando qRT-PCR y PCR digital en nanogotas produjo una lista de cebadores finales que consiste en aproximadamente un 10 % de la lista inicial de 50-100 genes candidatos para cada tipo de cáncer (total de aproximadamente 400 genes candidatos iniciales). Estos cebadores entonces se evalúan adicionalmente para la señal en CTC de pacientes usando muestras de sangre donadas por pacientes con cáncer que experimentan tratamiento para el cáncer en el MGH Cancer Center, recogidas según un protocolo clínico aprobado por IRB. La clave para esta parte de la evaluación es una comparación con la sangre recogida de individuos sanos sin un diagnóstico de cáncer. La siguiente **tabla 1** enumera los cebadores y sondas que se han desarrollado hasta ahora usando estos métodos para la detección específica de CTC de pacientes con cáncer de próstata, mama, hepatocelular, pancreático, pulmonar y melanoma usando PCR digital en nanogotas.

Aunque podría usarse un solo gen para cada tipo de cáncer, la presencia de múltiples genes dentro de cada panel es útil tanto para la sensibilidad (las CTC son heterogéneas incluso dentro de pacientes individuales en sus patrones de expresión) como para la especificidad (la detección de múltiple señales génicas confiere confianza añadida de que esto representa un rasgo distintivo de célula cancerosa verdadera).

La lista de genes proporcionada a continuación en la **tabla 1** incluye transcritos que son únicos para los tipos específicos de cáncer (por ejemplo, marcadores altamente específicos de cáncer de próstata o mama o hígado), así como genes que están compartidos por varios tipos de cáncer, por ejemplo, todos los tipos de cáncer epitelial (y, por tanto, pueden servir como marcadores cancerosos universales), y genes que se inducen en determinadas condiciones (por ejemplo, señalización androgénica activa en cáncer de próstata o señalización estrogénica activa en cáncer de mama). Por tanto, a cada tipo de cáncer se le asignó un panel específico de genes que está diseñado para una óptima sensibilidad, especificidad e información clínicamente aplicable para el tipo de cáncer dado.

Además, los cebadores descritos en la tabla 2 se diseñan para preamplificar algunos de los genes enumerados en la tabla 1, mientras se mantiene su alta especificidad. Si STA es un método de elección, estos cebadores internos pasan a ser componentes adicionales de cada panel de cáncer.

Lista de genes para diferentes tipos de cánceres

La siguiente tabla 1 proporciona una lista de nombres de genes (con (ID de Genbank) y números de identificación de secuencia (SEQ ID NO)), junto con tipos de cáncer para los que son selectivos (Br: mama, Lu: pulmón, Li: hígado, Pr: próstata, Panc: pancreático, Mel: melanoma). Además, se enumeran conjuntos de cebadores optimizados para cada gen (cebadores 1 y 2), junto con la composición de las sondas de cebador fluorescentes (por ejemplo, 6-FAM™ (marcador fluorescente azul) o HEX™ (marcador fluorescente verde) para sondas marcadas, e inactivador ZEN-31ABkFQ para visualización óptima del producto de PCR digital.

Tabla 1

Gen	Grupo de enfermedad	Seq ID	Cebador 2	Seq ID	Cebador 1	Seq ID	Sonda
AGR2 (10551)	Br, Lu, Li, Pr	1	CTG ACA GTT ACA GCG GAT ATC AC	2	CAG TTC AGT CTC CAG CAA CTT GAG	3	/56-FAM/ATG CTT AGC/ZEN/AAC CTG CAG ATA CAG CTC /31ABkFQ/
ALDH1A3 (220)	Br, Lu, Panc	4	GGT GCG TTT AAA ATG TCA GCA A	5	TGT CCG CAA GTT TCA TGG T	6	/56-FAM/TTT TCA CTT /ZEN/CTG TGT ATT CGG CCA AG C/31ABkFQ/
CADPS2 (93664)	Br, Li Lu, MeI	7	CTC TCG ATT TTT GGA CAT AGG AG	8	GCC TTG CAC TTC CAT TAT GAC	9	/56-FAM/TCC GAG GTG /ZEN/GTA CTG TCA TTC ACT /31ABkFQ/
CDH11 (1009)	Br, Lu, Panc	10	GAG GCG TAC ATT CTG AAC GC	11	GTG GTT CTT TCT TTT GCG TTC TC	12	/56-FAM/CAT CCT GCG /ZEN/CTG CAT CG CAT TCT /31ABkFQ/

CDH3 (1001)	Br, Li, Mel	13	GTT TCA TCC TCC CTG TGC TG	14	GCT CCT TGA TCT TCC GCT TC	15	/56-FAM/CTG CTG GTG /ZEN/CTG CTT TTC TTG GT /3-ABkFQ/
COL8A1 (1295)	Br, Lu	16	GAT GCC CCA CTC GCA GTA	17	CCT CCT AAA CTG GCT AAT GGT	18	/56-FAM/ ACT ATC CAC /ZEN/ ACC TAC CCC AAT ATA TCA AGG AAA /31ABkFQ/
EGFR (1956)	Br, Lu, Li, Panc	19	CTG CTG CCA CAA CCA GT	20	TTC ACA TCC ATC TGG TAC GTG	21	/56-FAM/CTG CCT GGT /ZEN/CTG CCG CAA ATT C/31ABkFQ/
FAT1 (2195)	Br, Lu, Li, Mel, Pr, Panc	22	GAT CCT TAT GCC ATC ACC GT	23	ATC AGC AGA CTC AAT CAG TGA G	24	/56-FAM/TCT TCT CAG /ZEN/CAG CGT TCC CCG /31ABkFQ/
FAT2 (2196)	Br, Lu	25	CCT GGA TGC TGA CAT TTC TGA	26	TCC TCC ACT CAT CTC CAA CT	27	/56-FAM/ACC TGC TAC /ZEN/ATC ACA GAG GGA GAC C/31ABkFQ/
FOLH1 (2346)	Pr	28	CAA TGT GAT AGG TAC TCT CAG AGG	29	TGT TCC AAA GCT CCT CAC AA	30	/56-FAM/ATG AAC AAC /ZEN/AGC TGC TCC ACT CTG A/G-ABkFQ/
HOXB13 (261729)	Br, Lu, Pr	31	CAG CCA GAT CTG TTG CCA	32	CTG TAC GGA ATG CGT TTC TTG	33	/56-FAM/CAG CAT TTG /ZEN/CAG ACT CCA GCG G/31ABkFQ/

KLK2 (3817)	Pr	34	GCT GTG TAC AGT CAT GGA TGG	35	GTC TTC AGG CTC AAA CAG GT	36	/56-FAM/TGG CTA TTC /ZEN/TTC TTT AGG CAA TGG GCA /31ABkFQ/
KLK3 (354)	Pr	37	GTC TGC TGG AGG CTC GA	38	GTC ATA CCT TGA AGC ACA CCA TTA C	39	/56-FAM/ AAA GCA CCT /ZEN/GCT CGG GTG ATT CT/3-ABkFQ/
LSAMP (4045)	Mel	40	CAC ATT TGA GTG AAG CTT CTC C	41	GCG GAT GTC AAA CAA CTC AAG	42	/56-FAM/TCC AAG AGC /ZEN/AAT GAA GCC ACC ACA /31ABkFQ/
MAGEA6-RM1 (4105)	Mel	43	GAA GGA GAA GAT CTG CCA GTG	44	GCT GAC TCC TCT GCT CAA G	45	/56-FAM/TTC CCC TGA /ZEN/CCA GAG TCA TCA TGC /31ABkFQ/
MET (4233)	Br, Li, Lu, Panc	46	CCA GTA GCC TGA TTC TGC AT	47	TGT CAG TGA TTC TGT TCA AGG A	48	/56-FAM/AGT CAT AGG /ZEN/AAG AGG GCA TTT TGG TTG T /31ABkFQ/
MLANA (2315)	Mel	49	ACT CTT ACA CCA CGG CTG A	50	CCA TCA AGG CTC TGT ATC CAT	51	/56-FAM/AAG ACT CCC /ZEN/AGG ATC ACT CTC AGG A/31ABkFQ/
NPYLR (4886)	Br, Lu	52	GGA TCT GAG CAG GAG AAA TAC C	53	GAA TTC TTC ATT CCC TCG AAC TGA	54	/56-FAM/ AGC AGG AGC /ZEN/GAA AAA GAC AAA TTC CAA AG/31ABkFQ/

OCLN (100506658)	Br, Lu, Li	55	<p> AAG ATG GAC AGG TAT GAC AAG C </p>	56	<p> ACT CTT TCG ACA CAG TCA GAT GC </p>	57	<p> /56-FAM/TGC AGA CAC /ZEN/ATT TTT AAC CCA CTC CTC G/31ABkFQ/ </p>
PDZRN3 (23024)	Mel	58	<p> TGT CCT GCC TGT TCA TTC TG </p>	59	<p> TGG ATC CCT ATC TCT TCC CA </p>	60	<p> /56-FAM/ AGC CCG TCC /ZEN/CTG TCC ATC TCC T/31ABkFQ/ </p>
PGR (5241)	Br	61	<p> GGC AAT TGG TTT GAG GCA A </p>	62	<p> GGA CTG GAT AAA TGT ATT CAA CCA </p>	63	<p> /56-FAM/ ACA ACA TCA /ZEN/TGC AAG TTA TCA AGA ACT TTT GTA AGT T/31ABkFQ/ </p>
PKP3 (11187)	Br, Li, Lu, Panc	64	<p> CTG GTG GAG CAG AAC GG </p>	65	<p> GGT CTC TGG ATC AAA GGT T </p>	66	<p> /56-FAM/AGT GTC CCG /ZEN/AGC AGC TCG AA/31ABkFQ/ </p>
PMEL (6490)	Mel	67	<p> CAG GCA TGG TCA GTT TCC T </p>	68	<p> ACA CAA TGG ATC TGG TGC TAA </p>	69	<p> /56-FAM/TTT GCC TGT /ZEN/GAT AGG TGC TTT GCT G/31ABkFQ/ </p>
PPL (5493)	Br, Lu, Li	70	<p> CAG GAG AGA ATC AAC AAA CTG C </p>	71	<p> AGG TTC AGG TAC TCC TTC CAG </p>	72	<p> /56-FAM/AGG AAC TCC /ZEN/ATT GAG GCG CAC AT/31ABkFQ/ </p>
RXRG (6258)	Mel	73	<p> ATA CTT CTG CTT GGT GTA GCC </p>	74	<p> AGC CAT TGT ACT CTT TAA CCC A </p>	75	<p> /56-FAM/CTC TGA GGT /ZEN/GCA GAC TCT GCG ACA /31ABkFQ/ </p>

RND3 (390)	Br, Lu, Li, Mel, Panc	76	CCG AGA ATT ACE TTC CTA CAG TC	77	CCG GAC ATT CTC ATA GTA AGG A	78	/56-FAM/ AGC GCC AGT /ZEN/TTT GAA ATC GAC ACA C/31ABkFQ/
S100A2 (6273)	Br, Lu, Li, Panc	79	CTG CCT TGC TCT CCT TCC	80	CTT ACT CAG CTT GAA CTT GTC G	81	/56-FAM/ ACC CGG TCT /ZEN/GCC ACA GAT CCA TG/31ABkFQ/
SCGB2A1 (4246)	Br	82	ACT TCC TTG ATC CCT GCC A	83	CTC TTT TCA ACC ATG TCC TCC A	84	/56-FAM/CCA TGA AGC /ZEN/TGC TGA TGG TCC TCA /31ABkFQ/
SFRP1 (6422)	Mel	85	CAA TGC CAC CGA AGC CT	86	CTT TTA TTT TCA TCC TCA GCG CAA AC	87	/56-FAM/TTT GAC AAC /ZEN/CAG TTG AAA TCT GAG GCC /31ABkFQ/
SOX10 (6663)	Mel	88	CTT GTC ACT TTC GTT CAG CAG	89	CTT CAT GGT CTG GGC TCA	90	/56-FAM/TTG TGC AGG /ZEN/TGC GGG TAC TGG /31ABkFQ/
SCHLAP1/SET4 (101669767)	Pr	91	TCC TTG GAT GAC TCTCCCTAC	92	AGA TAC CAC CTC CCT GAA GAA	93	/56-FAM/CCA ATG ATG /ZEN/AGG ACC GGG ATG CAG /31ABkFQ/
SCHLAP1 SET 5	Pr	94	AGA GGT TTA ATG GGC TCA CAG	95	CTC TGG TCT GTC GTC ATG TAA G	96	/56-FAM/ ACA TGC CTT /ZEN/TCA CCT TCT CCA CCA /31ABkFQ/

AMACR (23600)	Pr	97	CAC ACC AGC ATA CCT GGA TAA T	97	TCA CTT GAG GGC AAC AGT TC	99	/56-FAM/ AGA AAC GGA /ZEN/GGT CCA GCC AAC TTC /31ABkFQ/
AR Variante 7 /SET1 (367)	Pr	100	CTT TCT TCA GCG TCT GGT CAT T	101	CTC CTC GTC TTC GGA AAT GTC ATG	102	/56-FAM/ AAG CAG GGA /ZEN/TGA CTC TGG GAG AAA /31ABkFQ/
AR Variante 7 SETS	Pr	103	GAG GCA AGT CAG CCT TTC T	104	TGT CCA TCT TGT GGT CTT CG	105	/56-FAM/TGA AGC AGG /ZEN/CAT CAC TCT GGC AGA /31ABkFQ/
AR Variante 12 SET1	Pr	106	GCT CAC CAT CTG TGA CTT GA	107	TGG GAG AGA GAC AGC TTG TA	108	/56-FAM/TGA TTG CGA /ZEN/GAG AGC TGC ATC AGT /31ABkFQ/
AR Variante 12 SET4	Pr	109	GAA AGT CCA CGC TCA CCA T	110	GCA GGC TTG CTC TCT AGC	111	/56-FAM/TGA TTG CGA /ZEN/GAG AGC TGC ATC AGT /31ABkFQ/
UGT2815 SET1 (7366)	Pr	112	CTC TGC ACA AAC TCT TCC ATT TC	113	TTT CCT CGC CCA TTC TTA CC	114	/56-FAM/TTG GGT GGT /ZEN/TTA CAG TGA AGT CCT CC/31ABkFQ/
UGT2815 SETS	Pr	115	GGA AGG AGG GAA CAG AAA TCC	116	GTG AGC TAC TGG CTC AAC TAT T	117	/56-FAM/TGG CTA CAC /ZEN/ ATT TGA GAA GAA TGG TGG A/31ABkFQ/

AFP SET 1 (174)	Li	118	AGG AGA TCT GCT CGA TTC TC	119	TCT GCA TGA ATT ATA CAT TGA CCA C	120	/56-FAM/AA ⁺ GCT GCA /ZEN/AGC CGA CCA CGC TG/31ABkFQ/
AFP SET2	Li	121	ACT GCA GAG ATA AGT TTA GGT GAC	122	TCA CCA TTT TGC TT A CTT CCT TG	123	/56-FAM/TTG CCC AGT /ZEN/TTG TTC AAG AAC CCA C/31ABkFQ/
STEAP2 (261729)	Br, Lu, Pr, Panc	124	CAT GTT GCC TAC AGC CTC T	125	TCT CCA AAC TTC TTC CTC ATT CC	126	/56-FAM/ACA TGG err /ZEN/ATC AGC AGG TTC A ⁻ G CA/31ABkFQ/
TEAD3 (7005)	Br, Lu, Li	127	GAA GAT CAT CCT GTC AGA CGA G	128	CTT CCG AGC TAG AAC CTG TAT G	129	/56-FAM/ AGC GTG CAA /ZEN/TCA ACT CAT T ⁻ TC GGC /31ABkFQ/
TFAP2C (7022)	Br, Lu, Mel	130	CAT CAG ACA GTC ATT CGC AAA G	131	GAC AAT CTT CCA GGG ACT GAC	132	/56-FAM/ ACA GGG CAG /ZEN/CTT CAG AGG GTT CTT /31ABkFQ/
TMPRSS2 (7113)	Pr	133	CCC AAC CCA GGC ATG AUG	134	TCA AUG ACA AGC ACC T ⁻ CG GC	135	/56-FAM/ ACC CGG AAA /ZEN/TCC AGC AGA GCT /31ABkFQ/
GPC3 (2719)	Li	136	TGC TGG AA T GCA CAA GAA CTC	137	GCT CAT GCA GAT TGA ACT GAT	138	/56-FAM/TCC TTG CTG /ZEN/CCT TTC GGC TGT ATC T/31ABkFQ/

ALB (219)	Li	139	CTT ACT GCC GTT TTC TCA TGC	140	CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AG	141	/ 56-PAM/ ACA TTT GCT /ZEN/GCC CAC TTT CCTAG GT/31ABKQ/
G6PC SET 1 (2538)	Li	142	GGA CCA GGG AAA GAT AAA GCC	143	CCA AGG TAG ATT CGT GAC AGA	144	/56-PAM/ACA GCC CAG /ZEN/AAAT CCC AGC CAC AAA /31ABKQ/
G6PC SET2	Li	145	CAT TTT GTG GTT GGG ATT CTG G	146	GAT GCT GTG GAT GTG GCT	147	/ 56-PAM/CTG TCA CGA /ZEN/ATC TAC CTT GCT GCT CA/ 3-ABKQ/
PRAME (23532)	Mel	148	GCC TTG CAC TTC CAT TAT GAC	149	CTC TGC ATT m GGA CAT AGG AG	150	/56-PAM/CAA GGG TTG /ZEN/GAG GTC C.G AGG C/31ABKQ/
AHSG (197)	Li	151	ATG TGG AGT TTA CAG TGT CTG G	152	AGC TTC TCA CTG AGT GTT GC	153	/56-PAM/CCA CAG AGG /ZEN/CAG CCA AGT G.A ACC /3-ABKQ/
GPR143 (4935)	Mel	154	ACG GCT CCC ATC CTC CT	155	CCA CTA TGT CAC CAT GTA CCT G	156	/56-PAM/TTC GCC AGC /ZEN/ AGA ACC AGC AGC /31ABKQ/
PTPRZ1 (5803)	Mel	157	TGC TCT GAC AAC CCT TAT GC	158	GGC TGA GGA TCA CTT TGT AGA	159	56-PAM/ AGG CCA GGA /ZEN/GTC TTT GCT CAC ATT /3-ABKQ/

MUCL1 (118430)	Br	160	CAG CAG CAG GAG CAG TAG C	161	TGT CTG TGC TCC CTG ATC T	162	/56-PNM/ACT CTC AGG/ZEN/ACT ACC AGG ACT GCT /31BPFQ/
PIP (5304)	Br	163	TCA TTT GGA CGT ACT GAG TTG G	164	CTT GCT CCA GCT CCT GGT C	165	/5HEX/CCT GGT CCT/ZEN/GGT TCT CTG CCT G/31BPFQ/
PGR (5241)	Br	166	GGT GTC TGG TCT AGG ATG GAG	167	ACT GGG TTT GAC TTC GTA CC	168	/56-PNM/ACT GGG CAG/ZEN/ALG CTC TAT TTT CCA C/5-ABPFQ/
TFAP2C (7022)	Br, Lu	169	GTC ACT CTC CTC ACA TCC TTA G	170	CCA TCT CAT TTC CTC CTC CAA	171	/56-PNM/TTT GGC TTC/ZEN/ACA GAC ATA GGC AAA G/31BPFQ/
SCGB2A1 (4246)	Br	172	ACT CTG AAA AAC TTT GGA CTG ATG	173	TCG ACC AAT CAA CAG ATG ACT TCC	174	/56-PNM/TAG CCC TCT /ZEN/GAG CCA AAC GGC /31BPFQ/
FAT1 (2195)	Br, Lu, Pr	175	AGC TCC TTC CAG TCC GAA T	176	GTC TGC TCA TCA AIC ACC TCA	177	/56-PNM/ATC CCA GTG/ZEN/ATA CCC ATT CTC ATC GC/31BPFQ/
FAT2 (2196)	Br, Lu, Pr	178	GGA CAG AGA GAA CAA GGA TGA AC	179	TGT GGG ACA ATA TIG CTC GAT TG	180	/56-PNM/TGS AGG TCA/ZEN/CTG TGC TGG ACA ATG /31BPFQ/

RND3 (390)	Br, Lu	181	GCT TGC ACA TCA CTA GAC CAG AG	182	CTC TCC GCA GAT CAG ACT TG	183	/56-FRM/ACA GTG TCC ZEN/TCA AAA ACT GGA AAC CCG A/31ABKQ/
SETPB (6439)	Lu	184	CCG GGA ATA TCG CCT CCG T	185	CAT TGC CTA CAG GAA GTC TGG	186	/56-FRM/CCG ATG ACC ZEN/TAT GCC AAG ACT GTC AG/31ABKQ/
SCGB3A2 (117156)	Lu	187	CCA CAG GTA AAG GTG CCA AC	188	TCC CAG ATA ACT GTC ATG AAG C	189	/56-FRM/AAG GCA CTA ZEN/GCA CAG TAA CTA CAA AGG C/31ABKQ/
SERPINA3 (12)	Br, Lu	190	CCG CAA ATA CAT CAA GCA CAG C	191	GGA AGC CTT CAC CAG CAA	192	/56-FRM/TAG CAG TCT ZEN/CCC AGG TGG TCC A/31ABKQ/
SFRP2 (6423)	Br, Lu	193	TTG CAG GCT TCA CAT ACC TT	194	GCC CGA CAT GCT TGA GT	195	/56-FRM/TTT CCC CTA ZEN/GCA CAA CGA CTT TT /31ABKQ/
CRABP2 (1382)	Br, Lu	196	CTC TTC CAG CCA TTC CTC TT	197	CCC TTA CCC CAG TCA CTT CT	198	/56-FRM/TTT CTT TGA ZEN/CGT CTT CTC TCC TCC CTT /3-ABKQ/
AQP4 (361)	Lu	199	TGG ACA GAA GAT ATA CTC ATA AAG G	200	GGT GCC AGC ATG AAT CCC	201	/56-FRM/CCG ATC CTT ZEN/TGG ACC TGC ACT TAT CA/31ABKQ/

TMFRSS4 (56649)	Br, Lu	202	ATC TTC CCT CCA TTC TGC TTC	203	CAG TTC CCA CTC ACT TTC TCA G	204	/56-FRM/CTC ACT CCA/ZEN/GCC ACC CCA CTC /31BRFQ/
GREM1 (26585)	Lu	205	TTT TGC ACC AGT CTC CCT T	206	GCC GCA CTG ACA GHA TGA G	207	/56-FRM/CCT ACA CGG/ZEN/TGC GAG CCC TG/31BRFQ/
FOXF1 (2294)	Lu	208	CGA CTG CGA GTG ATA CCG	209	CTC TCC ACG CAC TCC CT	210	/56-FRM/CTG CAC CAG/ZEN/AMC AGC CAC AAC G/31BRFQ/
NKX2-1 (7080)	Lu	211	TGC CGC TCA TGT TCA TGC	212	CAG GAC ACC ATG AGG AMC AG	213	/56-FRM/GCC GCC ATC/ZEN/TCC CGC TTC A/31BRFQ/
NKX2-1 (7080)	Lu	214	AAG ATG TCA GAC ACT GAG AAC G	215	CGA AGC CCG ATG TGG TC	216	/56-FRM/ATG TCG ATC/ZEN/AGT CCA AAG CAC ACG A/31BRFQ/
AFP (174)	Li	217	AGGATGTGCTGGATTGTC	218	TCGATCATTAATATACATTGAC CAC	219	/56-FRM/ATG GCT CCA/ZEN/AMC TGA CCA CGC TG/31BRFQ/
AHSG (197)	Li	220	ATGTGGAGTTTACAGTGCTG	221	AGCTTCTCACTGAGTGTTC	222	/56-FRM/CCA CAG AGG/ZEN/CAC CCA AGT GTA ACC/31BRFQ/

ALB (213)	Li	223	GAG ATC TGC TTG AAT GTG CTG	224	CAA CAG AGG TTT TTC ACA GCA T	225	/56-PAM/ACA TAT ACT/ZEN/TCG CAA GGT CCG CCC/3TARFQ/
ALB (213)	Li	226	CAT GGT AGG CTG ACA TCC TTT	227	GAC GAT AAG GAG ACC TCC TTT C	228	/56-PAM/ACT TGT TCC/ZEN/TCG AAG TCA AGC TCC/3TARFQ/
ALB (213)	Li	229	GCG CAT TCT GGA AAT TGT ACC C	230	GC ATG CCA AAG TGT TCG ATC	231	/56-PAM/ACC TCT TGT/ZEN/GGA AGA GGC TCA GAA/3TARFQ/
APOH (350)	Li	232	TGA TGG ATA TTC TC- GGA TGG C	233	CCT GAA TCT TTA CTC TCT CTC CTT G	234	/56-PAM/GCA GTT TCC/ZEN/CAG TTT GGT ACA TTC TAT TTC TTC C/3TARFQ/
FABP1 (2168)	Li	235	GCA CTT CAA GTT CAC CAT CAC	236	ACC AGT TTA TTG TCA CCT TCC A	237	/56-PAM/ABC CAC TCC/ZEN/CTT GAC TTT CTC CCC IG/3TARFQ/
FGB (2244)	Li	238	ACA TCT AAT AAT GGT ACT ATC GTG TGT T	239	TGG GAG CCT CTT CTC TCT TC	240	/56-PAM/ACC CTC CTC/ZEN/AAT GTC GTT GAC ACC/3TARFQ/
FGG (2266)	Li	241	TTC AAT TGA TAA GTA CAC ACC CTG	242	ACC TTG AAC AAG GCA TAG TCC C	243	/56-PAM/TCC CAT TCC/ZEN/ACT CTT CCA GTT CCA C/3TARFQ/

GPC3 (2719)	Li	244	AATCAGCTCGGCTTCCTTG	245	TGCTTATCTCGTTGTCTCCTCG	246	/56-FW/TTC CAG GCG/ZEN/CAT CAT CCA CAT CG/318kFQ/
RBP4 (5950)	Li	247	CAG AAG CGC AGA AGA TTG TAA C	248	TCT TTC TGA TCT GCC ATC GC	249	/56-FW/AGG CTG ATC/ZEN/CTC CAC AAC GGT T/318kFQ/
TF (7018)	Li	250	AGA AGC GAG TCC GAC TGT	251	CAC TGC ACA CCA TCT CAC A	252	/56-FW/CCA GAC ACA/ZEN/GCC CCA GCA CG/318kFQ/

Obsérvese que PRAME también se denomina MAPE (antígeno de melanoma expresado preferentemente en tumores), OIP4 (proteína OIP4 de interacción con Opa), y CT130 (antígeno 130 de cáncer/testículo).

5 La siguiente tabla 2 enumera cebadores internos diseñados para preamplificar específicamente las regiones abordadas por los cebadores enumerados en la tabla 1

Tabla 2

Nombre del cebador	Seq ID	Directo interno	Seq ID	Inverso interno
FAT1	253	CAG ATG GAG GAG GAA GAT TCT G	254	GTA TAG TGC CTG GAG TTC TCT G
FAT2	255	CTG GTT CAG GTC TCC ATT ACA G	256	GCT GTG ACT CTG AGC AAG TA
AGR2	257	TGT CCT CCT CAA TCT GGT TTA TG	258	GAC AGA AGG GCT TGG AGA TTT
PKP3	259	CGG TGG CGT TGT AGA AGA T	260	AGA AGA TCT CTG CCT CCG A
RND3	261	CAA GAT AGT TGT GGT GGG AGA C	262	AGG GTC TCT GGT CTA CTG ATG
TFAP2C	263	TTTGGATTTACCGCTTGGG	264	GACTCCAGTGTGGGAGAG
S100A2	265	GGG CCC ACA TAT AAA TCC TCA C	266	CTG CTG GTC ACT GTT CTC ATC
FRAME	267	CTTCGCGGTGTGGTGAA	268	GCTGTGTCTCCCGTCAAA
PIP	269	CTG GGA CAC ATT GCC TTC T	270	CCA CCA TGC ATT CTT TCA ATT CT
PGR	271	AAA CCC AGT TTG AGG AGA TGA G	272	CCC TGC CAA TAT CTT GGG TAA T
SCGB2A1	273	ACA GCA ACT TCC TTG ATC CC	274	GCG GCA TCA CTG TCT ATG AA
MUCL1	275	CCT TGC CTT CTC TTA GGC TTT	276	AGC AGT GGT TTC AGC ATG A
PGR	277	CAG ATA ACT CTC ATT CAG TAT TCT TGG	278	CTC TAA TGT AGC TTG ACC TCA TCT
TFAP2C	279	GAG AAG TTG GAC AAG ATT GGG	280	GCT GAG AAG TTC TGT GAA TTC TTT A
SCGB2A1	281	GTT TCC TCA ACC AGT CAC ATA GA	282	AGT TGT CTA GCA GTT TCC ACA TA
FAT1	283	GGG AAA GCC TGT CTG AAG TG	284	TCG TAG CCT CCA GGG TAA TAG
FAT2	285	GTT ACA GGT CTC CTA TCT ACA GC	286	GCT CAG CCT CTC TGG AAG
RND3	287	CTC TCT TAC CCT GAT TCG GAT G	288	GGC GTC TGC CTG TGA TT
SFTPB	289	CCT GAG TTC TGG TGC CAA AG	290	GGG CAT GAG CAG CTT CAA
SCGB3A2	291	CCA CTG GCT TGG TGG ATT T	292	TCA ACA GAA ATG CCC AGA GTT
SERPINA3	293	CTT CTC CAG CTG GGC ATT	294	TGC TGT GGC AGC AGA TG
SFRP2	295	CGG TCA TGT CCG CCT TC	296	GCG TTT CCA TTA TGT CGT TGT C

CRABP2	297	CCC TCC TTC TAG GAT AGC G	298	AAC CCG GAA TGG GTG AT
AQP4	299	AAACGGACTGATGTCACTGG	300	TGGACAGAAGACATACTCATAAAGG
TMPRSS4	301	CCCACTGCTTCAGGAAACATA	302	GTCAGACATCTTCCCTCCA TTC
GREM1	303	GCCGCACTGACAGTATGA	304	CAGAAGGAGCAGGACTGAAA
FOXF1	305	AGC GGC GCC TCT TAT ATC	306	GCG TTG AAA GAG AAG ACA AAC T
NKX2-1	307	CTA CTG CAA CGG CAA CCT	308	GGG CCA TGT TCT TGC TCA
NKX2-1	309	CAG ACT CGC TCG CTC ATT T	310	CCT CCA TGC CCA CTT TCT T
PIP	311	CCCAAGTCAGTACGTCCAAAT	312	GCCTAATTCCCGAATAACATCAAC
AGR2	313	GCT TTA AAG AAA GTG TTT GCT G	314	CTG TAT CTG CAG GTT CGT AAG
SOX10	315	AAG TTC CCC GTG TGC ATC	316	CTC AGC CTC CTC GAT GAA
MAGEA6	317	GTGAGGAGGCAAGGTTCTG	318	GGCTCCAGAGAGGGTAGTT
TFAP2C	319	TTTGGATTTACCGCTTGGG	320	GACTCCAGTGTGGGAGAG
FRAME	321	CTTCGCGGTGTGGTGAA	322	GCTGTGTCTCCCGTCAAA
GPR143	323	ATC CTG CTG TAT CAC ATC ATG	324	CTG ACA GGT TTC AAA GAA CCT
PMEL	325	CCAGTGCCTTTGGTTGCT	326	CAAGAGCCAGATGGGCAAG
MLANA	327	TGCCAAGAGAAGATGCTCAC	328	CATTGAGTGCCAACATGAAGAC
PTPRZ1	329	AAG AAG CTG CCA ATA GGG AT	330	TGT CCA GAG AGG TGG ATG

Análisis digital combinado de transcritos génicos de producto de CTC-Chip

Para mejorar la detección de ARNm específico de tumor a partir de cantidades mínimas de ARN derivado de CTC, se estableció un ensayo combinado que puede ensayar muchos transcritos génicos diferentes a partir de una cantidad diminuta de producto de CTC-Chip. Esto combina la mayor sensibilidad/especificidad del uso de múltiples genes independientes, con el hecho de que la cantidad de molde introducido es limitada (y, por tanto, no debe diluirse en múltiples reacciones). Nuestro ensayo incluye 4 genes por reacción, resolviéndose cada gen de forma exclusiva en el espacio bidimensional al seleccionar diferentes relaciones de cebadores conjugados fluorescentes. Por tanto, en una sola reacción, podemos medir independientemente 4 transcritos génicos sin tener que diluir el molde. Para diferentes cánceres, hemos ido más allá de 4 reacciones diferentes (es decir, hasta 20 transcritos génicos diferentes), y con la aplicación de ensayos de RT-PCR digital con cebadores internos, no hay límite al número de reacciones que pueden realizarse.

Esta estrategia combinada consigue el equilibrio ideal entre analizar múltiples transcritos (y, por tanto, impedir la variación heterogénea en los patrones de expresión de células cancerosas), pero sin diluir el material introducido al realizar múltiples reacciones de PCR independientes. Dependiendo de los tipos de tumor y el número de genes requeridos para una señal óptima, hemos desarrollado ensayos que varían de 2-4 reacciones combinadas (cada reacción combinada ensaya 4 genes). Por tanto, sin dilución indebida del molde introducido, podemos examinar el producto de una sola CTC para la expresión en cualquier parte de 8 a 16 diferentes genes. Es importante para el ensayo poder añadir la señal procedente de todos estos genes (es decir, señal acumulativa), mientras también se obtienen resultados de genes individuales (para optimizar la señal/ruido a nivel de gen individual, y también reunir información de rutas de señalización específicas que cada gen examina, por ejemplo, señalización androgénica en CTC de próstata).

Para presentar los resultados de la reacción combinada en una sola vista (y, por tanto, diferenciar la amplificación de cada gen en aislamiento), variamos las concentraciones de las dos sondas fluorescentes (FAM (azul) y HEX (verde)). Al hacer esto, cada reacción de amplificación génica individual tiene una combinación única de señal de FAM/HEX que refleja la composición de los cebadores específicos de gen y, por tanto, identifica el producto de PCR específico de gen. En el espacio bidimensional, podemos ilustrar la posición de la señal de 4 productos de amplificación génica diferentes producidos a partir de una sola reacción combinada. Aplicado a PCR digital usando nanogotas para encapsular cada reacción de PCR, este método separa las dianas en grupos individuales al modificar la amplitud de la señal binaria de nanogotas positivas, que se presenta cuantitativamente. Como se ha previsto, este método permite tanto la puntuación acumulativa de la señal total para múltiples genes (por ejemplo, 16 marcadores en un total de 4 reacciones), mientras también se retiene la capacidad de cuantificar la señal de cada diana génica individual.

Se detallan resultados específicos de ensayo en los ejemplos a continuación.

Aplicaciones de los métodos de ensayo d-CTC

La detección temprana de cánceres epiteliales en el momento en que pueden resecarse quirúrgicamente o irradiarse proporciona la mejor oportunidad de cura, y la administración de quimioterapia posquirúrgica en el entorno de diseminación mínima del cáncer es mucho más eficaz para conseguir la cura que el tratamiento de enfermedad metastásica establecida. Sin embargo, los esfuerzos actuales en la detección temprana del cáncer carecen de especificidad. Por ejemplo, el cribado generalizado de hombres para cáncer de próstata, usando mediciones de PSA en suero es eficaz en descubrir cánceres tempranos, pero también identifica un número mucho más grande de afecciones de próstata no malignas (por ejemplo, hipertrofia benigna de la glándula) o incluso cánceres que son inactivos y en ningún momento predestinados a ser invasivos. Por tanto, el cribado amplio de PSA no está recomendado por las organizaciones de salud públicas, porque el número de complicaciones (incluyendo muertes) del sobrediagnóstico igual o incluso supera el beneficio calculado de la detección temprana del cáncer.

Para otros cánceres, tales como cáncer de mama, la mamografía se considera eficaz, pero incluso así, se realiza un gran número de biopsias de mama para diagnosticar cada neoplasia maligna verdadera. Para cáncer pulmonar, el TAC de baja dosis recientemente recomendado de individuos con un historial de tabaquismo abundante también es probable que detecte cientos de anomalías radiográficas benignas por cada neoplasia maligna verdadera.

Es en este contexto que la adición de una lectura ultrasensible en sangre para la presencia de rasgos distintivos derivados de células cancerosas proporcionaría la especificidad requerida. Los ensayos d-CTC descritos en este documento pueden usarse tanto para cribado inicial como para una confirmación de cribados anteriores en un momento posterior. Por ejemplo, en algunos casos, los ensayos pueden usarse como ensayo de segunda línea para validar un ensayo de cribado altamente sensible, pero inespecífico (por ejemplo, PSA en cáncer de próstata). En otros entornos para los que un cáncer es altamente mortal, pero no existe actualmente estrategia de cribado (por ejemplo, cáncer pancreático), el cribado periódico rutinario en sangre usando los ensayos descritos en este documento, puede llegar a ser la norma para supervisar el estado o afección de un paciente a lo largo del tiempo.

Las nuevas lecturas de d-CTC también son muy relevantes para la supervisión en serie de pacientes, por ejemplo, pacientes aparentemente sanos con un historial familiar y/o marcadores genéticos de un tipo específico de cáncer, o pacientes con cáncer avanzado o metastásico. Tomar imágenes de las CTC es caro y relativamente insensible, porque las células intactas que se tiñen apropiadamente para todos los marcadores requeridos producen una sola señal. El uso de los nuevos ensayos d-CTC descritos en este documento, en que cada CTC (sin importar si están intactas o preapoptóticas) puede dar lugar a cientos de señales moleculares, potencia drásticamente la capacidad de detectar y supervisar las CTC en pacientes con cáncer conocido, y para supervisar cuantitativamente y analizar su respuesta a intervenciones terapéuticas. Más allá de puntuar los números de células a través de marcadores moleculares, puede conseguirse examen específico de las mutaciones o reordenamientos asociados a cáncer (por ejemplo, EML4-ALK en cáncer pulmonar) con sensibilidad comparable.

Además de proporcionar una medida digital (cuantitativa) de las CTC presentes dentro de una muestra de sangre, el nuevo ensayo d-CTC también permite el análisis de rutas de señalización específicas que son únicas para las células tumorales en la sangre. Por ejemplo, un subconjunto de genes específicos de linaje de próstata se activan por señalización androgénica (tal como PSA), mientras que otro subconjunto se reprime por señalización androgénica (tal como PSMA). Al analizar estos genes conjuntamente, podemos averiguar el estado de señalización androgénica dentro de las CTC. Asimismo, en cáncer de mama, la expresión de genes sensibles a estrógenos (tal como el receptor de progesterona) proporciona una medida del estado de la ruta sensible a estrógenos dentro de las CTC. Estas mediciones son particularmente importantes porque las intervenciones terapéuticas tanto en cáncer de próstata como de mama derivan de abordar los receptores de andrógenos y estrógenos, respectivamente. Por tanto, definir el número total de señal de CTC en la sangre, simultáneamente con información sobre la eficacia del agente terapéutico de abordar e inactivar la ruta crucial es importante para la supervisión terapéutica.

Como se analiza en los ejemplos a continuación, los nuevos métodos descritos en este documento se ilustran en cáncer de próstata, donde el agente antiandrogénico abiraterona (por ejemplo, ZYTIGA®) es eficaz en suprimir la progresión del cáncer, particularmente en tumores que aún son dependientes de la ruta androgénica.

Ejemplos

La invención se describe además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplo 1 - Ensayo preliminar y validación del ensayo CTC digital

Para ensayar la viabilidad del ensayo CTC-Chip en nanogotas, en primer lugar se seleccionaron varios transcritos que se expresan específicamente en células tumorales de próstata, pero están ausentes en leucocitos contaminantes. Estos fueron los marcadores específicos de linaje de próstata KLK3 (peptidasa relacionada calicreína; anteriormente

conocida como antígeno específico de próstata, o PSA), FOLH1 (folato hidrolasa; anteriormente conocido como antígeno de membrana específico de próstata, o PSMA) y AMACR (alfa-metilacil-CoA racemasa), así como EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial). Las condiciones de PCR se optimizaron usando cebadores que abarcan los intrones y sondas marcadas con FAM inactivadas doblemente con ZEN de Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa) siguiendo protocolos convencionales de qPCR. Estas condiciones se ensayaron en primer lugar con ADNc encapsulado de mezclas de células cancerosas y leucocitos para explorar el intervalo dinámico del sistema. Después, usando técnicas de aislamiento manuales para seleccionar individualmente las células, se añadieron progresivamente 0, 3, 6, 12, 25 y 125 células de cáncer de próstata LNCaP en alícuotas de 5 ml individuales de sangre HD, seguido de procesamiento CTC-iChip, RT-PCR y encapsulación en nanogotas usando el sistema RainDrop. Elegimos KLK3 como transcrito diana para este experimento ya que se prevé que es moderadamente abundante. Usando un umbral de intensidad de 5000, encontramos que tan poco como 3 células por valor de transcrito de KLK3 se detectaban fácilmente en aproximadamente 250 nanogotas.

En función de estos datos preliminares, se ensayó el ensayo CTC-Chip en nanogotas en pacientes con cáncer de próstata metastásico y localizado frente a controles sanos. Cada muestra se procesó a través del iChip, entonces el producto que contenía CTC se procesó a través de RT-PCR en nanogotas usando los cuatro marcadores de próstata mencionados anteriormente: KLK3, AMACR, FOLH1 y EpCAM. Los pacientes con cáncer de próstata local o metastásico produjeron significativamente mayores recuentos de nanogotas positivas en comparación con los controles HD.

La figura 1A muestra diluciones de ADNc preparadas a partir de ARN total de células de cáncer de próstata LNCaP, mezcladas con leucocitos y analizadas por PCR en nanogotas usando dos conjuntos diferentes de cebadores de próstata. Los resultados representan varias puridades y muestran buena respuesta de número de nanogotas positivas en este intervalo.

La figura 1B muestra células LNCaP aisladas manualmente añadidas en muestras de sangre de HD, procesadas a través del iChip, y sometidas a RT-PCR en nanogotas (conjunto de cebadores KLK3). Los resultados muestran excelente sensibilidad hasta bajos números de células diana.

La figura 1C muestra el análisis de muestras de sangre de controles sanos, pacientes con cáncer de próstata localizado (resecable) y cáncer de próstata metastásico, procesadas a través del CTC-iChip, sometidas a TA-PCR y análisis de nanogotas usando tres biomarcadores específicos de próstata y uno específico epitelial (KLK3, AMACR, FOLH1, EpCAM). Los resultados se muestran para el número total de nanogotas/ml para los cuatro marcadores combinados.

Estos resultados sugieren que la aplicación de una lectura de PCR en nanogotas al CTC-iChip potencia enormemente su sensibilidad en la detección de casi todas las CTC presentes en una muestra biológica. Tomados conjuntamente, el CTC-iChip y la PCR en nanogotas representan dos tecnologías microfluídicas potentes que son muy compatibles entre sí y pueden integrarse en línea para crear un nuevo ensayo biológico altamente sensible y preciso.

Ejemplo 2 - Protocolo de ensayo CTC digital

Este ejemplo proporciona un protocolo general de ensayo CTC digital que puede usarse para los métodos descritos en este documento. Se usaron diferentes aspectos de este protocolo general en algunos de los ejemplos descritos en este documento. Por ejemplo, la estrategia 1 de la etapa 3 del protocolo descrito a continuación (que se refiere a la purificación de ARN para la síntesis de ADNc), se usó para generar los datos para las figuras 15A a 15C. La estrategia 2 de la etapa 3 se usó para generar los datos para las figuras 19A a 24B.

1. La sangre del paciente se procesa a través de I-Chip, versión 1.3M o 1.4.5T. Se recoge la muestra en un tubo cónico de 15 ml en hielo.
2. La muestra se centrifuga a 4C. El sobrenadante se decanta y se añade SUPERase™ In (inhibidor de RNasa independiente de DTT) + solución de estabilización RNALater® (evita la degradación del ARN al inhibir las RNasas) al sedimento. La muestra se congela instantáneamente y se pone a -80 hasta su procesamiento adicional. Las muestras son estables a -80.
3. Hay dos protocolos diferentes de procesamiento para la purificación de ARN para la síntesis de ADNc que se usaron en los ejemplos descritos a continuación.

Estrategia 1

- a. La muestra se descongeló en hielo.
- b. Lisis directa de la muestra usando detergentes (NP40, Tween20).
- c. La muestra lisada se llevó directamente para síntesis de ADNc (Superscript III).

d. Después de la síntesis de ADNc, la muestra se purificó mediante SPRI (Agencourt AMPure® XP microesferas) para limitar los detergentes y cualquier nucleótido <100 pb.

Estrategia 2

a. La muestra se descongeló en hielo.

b. La muestra se procesó en RNeasy Qiagen Micro Kit. El protocolo tiene algunas ligeras variaciones en comparación con las recomendaciones tradicionales de Qiagen. Se usaron mayores volúmenes de tampón RLT (tampón de lisis), así como mayores concentraciones de ETOH. Estas modificaciones se hicieron a causa de la adición de RNALater® a la muestra.

c. Después de la síntesis de ADNc, la muestra se purificó mediante SPRI (Agencourt AMPure XP microesferas) para limpiar los detergentes y cualquier nucleótido <100 pb.

4. El ADNc (sintetizado a partir de la estrategia 1 o 2) puede procesarse de dos maneras diferentes:

a. El ADNc se usó directamente para ddPCR; o

b. El ADNc se amplificó usando una estrategia de PCR con cebadores internos Fluidigm BioMark™ (los cebadores de genes usados para PCR con cebadores internos se han prevalidado). El ADNc amplificado se diluyó.

5. Se añadió el ADNc (de la etapa 4a o 4b), Biorad Supermix™ para las sondas, cebador o cebadores (para el gen de interés; hasta 4 cebadores diferentes (FAM y HEX) pueden combinarse) en un volumen total de 22 µl.

6. Se generaron nanogotas (-15 000-18 000 nanogotas por pocillo).

7. La muestra de nanogotas se puso en una máquina de PCR. Las condiciones de PCR fueron diferentes de las recomendaciones de Biorad. Se usó reducción en lugar de una rampa lenta para garantizar que todas las nanogotas alcanzan la misma temperatura. Esto es diferente de lo que usa tanto RainDance como Biorad. Pueden obtenerse mejores resultados (es decir, más señal y más separación entre nanogotas positivas y negativas) con la reducción en lugar del gradiente.

8. Después de la PCR, se contaron las nanogotas positivas en una máquina ddPCR.

9. Se recogen los datos y se analizan usando el programa informático de análisis TIBCO® Spotfire®.

Los reactivos, concentraciones de reactivos y volúmenes de reacción se proporcionan a continuación:

Reactivos:

- Biorad ddPCR™ Supermix para sondas (sin dUTP)
- cebadores/sondas IDT (20x o 40x)
- ADNc (1 ng/ul para líneas celulares)
- Agua sin nucleasa
- Placa Eppendorf de 96 pocillos semibordeados (solamente estas placas funcionan con la máquina)

Ensayo de líneas celulares relevantes

Pos reacción única:

ddPCR Supermix	11,0 µl
Cebador (20x)	1,10 µl
ADNc (1 ng/ul)	1,10 µl
Agua	8,80 µl
TOTAL	22,0 µl por pocillo

Una mezcla fundamental que contiene ddPCR Supermix, ADNc y agua se repartió en alícuotas en pocillos y se añadió 1,1 µl de cada cebador a cada pocillo y se mezcló bien.

Muestras de pacientes

Por reacción única para genes individuales

ddPCR Supermix	11,0 µl
Cebador (20x)	1,1 µl
ADNc (paciente)	Hasta 9,9 µl (equilibrio con agua si hay menos)
TOTAL	22,0 µl por pocillo

Por reacción combinada única para múltiples genes

ddPCR Supermix	11,0 µl
Cebador 1 (40x)	0,55 µl
Cebador 2 (40x)	0,55 µl
Cebador 3 (40x)	0,55 µl
Cebador 4 (40x)	0,55 µl
ADNc (paciente)	8,8 µl
TOTAL	22,0 µl por pocillo

Cuando se ensayan múltiples pacientes frente a un cebador específico de gen o cebadores combinados frente a múltiples genes, una mezcla fundamental, que incluye la ddPCR Supermix y los cebadores, se repartió en alícuotas en los pocillos seguido de la adición de ADNc del paciente a cada pocillos y se mezcló bien.

Ejemplo 3 - Protocolo para validación génica

El siguiente protocolo se usó para seleccionar los genes marcadores específicos enumerados en la tabla 1.

1. Los transcritos que son únicos para las CTC y no se expresan en los glóbulos blancos (WBC), los leucocitos, etc. se exploraron bioinformáticamente, los datos de expresión génica en tumor primario y CTC se compararon con los conjuntos de datos de expresión génica de WBC para aislar los transcritos que estaban presentes solamente en tumor primario y/o CTC.
2. Los transcritos que pasaron el umbral de corte se validaron por qPCR.
3. Los cebadores se sintetizaron por IDT. Las sondas se marcaron con FAM/ZEN/IBFQ.
4. La validación por qPCR requirió que cada transcrito se validara por al menos dos conjuntos de cebadores independientes sobre dos líneas celulares diferentes, WBC de 5 donadores sanos (aislados mediante columna CPT) y agua como control negativo. Se usaron 50 ciclos para qPCR para confirmar que la expresión de un transcrito estaba presente solamente en las líneas celulares y no en donadores sanos.
5. Los transcritos que pasaron la validación por qPCR se validaron en ddPCR con líneas celulares y los donadores sanos se pasaron a través del CTC-iChip (con y sin adición a células).
6. Los paneles de transcritos se combinaron (hasta 4 genes diferentes por reacción) dependiendo de la enfermedad de interés.

La validez de esta estrategia se muestra a continuación en un experimento celular con adición, en que un número cuidadosamente medido de células tumorales (de la línea celular de cáncer de próstata LNCAP) se micromanipulan individualmente, se añaden a muestras de sangre de control, se pasan a través del CTC-iChip y después se analizan por ensayo d-CTC como anteriormente. Números crecientes de células añadidas muestran números crecientes de señal digital como se muestra en la figura 2, que ilustra la potencia de este protocolo. La figura 2 demuestra el uso de un solo transcrito génico (KLK3, también conocido como PSA, para cáncer de próstata) como sonda (en el ensayo, se usan 8-24 transcritos génicos, aumentando adicionalmente de este modo la sensibilidad). Aquí, se añadió un número calculado de células cancerosas (cada célula se micromanipula, se recoge y se introduce en 10 ml de muestra de sangre de control). La sangre entonces se procesa a través del CTC-Chip y se somete a lectura digital como se describe anteriormente. No se observa señal en sangre a la que no se ha añadido una sola célula cancerosa. La

introducción de 2 células/10 ml de sangre genera una clara señal (65 nanogotas positivas). En este caso, el producto de 10 CTC se dividió en 4 y se procesó por cuadruplicado, de modo que las 64 nanogotas realmente representan la señal digital derivada de $\frac{1}{4}$ de una célula tumoral.

Este ensayo es tanto altamente sensible como reproducible. Como se muestra en la figura 3, la señal digital en estos experimentos con células añadidas muestra alta reproducibilidad (2 réplicas independientes mostradas aquí), y la misma cantidad de señal se observa cuando se añaden células en tampón (en lugar de sangre) y se analizan directamente (sin procesamiento CTC-Chip). Por tanto, casi no hay pérdida de señal cuando una célula tumoral se diluye en miles de millones de glóbulos normales y después se "vuelven a aislar" usando el CTC-Chip antes de la lectura digital.

Ejemplo 4 - Análisis digital combinado de transcritos génicos del producto de CTC-Chip

Se estableció un ensayo combinado que puede ensayar muchos transcritos génicos diferentes a partir de una cantidad diminuta de producto de CTC-Chip. Esto combinó la mayor sensibilidad y especificidad del uso de múltiples genes independientes, con el hecho de que la cantidad de molde introducido es limitada (y, por tanto, no debe diluirse en múltiples reacciones). Los nuevos ensayos incluyen múltiples genes, por ejemplo, 2, 3, 4, 6, 8, 10 o más genes por reacción, resolviéndose cada gen de forma exclusiva en el espacio bidimensional al seleccionar diferentes relaciones de cebadores conjugados fluorescentes. Por tanto, en una sola reacción, se pueden medir independientemente 2, 3, 4 o más transcritos génicos sin tener que diluir el molde. Para diferentes cánceres, se puede procesar y analizar múltiples reacciones diferentes (por ejemplo, hasta 20 transcritos génicos diferentes en cuatro ciclos), y con la aplicación de ensayos de RT-PCR digital con cebadores internos, no hay límite al número de reacciones que pueden realizarse.

Para presentar los resultados de la reacción combinada en una sola vista (y, por tanto, diferenciar la amplificación de cada gen en aislamiento), variamos las concentraciones de las dos sondas fluorescentes (FAM y HEX). Al hacer esto, cada reacción de amplificación génica individual tiene una combinación única de señal de FAM/HEX que refleja la composición de los cebadores específicos de gen y, por tanto, identifica el producto de PCR específico de gen. En el espacio bidimensional, podemos ilustrar la posición de la señal de 4 productos de amplificación génica diferentes producidos a partir de una sola reacción combinada. Aplicado a PCR digital usando nanogotas para encapsular cada reacción de PCR, este método separa las dianas en grupos individuales al modificar la amplitud de la señal binaria de nanogotas positivas, que se presenta cuantitativamente. Como se ha previsto, este método permite tanto la puntuación acumulativa de la señal total para múltiples genes (por ejemplo, 16 marcadores en un total de 4 reacciones), mientras también se retiene la capacidad de cuantificar la señal de cada diana génica individual.

Sonda 1: 100 % FAM

Sonda 2: 100 % HEX

Sonda 3: Mezcla de FAM y HEX - hasta un total de 100 %

Sonda 4: Mezcla de FAM y HEX - hasta un total de 100 %

Como se muestra en las tablas 3 a 7, se usaron las siguientes mezclas de sonda en las reacciones combinadas:

Tabla 3

Combinación de cebadores frente a 4 genes por reacción (melanoma)				
Reacción 1				
FAM	HEX	Cebador	FAM Int	HEX Int
100%	0	Sox10	6000	0
70%	30%	SFRP1	4000	2500
30%	70%	RND3	4500	5500
0%	100%	TFAP2C	0	6000
Reacción 2				
FAM	HEX	Cebador	FAM Int	HEX Int
100%	0	FRAME	11000	0
70%	30%	MLANA	8000	4000
30%	70%	MAGEA6	5000	6000
0%	100%	PMEL	0	5500

Reacción 3				
FAM	HEX	Cebador	FAM Int	HEX Int
100%	0	PMEL	7000	0
70%	30%	MLANA	6000	3000
30%	70%	MAGEA6	4000	5000
0%	100%	MET	0	4500

Tabla 4

Combinación de cebadores frente a 4 genes por reacción (universal de cáncer/linaje)				
FAM	HEX	Cebador	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	TFAP2C	9000	0
60	40	PGR	5100	1800
35	65	SCGB2A1	2205	7800
0	100	CADPS2	0	5000

5 **Tabla 5**

Combinación de cebadores frente a múltiples genes por reacción (estado de AR en próstata)				
Combinación de cebadores frente a 4 genes por reacción (próstata)				
Reacción 1				
FAM	HEX	Cebador	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	TMPR2	5500	0
65	35	FAT1	5525	1837,5
40	60	KLK2	2440	2580
0	100	STEAP2	0	4300
Reacción 2				
	FAM HEX	Cebador	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	KLK3	6600	0
70	30	HOXB13	4340	1320
50	50	AGR2	4050	3050
0	100	FOLH1	0	5200

Tabla 6

Combinación de cebadores frente a 4 genes por reacción Transición epitelial-mesenquimatosa (EMT)				
Reacción 1				
FAM	HEX	Cebador	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	PKP3	8000	0
75	25	OCLN	6000	1625
40	60	CDH11	4000	3600
0	100	S100A2	0	5000
Reacción 2				
FAM	HEX	Cebador	Exp. FAM Int	Exp. HEX Int
100	0	FAT1	8000	0
65	35	FAT2	5200	1750
40	60	COL8A1	3200	3900
0	100	CDH3	0	6000

Tabla 7

Combinación de cebadores frente a múltiples genes por reacción				
Reacción	Gen-conjunto de cebadores	Intensidad prom. (FAM)	Intensidad prom. (HEX)	Estado de AR
1	TMPRSS2	5500		ACTIVO
1	FAT1	8500	5250	¿?
1	KLK2	6100	4300	ACTIVO
1	STEAP2	3350	4300	ACTIVO
2	KLK3	6600		ACTIVO
2	FOLH1	6200	5200	INACTIVO
2	AGR2	8100	6100	INACTIVO
2	HOXB13	6500	4400	INACTIVO

5 Validación y ensayo

Para validar y demostrar la eficacia de esta estrategia combinada, ilustramos tanto el concepto (usando experimentos de células añadidas) como muestras derivadas de pacientes. La figura 4 muestra los resultados de procesar una muestra de sangre de control normal de un donador sano (HD) a través del CTC-Chip y sometida a ensayo d-CTC para 4 diferentes transcritos génicos, todos ellos negativos (es decir, nanogotas de blanco).

Por otro lado, la figura 5 es una representación de los datos de experimentos de células añadidas, las líneas celulares de cáncer de próstata introducidas en sangre y procesadas a través del CTC-Chip, seguido de ensayo digital, mostraron señal positiva (nanogotas fluorescentes) para cada uno de los transcritos de 4 linajes. Estos aparecían en ubicaciones separadas dentro del diagrama bidimensional, en función de la fluorescencia diferencial de dos sondas (color codificado en la imagen). Como la muestra está sobrecargada con células tumorales, algunas nanogotas contenían señal de más de un transcrito génico (múltiples genes por nanogota se muestran en gris).

La estrategia de representar cuatro genes diferentes dentro de cada reacción fue aplicable a múltiples cánceres diferentes, con marcadores de linaje específicos sustituidos para cada tipo de tumor. Por ejemplo, en cáncer de próstata, pronosticamos (modelo teórico) una reacción combinada con cuatro cuadrantes (un gen por cuadrante) para cada una de 2 reacciones (total de 8 marcadores génicos). El experimento de células añadidas (células de cáncer de próstata introducidas en sangre de control y procesadas a través del CTC-iChip) recapituló de forma precisa los resultados previstos.

Además, las figuras 6A-6B y las figuras 7A-7B muestran que, cuando se ensamblan conjuntamente, nuestro programa analítico integraba todas las señales positivas dentro de los cuadrantes, justo como se había previsto del modelado, y permitiéndonos desarrollar métodos para puntuar las señales génicas específicas. El análisis espacial multidimensional de la señal permitió un análisis automatizado y puntuación con precisión de alto nivel. Las figuras 6A y 6B muestran el modelo teórico y los resultados reales, respectivamente, para una línea celular de cáncer de próstata para la reacción 1, y las figuras 7A y 7B muestran el modelo teórico y los resultados reales, respectivamente, para la misma línea celular de cáncer de próstata para la reacción 2.

Las figuras 8A-8B (resultados teóricos y reales de cáncer de mama y pulmonar, reacción 1), 9A-9B (resultados teóricos y reales de cáncer de mama y pulmonar, reacción 2), 10A-10B (igual, reacción 3), 11A-11B (igual, reacción 4), 12A-12B (igual, reacción 5) y 13A-13B (igual, reacción 6) ilustran los resultados cuando se usó la misma estrategia con cáncer de mama y cáncer pulmonar. Pudimos establecer un panel de múltiples cánceres que es eficaz en identificar marcadores compartidos por la mayoría de adenocarcinomas (es decir, agrupando cáncer de mama y pulmonar juntos), como 6 reacciones (4 marcadores génicos dentro de cada reacción para un total de 24 marcadores), como se muestra a continuación (teórico frente a validación usando experimentos de células añadidas con células de cáncer tanto de mama como pulmonar).

Estas figuras muestran los resultados cuando se aplicó la misma estrategia de ensayo de múltiples transcritos génicos de modo combinado (4 genes por reacción) a cáncer de mama. Se realizaron seis reacciones diferentes del mismo producto de CTC Chip (que posibilita ensayar un total de 24 transcritos génicos independientemente), teniendo, cada una, una posición de señal designada (previstas en el panel superior) y observadas en experimentos de validación de células añadidas (observadas en el panel inferior).

Ejemplo 5 - Preamplificación específica de diana para mejorar la detección de ARNm específico de tumor

Para mejorar la detección de ARN específicos de tumor, se optimizó una estrategia de PCR con cebadores internos para cada una de las amplificaciones específicas de gen. Para conseguir esto, el ADNc derivado de las CTC se amplificó en primer lugar con cebadores específicos de gen que están situados unas pocas pares de bases externos a los cebadores específicos de gen usados para ensayo d-CTC. Para cada gen, se ensayaron de dos a tres conjuntos de cebadores, y el conjunto de cebadores que es compatible con el cebador del ensayo d-CTC específico de gen y da resultado negativo en sangre HD se eligió para análisis de muestras de pacientes.

Como se describe anteriormente, el protocolo de amplificación específica de diana se ensayó en primer lugar en líneas celulares derivadas de los diferentes cánceres. Las combinaciones de cebadores que son específicos para células tumorales (y están ausentes en leucocitos) se ensayaron entonces con una mezcla de líneas celulares cancerosas mezcladas en sangre y enriquecidas a través del CTC-iChip. La sangre HD procesada a través del CTC-iChip se usó como control. La clave para esta estrategia es el diseño de las condiciones de PCR con cebadores internos para potenciar la señal a partir de cantidades diminutas de ADNc derivados de CTC, sin aumentar la señal basal mínima de los glóbulos normales. Esta selectividad se consiguió optimizando cuidadosamente las secuencias cebadoras de PCR y las condiciones de ensayo, así como equilibrando el número de ciclos para las PCR externas e internas. Todas las condiciones se validan en primer lugar con ácidos nucleicos purificados, después con células tumorales individuales que se añaden en muestras de sangre de control y se procesan a través del CTC-iChip, después con paneles grandes (>10) de diferentes donadores sanos de sangre, y finalmente con muestras de sangre derivadas de los pacientes, de pacientes que tienen cánceres metastásicos o localizados de próstata, mama, melanoma, hígado, pulmonar o páncreas.

Reactivos

- Tampón de suspensión de ADN (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM) (TEKnova, PN T0221)
- EDTA 0,5, pH 8,0 (Invitrogen, PN Am9260G)
- TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, PN 4391128)
- Agua sin nucleasa (TEKnova, PN W330)

Preparación de mezcla de cebadores para amplificación de diana específica (STA) 10X

- 1.) En una campana sin ADN, se mezclaron 0,5 µl de cada uno de los pares de cebadores 200 µM (0,5 µl de cebador directo y 0,5 µl de cebador inverso).
- 2.) Cada cebador se diluyó en tampón de suspensión de ADN 1X hasta una concentración final de 500 nM. (Ej: Si el volumen combinado de cebadores es igual a 8 ml, se añaden 192 ml de tampón de suspensión de ADN)
- 3.) La mezcla se agitó en vórtice durante 20 segundos y se centrifugó durante 30 segundos.
- 4.) La mezcla de cebadores STA 10X puede almacenarse a 4 °C para uso repetido durante hasta seis meses o almacenarse congelada a -20 °C para uso a largo plazo.



Preparación de mezcla de reacción STA



- 1.) Para cada pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos, se prepara la siguiente mezcla.

Componente	Por 9 µl de muestra (µl)	96 muestras con excedente (µl)
TaqMan® PreAmp Master Mix	7,5	780,0
Mezcla de cebadores STA 10X (500 nM)	1,5	156,0
EDTA 0,5 M, pH 8,0	0,075	7,8
Volumen total	9,0	943,8

- 2.) Se añadieron 6 µl de ADNc a 9 µl de mezcla de reacción STA

3.) Se usaron condiciones de termociclado enumeradas a continuación con 18 ciclos de desnaturalización y etapas de hibridación/extensión en lugar de 20 ciclos. (Nota: Se usaron 18 ciclos para comparar el protocolo de preamplificación TSA con la amplificación de todo el transcriptoma).

Condición	Activación enzimática	De 10 a 18 ciclos		Mantenimiento
		Desnaturalización	Hibridación/extensión	
Temperatura	95 °C	96 °C	60 °C	4 °C
Tiempo	10 minutos	5 segundos	4 minutos	Infinito

5 Se carga 1 µl del producto preamplificado en cada reacción de PCR en nanogotas.

La figura 14 muestra la señal de PCR en nanogotas para 7 marcadores (PIP, PRAME, RND3, PKP3, FAT1, S100A2 y AGR2) a partir de 1 ng de ADNc de línea celular no amplificada y a partir de 1 µl de producto preamplificado después de 10, 14 y 18 ciclos de preamplificación. Ciclos adicionales de preamplificación producen aumento de la señal. Cabe destacar que PRAME, un marcador expresado a niveles muy bajos en esta línea celular, se detecta solamente después de 18 ciclos de preamplificación, lo que demuestra la utilidad de la técnica.

Ejemplo 6 - Datos clínicos y validación del ensayo

15 Los ensayos descritos en este documento se han validado usando muestras de pacientes reales de estudios clínicos. Estos incluyen pacientes con cáncer metastásico (pulmonar, mama, próstata y melanoma), así como pacientes con cáncer localizado (próstata). Los ensayos se realizan como se describe en los ejemplos 2 a 5.

20 Las figuras 15A, B y C muestran un resumen de los ensayos clínicos de pacientes con cánceres metastásicos de pulmón (6 pacientes; figura 15A), mama (6 pacientes; figura 15B) y próstata (10 pacientes; figura 15C), que mostraron que casi todos los pacientes tiene señal positiva, mientras que los controles sanos no tienen ninguna. En este ensayo, se añadieron todas las puntuaciones positivas (puntuación acumulativa). Sin embargo, como se describe a continuación, las puntuaciones también pueden descomponerse por genes individuales, como se muestra en la figura 16.

25 La figura 16 ilustra el análisis acumulativo de los datos de múltiples sondas, y muestra una señal positiva en 10/11 pacientes con cáncer de próstata metastásico (91 % en una base por paciente) frente a 0/12 (0 %) de controles sanos. En una base por muestra, 24 de 28 muestras tuvieron una señal positiva, lo que indica una tasa de detección de un 86 %. Además, algunos marcadores individuales eran bastante eficaces, por ejemplo, AGR2 (9/10 de detección para cáncer metastásico, y 0/3 para cáncer localizado), TMPRSS2 (5/10 y 1/3), KLK2 (6/10 y 0/3), STEAP2 (1/10 y 1/3), FAT1 (2/10 y 1/3), y FOLH1 (3/10 y 1/3)

30 Como se ilustra anteriormente, también se pueden descomponer los marcadores génicos individuales para validación y cuantificación independientes, usando el esquema de color de fluorescencia combinado descrito anteriormente. En este ejemplo a continuación, un paciente con cáncer de próstata metastásico tenía múltiples marcadores positivos, un paciente con cáncer de próstata localizado tiene un número más pequeño de puntuaciones positivas dentro de menos marcadores, y un control sano es negativo para todos los marcadores.

35 La figura 17 muestra los datos clínicos de tres muestras representativas de pacientes. En dos reacciones separadas con cuatro transcritos génicos cada una (8 sondas en total), una muestra de sangre de un paciente con cáncer de próstata metastásico mostró múltiples señales (todas las sondas son positiva a diversos grados). En contraste, una muestra de sangre de un paciente con cáncer de próstata localizado (curable) mostró señal más débil (pero claramente detectable). Mientras las sondas 1 (TMPRSS2), 5 (KLK3), 6 (HOXB13), 7 (AGR2) tuvieron la señal más fuerte en el paciente con cáncer metastásico, las sondas 2 (FAT1) y 4 (STEAP2) fueron las más positivas en el paciente con cáncer localizado. Este resultado ilustra claramente la heterogeneidad en la señal entre células cancerosas en la sangre y la importancia de examinar las señales diferenciales dentro del ensayo. La sangre de un control HD (procesada de forma idéntica a las muestras de pacientes con cáncer) tuvo una ausencia completa de señal.

Ejemplo 7 - Medición de rutas de señalización dentro de las CTC

40 Además de proporcionar una medida digital (cuantitativa) de las CTC presentes dentro de una muestra de sangre, nuestro ensayo d-CTC también permitió el análisis de rutas de señalización específicas que son únicas para las células tumorales en la sangre. Por ejemplo, un subconjunto de genes específicos de linaje de próstata se activaban por señalización androgénica (tal como PSA), mientras que otro subconjunto se reprimía por señalización androgénica (tal como PSMA). Al analizar estos genes conjuntamente, podemos averiguar el estado de señalización androgénica dentro de las CTC. Definir el número total de señal de CTC en la sangre, simultáneamente con información sobre la eficacia del agente terapéutico de abordar e inactivar la ruta crucial es importante para la supervisión terapéutica.

45 Hemos ilustrado este concepto en cáncer de próstata, donde el agente antiandrogénico abiraterona es eficaz en suprimir la progresión del cáncer, particularmente en tumores que aún son dependientes de la ruta androgénica. A

continuación, mostramos los resultados de un paciente con "cáncer de próstata resistente a castración (CRPC)" que ya no está respondiendo a leuprolida de primera línea y se trató con abiraterona. Los marcadores de respuesta androgénica (verde) se suprimieron inicialmente por el tratamiento ya que muestra eficacia inicial, pero posteriormente regresaron según el tumor se volvía resistente y el paciente experimenta progresión de la enfermedad con este fármaco.

La figura 18 proporciona los resultados de un estudio clínico de un paciente con cáncer de próstata metastásico. El subconjunto de señales de "genes inducidos por receptor de andrógenos (AR-activo)" se muestra en verde en la parte superior de las barras este gráfico de barras, mientras el subconjunto de señales de "genes reprimidos por andrógenos (AR-inactivo)" se muestra en rojo en la parte inferior de cada barra. Según se trata el paciente con el inhibidor de la ruta androgénica abiraterona (por ejemplo, ZYTIGA® (acetato de abiraterona), la señal de AR-activo se reduce enormemente, lo que indica supresión eficaz de la ruta androgénica dentro de las células cancerosas en la sangre. En el ciclo 4 de tratamiento farmacológico, sin embargo, la ruta androgénica parece reactivarse en las células cancerosas (aumentando la señal verde), indicativo de resistencia al fármaco. Las mediciones de PSA en suero tomadas en estos puntos temporales son coherentes con el fracaso del tratamiento farmacológico.

Ejemplo 8 - Preamplificación no específica para mejorar la detección de ARNm específico de tumor

Similar al ejemplo 5, puede usarse amplificación de todo el transcriptoma (WTA) no específica para aumentar la tasa de detección de los transcritos específicos de CTC. Este método depende del uso de cebadores aleatorios que amplifican no solamente las dianas de interés, sino todos los mensajes encontrados en el producto. En este ejemplo, el protocolo del SMARTer™ Ultra Low RNA Kit (Clontech) se usó como se describe a continuación:

Transferencia de ARN a tubos o placa de PCR

- 1) Se añade 1 ul de mezcla 1 de adición de ERCC diluida 1:50 000 a cada muestra
- 2) Se lleva el volumen de cada muestra hasta 10 ul
- 3) Se añade 1 ul de cebador 3' SMART CDS IIA a cada muestra
- 4) Se ejecuta el programa de termociclador "72C":

72 °C 3 min

4 °C siempre

Mezcla fundamental de ADNc de primera hebra (FSM):

1x 4 ul de tampón de primera hebra 5x

0,5 ul de DTT

1 ul de mezcla de dNTP

1 ul de oligonucleótido SMARTer IIA

0,5 ul de inhibidor de RNasa

2 ul de SMARTScribe RT

9 ul por muestra

5) Se prepara la FSM en exceso del 10 % para el número de muestras, después se añaden 9 ul de FSM a cada muestra y se pipetea para mezclar

6) Se ejecuta el programa de termociclador "ADNc":

42 °C 90 min

70 °C 10 min

4 °C siempre

Síntesis de segunda hebra y amplificación (SSM):

1x 25 ul de tampón de PCR SeqAmp 2x

1 ul de cebador IIA - v3

5 1 ul de ADN polimerasa SeqAmp

3 ul de agua sin nucleasa 30 ul por muestra

10 7) Se prepara la SSM en exceso del 10 % para el número de muestras, después se añaden 30 ul de SSM a cada muestra y se pipetea para mezclar

8) Se ejecuta el programa de termociclador "PCR":

95 °C	1 min
X ciclos	
98 °C	10 s
65 °C	30 s
68 °C	3 min
72 °C	10 min
4 °C	siempre

El número de ciclos puede ajustarse dependiendo del ARN introducido (por ejemplo, 18 ciclos para células individuales o 9 ciclos para 10 ng de ARN introducido). Además, el punto de parada de 4 grados es durante la noche.

15 **Purificación por inmovilización reversible en fase sólida (SPRI):**

Se transfiere el producto de PCR a tubos Eppendorf de 1,5 ml de baja unión y se marca un segundo conjunto de tubos con las ID de las muestras; se ejecuta el protocolo SPRI a TA hasta la elución final

20 9) Se incuban microesferas AMPure™ XP [4 grados] a TA durante al menos 30 minutos

10) Se garantiza que se descongela una cantidad suficiente de tampón de elución y está a TA

25 11) Se prepara etanol al 80 % (al menos 400 ul por muestra)

30 12) Se agitan bien con vórtice las microesferas antes de añadir 50 ul de microesferas a cada muestra, se pipetea arriba y abajo 5-10 veces para mezclar bien. Nota: Cuando se pipetea las microesferas, es aconsejable usar puntas RPT para un mejor control de los volúmenes añadidos y menos unión residual de las microesferas en las puntas

13) Se incuban las muestras a TA durante 5 minutos

35 14) Se colocan las muestras sobre el imán y se dejan asentar durante 5 minutos

15) Se pipetea el sobrenadante (~95 ul) sin alterar las microesferas (comprobar el color pardo en la punta de pipeta y poner de nuevo en el tubo si hay una pérdida de cantidad significativa de microesferas)

40 16) Se lava dos veces con 200 ul de etanol al 80 %, no mezclar o alterar el sedimento de microesferas. Se sumerge simplemente el sedimento de microesferas en el etanol durante 30 segundos y después se retira el etanol. Hay que intentar que no se deje secar el sedimento de microesferas entre los lavados con etanol.

17) Secar al aire las muestras sobre la gradilla magnética hasta que los sedimentos de microesferas ya no brillen, pero antes de que se agrieten. Se retira por pipeteo cualquier cantidad de etanol residual que se

cumule en el fondo mientras se seca (Nota: El tiempo de secado puede variar enormemente dependiendo de la concentración de ADN después de la amplificación). Aportes de ARN a nivel de una sola célula en general tardan 3-5 minutos en secar, mientras que otras muestras de producto de IFD han tardado hasta una hora.

18) Se eluyen los sedimentos en 17 µl de tampón de elución según empiezan a agrietarse. Retira una muestra del imán y se pipetea el tampón sobre el sedimento repetidamente hasta que todas las microesferas estén en solución; después se mezcla por pipeteo para resuspender completamente las microesferas (esto funcionará a grados variables para cada muestra). No hay que intentar mezclar demasiado vigorosamente, ya que esto crea muchas burbujas, lo que tiende a disminuir el volumen de elución que se puede obtener.

19) Se dejan incubar las muestras resuspendidas a TA durante al menos 2 minutos, después se centrifugan rápidamente todas las muestras.

20) Se ponen las muestras de nuevo en la gradilla magnética durante 5 minutos.

21) Se retiran por pipeteo ~15 µl del ADNc amplificado eluido y se comprueban las microesferas en la punta de la pipeta. Si están presentes microesferas, se pipetea la solución de nuevo sobre el sedimento de microesferas y se dejan asentar durante ~1 minuto antes de intentar otra elución. De lo contrario, se almacenan en un nuevo tubo Eppendorf de 1,5-ml de baja unión, tubo de PCR o placa de PCR de 96 pocillos. Nota: Si se están obteniendo repetidamente microesferas en el producto de elución, la única solución puede ser disminuir el volumen de aspiración hasta 14 µl o menos.

Esta estrategia de amplificación de todo el transcriptoma (WTA) se ensayó en primer lugar en líneas celulares derivadas de diferentes cánceres. Las figuras 19A y 19B muestran tres réplicas diferentes de ADNc preamplificado por SMARTer (18 ciclos) de una línea celular de cáncer de hígado (HEPG2) analizada con 12 sondas del panel de cáncer de hígado. Como se muestra en la figura 19A, aunque la eficacia de amplificación para cada región diana es diferente, es coherente entre las tres réplicas (WTA1, WTA2, WTA3), lo que demuestra la reproducibilidad de esta estrategia. Como se muestra en la figura 19B, estos métodos que usan 18 ciclos de preamplificación por SMARTer proporcionan un aumento en la señal de aproximadamente cuatro órdenes de magnitud (10^8 frente a 10^4), lo que proporciona un buen refuerzo en la detección.

Ejemplo 9 - Ensayos de marcadores combinados frente a individuales para cáncer de hígado

Para cada muestra, se recogieron 10-20 ml de sangre de cada paciente. La sangre se procesó en 3 horas desde la llegada en un CTC-iCHIP ejecutado en modo de reducción negativa. Se extrajo el ARN del producto usando un Qiagen RNeasy™ plus Micro kit, y 5 µl de los 17 µl disponibles se amplificaron usando la estrategia de amplificación de todo el transcriptoma (WTA) de ClonTech v3 SMARTer™. Entonces se cargó un 1 % del producto de WTA en cada pocillo de una placa de PCR digital, y se usaron 500 nM de combinaciones de cebador/sonda Taqman™ para determinar la concentración de transcrito para cada gen de interés. Los recuentos de transcrito se normalizaron al volumen de sangre y se compararon entre pacientes HCC, HD y CLD. Los pacientes HCC se definen como carcinoma hepatocelular no reseado confirmado por biopsia, los pacientes CLD son pacientes con hepatopatía de etiologías variables (mediada por alcohol, HBV, HCV) que son negativos a ecografía/RM. HD son donadores sanos externos al laboratorio que donan 10-20 ml de sangre.

Las figuras 20A a 20C muestran los números de nanogotas totales en 21 pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) (figura 20A), 13 pacientes con hepatopatía crónica (CLD) (figura 20B) y 15 donadores sanos (HD) (figura 20C). Los pacientes HCC muestran mayor número de nanogotas en comparación con los CLD y también los HD, lo que sugiere que el panel está muy limpio en el grupo CLD de alto riesgo y puede usarse para cribar esos pacientes para el desarrollo de cáncer de hígado. Esto es un resultado importante dada la baja especificidad de los métodos de cribado c = para cáncer de hígado actualmente disponibles en clínica. Entre los pacientes CLD, la American Association of Liver Disease recomienda ecografía (Estados Unidos) cada 6 meses, con un algoritmo detallado dependiente del tamaño de la lesión hepática detectada. Un cribado prospectivo combinado por ecografía con marcadores génicos AFP en China demostró un beneficio en la mortalidad de un 37 % para aquellos que se sometían a cribado en comparación con los que no, incluso cuando la población cribada solamente mantenía una tasa de cumplimiento de un 60 %.

La sensibilidad y especificidad de cada ensayo dependen de los valores de umbral elegidos para definir "enfermo" frente a "no enfermo", pero usando 20 µg/l, el gen marcador AFP tiene una sensibilidad entre un 50-80 % y una especificidad entre un 80-90 %. En un estudio que usa 20 ng/ml como punto de corte, la sensibilidad se elevó hasta un 78,9 %, aunque la especificidad se redujo hasta un 78,1 % (Taketa, Alpha-fetoprotein, J. Med. Technol., 1989; 33:1380). Por otro lado, la tasa de detección global del presente ensayo fue de un 76 % cuando se tenía en cuenta el historial clínico de los pacientes y se corregía para los que recibían resección curativa o trasplante de hígado con una especificidad del 100 %.

Además, aunque los 11 marcadores del ensayo de cáncer de hígado usados en este documento contribuyeron a la sensibilidad del 76 %, los 5 marcadores principales (AHSG, ALB, APOH, FGB y FGG) por sí mismos tienen una

sensibilidad del 70 %, mientras que los 3 marcadores principales en solitario (ALB, FGB, FGG) producen una sensibilidad del 67 %. ALB en solitario detectó un 56 % de los casos.

Ejemplo 10 - Ensayos de marcadores combinados frente a individuales para cáncer pulmonar

Se procesaron muestras de sangre de 8 pacientes con cáncer pulmonar metastásico y 8 donadores sanos a través del CTC-chip como se describe previamente. Las muestras se centrifugaron, se trataron con RNAlater™ y se almacenaron a -80 °C. Se purificó el ARN y se sintetizó ADNc como se describe. Se realizó STA en cada muestra usando 6 µl de ADNc y los cebadores internos correspondientes a las sondas enumeradas en la figura. Se cargó 1 µl de producto de STA por cada reacción de PCR en nanogotas.

Los números de nanogotas se normalizaron al volumen de sangre. Como se muestra en la figura 21A y 21B, el panel combinado de marcadores génicos pulmonares pudo detectar el 100 % (8/8) de muestras de pacientes con cáncer pulmonar metastásico por encima del fondo de los 8 donadores sanos. También se determinó la sensibilidad de cada marcador del panel pulmonar y los resultados muestran que SFRP tenía una tasa de detección de 8/8, FAT1 sonda 2 tenía una tasa de detección de 7/8, TMPRSS4 tenía una tasa de detección de 6/8, FOXF1 y ARG2, sonda 2 tenían una tasa de detección de 5/8, FAT1 tenía una tasa de detección de 4/8, FAT2 y AGR2 tenían una tasa de detección de 3/8, y FAT2, sonda 2 tenía una tasa de detección de 2/8.

Los ensayos para SERPINA3 y SFRP2 indicaron que SFRP2 es eficaz para detección de cáncer tanto pulmonar como de mama, mientras que el primer parece más específico para detección con cáncer de mama, pero también detecta algunas muestras de cáncer pulmonar.

Ejemplo 11 - Ensayos de marcadores combinados frente a individuales para cáncer de mama

Se procesaron muestras de sangre de 9 pacientes con cáncer de mama metastásico, 5 pacientes con cáncer de mama localizado y 15 donadores sanos a través del CTC-Chip. Los productos se sedimentaron, se trataron con RNAlater™ y se almacenaron a -80 °C. Se preparó el ARN y el ADNc de cada muestra como se describe previamente. Se amplificaron por STA 6 µl de ADNc de cada muestra usando cebadores internos correspondientes a las sondas enumeradas en la figura 22 (FAT2, SCGB2A1, PGR, PRAME, TFAP2C, S100A2, FAT1, AGR2, PKP3, RND3 y PIP). Los números de nanogotas se normalizaron a los volúmenes de sangre y el valor más alto de donador sano para cada marcador se sustrajo de los valores de las muestras de pacientes.

La figura 22 muestra la señal por encima del fondo para cada paciente. Estos métodos detectaron 7/9 (78 %) muestras metastásicas y 2/5 (40 %) muestras localizadas. La sensibilidad de cada marcador en solitario varió de 1/14 a 6/14, siendo los dos marcadores más relevantes AGR2 (6/14) y FAT1 (5/14), y siendo los cuatro siguientes más relevantes RND3, PKP3, PRAME y SCGB2A1 (3/14 cada uno).

Ejemplo 12 - Detección de ARV7 en cáncer de mama metastásico

Se procesaron muestras de sangre de 10 pacientes con cáncer de mama metastásico y 7 donadores sanos a través del CTC-Chip. Los productos se sedimentaron, se trataron con RNAlater™ y se almacenaron a -80 °C. Se preparó el ARN y el ADNc de cada muestra como se describe previamente. Se cargaron 6 µl de ADNc no amplificado en cada reacción de PCR en nanogotas. Las muestras se analizaron con sondas frente a la isoforma v7 del receptor de andrógenos (ARv7, secuencia en la tabla 1). El número de nanogotas se normalizó al volumen de sangre.

Como se muestra en la figura 23A, ARv7 se detectó en 5/10 pacientes (50 %) a niveles por encima del fondo (HD), lo que demuestra que el ensayo es satisfactorio en detectar ARv7 de biopsia líquida. Uno de los pacientes tenía un cáncer de mama triple negativo, lo que sugiere la utilidad de ARv7 como marcador incluso en el contexto de cáncer de mama triple negativo (TNBC) (por ejemplo, pacientes que no expresan genes para ninguno de los tres marcadores de cáncer de mama más comunes, el marcador del receptor de estrógenos (ER), HER2/neu y del receptor de progesterona (PR)).

Ejemplo 13 - Ensayos de marcadores combinados frente a individuales para melanoma

Se procesaron muestras de sangre de 34 pacientes con melanoma metastásico o no resecable, cada uno con múltiples puntos dibujados (puntos dibujados totales: 182), y 15 donadores sanos a través del CTC-Chip. Los productos se sedimentaron, se trataron con RNAlater™ y se congelaron instantáneamente a -80 °C. Se preparó el ARN y el ADNc de cada muestra como se describe previamente. Se amplificaron 12 µl de ADNc de cada muestra por amplificación de diana específica (10 ciclos) usando cebadores internos correspondientes a las sondas enumeradas en la parte inferior del gráfico en la figura 24A (marcadores individuales PMEL, MLANA, MAGEA6, PRAME, TFAP2C y SOX10)). Los números de nanogotas se normalizaron a los volúmenes de sangre. La figura 24B muestra una distribución en gráfico de puntos de señales de nanogotas detectadas en pacientes con melanoma en comparación con donadores sanos. La sensibilidad de detección fue de un 81 % para todos los puntos dibujados de los pacientes (un punto dibujado de paciente se puntúa positivo si 1 cualquiera de 6 marcadores muestra señales de nanogotas por encima de la señal de

fondo más alta en HD para ese marcador particular). De los marcadores individuales, PMEL y MLANA mostraron la tasa de detección más alta.

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis de células tumorales circulantes (CTC) en una muestra de sangre, comprendiendo el método: aislar de la muestra de sangre un producto que comprende CTC y otras células presentes en la sangre;
- 5 reducir el volumen del producto;
- aislar moléculas de ácido ribonucleico (ARN) del producto;
- generar moléculas de ADNc en solución a partir del ARN aislado;
- encapsular las moléculas de ADNc en nanogotas individuales;
- 10 amplificar las moléculas de ADNc dentro de cada una de las nanogotas en presencia de uno o más grupos indicadores configurados para unirse específicamente a ADNc de CTC y no a ADNc de otras células;
- detectar nanogotas que contienen los grupos indicadores como un indicador de la presencia de moléculas de ADNc a partir de las CTC en las nanogotas; y
- analizar las CTC en las nanogotas detectadas,
- 15 en donde amplificar las moléculas de ADNc dentro de cada una de las nanogotas comprende realizar PCR en cada nanogota, en donde se usan conjuntos de cebadores para amplificar las moléculas de ADNc dentro de cada una de las nanogotas, en donde cada conjunto de cebadores corresponde a un gen canceroso seleccionado, en donde los genes cancerosos seleccionados incluyen genes selectivos para uno o más de cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer de hígado y melanoma,
- 20 en donde los genes selectivos de cáncer de próstata incluyen FAT1, TMPRSS2, AGR2, FOLH1, HOXDB 13, KLK2, KLK3 y STEAP2, en donde los conjuntos de cebadores correspondientes a los genes selectivos de cáncer de próstata son:
- FAT1 (cebador 1 SEQ ID NO:23, cebador 2 SEQ ID NO:22),
- 25 TMPRSS2 (cebador 1 SEQ ID NO: 134, cebador 2 SEQ ID NO: 133),
- AGR2 (cebador 1 SEQ ID NO:2, cebador 2 SEQ ID NO: 1),
- FOLH1 (cebador 1 SEQ ID NO:29, cebador 2 SEQ ID NO:28),
- 25 HOXDB 13 (cebador 1 SEQ ID NO:32, cebador 2 SEQ ID NO:31),
- KLK2 (cebador 1 SEQ ID NO:35, cebador 2 SEQ ID NO:34),
- KLK3 (cebador 1 SEQ ID NO:38, cebador 2 SEQ ID NO:37), y
- STEAP2 (cebador 1 SEQ ID NO:125, cebador 2 SEQ ID NO:124),
- 30 en donde los genes selectivos de cáncer de mama incluyen TFAP2C, S100A2, PGR, PIP, FAT2, AGR2, FAT1, RND3, PKP3, PRAME y SCGB2A1, en donde los conjuntos de cebadores correspondientes a los genes selectivos de cáncer de mama son:
- TFAP2C (cebador 1 SEQ ID NO:131, cebador 2 SEQ ID NO:130),
- 35 S100A2 (cebador 1 SEQ ID NO:80, cebador 2 SEQ ID NO:103),
- PGR (cebador 1 SEQ ID NO:62, cebador 2 SEQ ID NO:61),
- PIP (cebador 1 SEQ ID NO:164, cebador 2 SEQ ID NO:163),
- FAT2 (cebador 1 SEQ ID NO:26, cebador 2 SEQ ID NO:25),
- AGR2 (cebador 1 SEQ ID NO:2, cebador 2 SEQ ID NO:1),
- FAT1 (cebador 1 SEQ ID NO:23, cebador 2 SEQ ID NO:22),
- 40 RND3 (cebador 1 SEQ ID NO:77, cebador 2 SEQ ID NO:76),
- PKP3 (cebador 1 SEQ ID NO:65, cebador 2 SEQ ID NO:64),
- PRAME (cebador 1 SEQ ID NO:149, cebador 2 SEQ ID NO:148), y
- SCGB2A1 (cebador 1 SEQ ID NO:83, cebador 2 SEQ ID NO:82),
- 45 en donde los genes selectivos de cáncer pulmonar incluyen AQP4, GREM1, TFAP2C, PRAME, SFRP2, FAT1, TMPRSS4, FOXF1, ARG2 y FAT2, en donde los conjuntos de cebadores correspondientes a los genes selectivos de cáncer pulmonar son:
- AQP4 (cebador 1 SEQ ID NO:200, cebador 2 SEQ ID NO:199),
- GREM1 (cebador 1 SEQ ID NO:206, cebador 2 SEQ ID NO:205),
- TFAP2C (cebador 1 SEQ ID NO:131, cebador 2 SEQ ID NO:130),
- 50 PRAME (cebador 1 SEQ ID NO:149, cebador 2 SEQ ID NO:148),
- SFRP2 (cebador 1 SEQ ID NO:194, cebador 2 SEQ ID NO:193),
- FAT1 (cebador 1 SEQ ID NO:23, cebador 2 SEQ ID NO:22),
- TMPRSS4 (cebador 1 SEQ ID NO:203, cebador 2 SEQ ID NO:202),
- FOXF1 (cebador 1 SEQ ID NO:209, cebador 2 SEQ ID NO:208),
- 55 AGR2 (cebador 1 SEQ ID NO:2, cebador 2 SEQ ID NO:1), y
- FAT2 (cebador 1 SEQ ID NO:26, cebador 2 SEQ ID NO:25),
- en donde los genes selectivos de cáncer de hígado incluyen TF, RBP4, GPC3, AFP, AHSG, ALB, FABP1, APOH, FGB y FGG, en donde los conjuntos de cebadores correspondientes a los genes selectivos de cáncer de hígado son:
- TF (cebador 1 SEQ ID NO:251, cebador 2 SEQ ID NO:250),
- 60 RBP4 (cebador 1 SEQ ID NO:248, cebador 2 SEQ ID NO:247),
- GPC3 (cebador 1 SEQ ID NO: 137, cebador 2 SEQ ID NO: 136),
- AFP (cebador 1 SEQ ID NO: 122, cebador 2 SEQ ID NO: 121),
- FABP1 (cebador 1 SEQ ID NO:236, cebador 2 SEQ ID NO:235),
- AHSG (cebador 1 SEQ ID NO: 152, cebador 2 SEQ ID NO: 151),
- 65 ALB (cebador 1 SEQ ID NO: 140, cebador 2 SEQ ID NO: 139),
- APOH (cebador 1 SEQ ID NO:233, cebador 2 SEQ ID NO:232),

FGB (cebador 1 SEQ ID NO:239, cebador 2 SEQ ID NO:238), y
 FGG (cebador 1 SEQ ID NO:242, cebador 2 SEQ ID NO:241); y
 en donde los genes selectivos de melanoma incluyen PMEL, MLANA, MAGEA6, PRAME, TFAP2C y SOX10, en donde
 el conjunto de cebadores correspondiente a los genes selectivos de melanoma son:

- 5 PMEL (cebador 1 SEQ ID NO:68, cebador 2 SEQ ID NO:67),
 MLANA (cebador 1 SEQ ID NO:50, cebador 2 SEQ ID NO:49),
 MAGEA6 (cebador 1 SEQ ID NO:44, cebador 2 SEQ ID NO:43),
 PRAME (cebador 1 SEQ ID NO: 149, cebador 2 SEQ ID NO: 148),
 TFAP2C (cebador 1 SEQ ID NO: 131, cebador 2 SEQ ID NO: 130), y
 10 SOX10 (cebador 1 SEQ ID NO:89, cebador 2 SEQ ID NO:88).

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además retirar los contaminantes de la solución que contiene
 ADNc antes de encapsular las moléculas de ADNc.

- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde generar moléculas de ADNc a partir de ARN
 aislado comprende realizar reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con retrotranscripción (RT) de las moléculas
 de ARN aisladas.

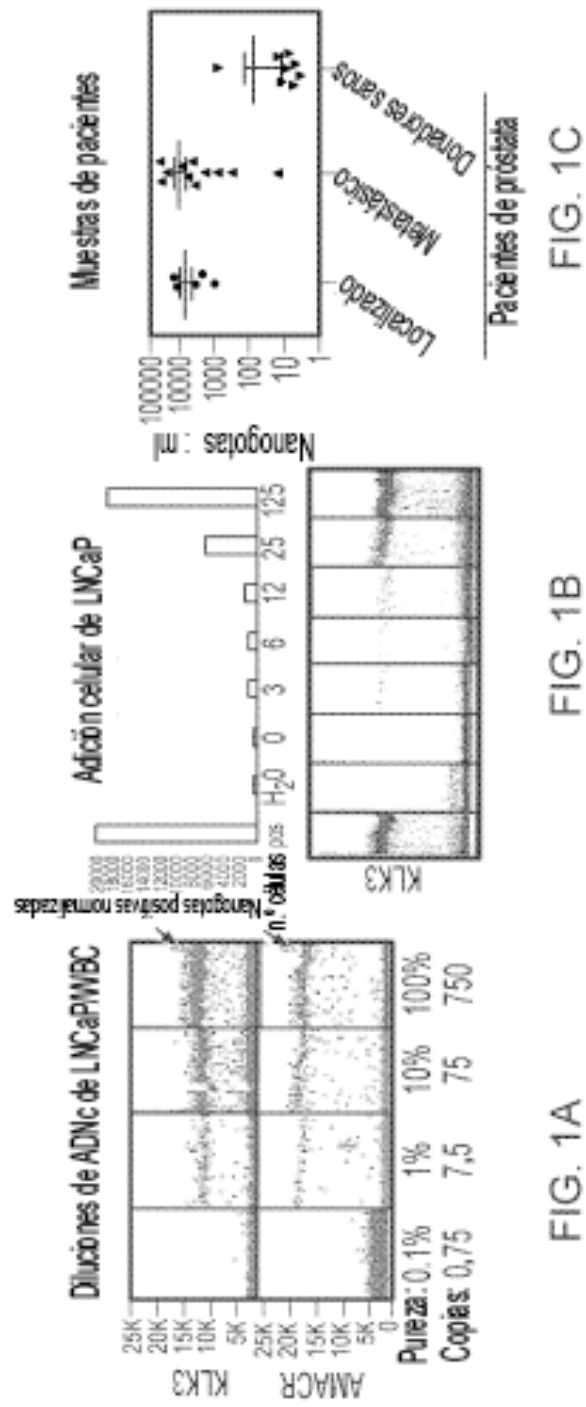
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde encapsular las moléculas de ADNc individuales
 comprende además encapsular reactivos de PCR en nanogotas individuales con las moléculas de ADNc y formar al
 menos 1000 nanogotas de un líquido no acuoso.

- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los grupos indicadores comprenden un
 marcador fluorescente.

- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde retirar los contaminantes de la solución que
 contiene ADNc comprende el uso de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI), opcionalmente en donde la SPRI
 comprende
 inmovilizar el ADNc en la solución con microesferas magnéticas que están configuradas para unirse específicamente
 al ADNc;
 retirar los contaminantes de la solución; y
 eluir el ADNc purificado.

- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el líquido no acuoso comprende uno o más
 fluorocarbonos, hidrofluorocarbonos, aceites minerales, aceites siliconados y aceites hidrocarbonados.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde las CTC surgen de cánceres metastásicos o
 primarios/localizados.



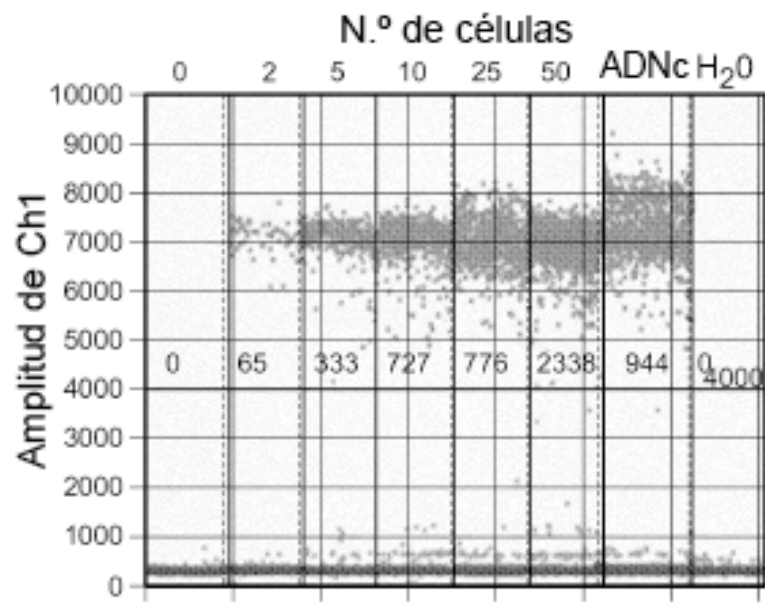


FIG. 2

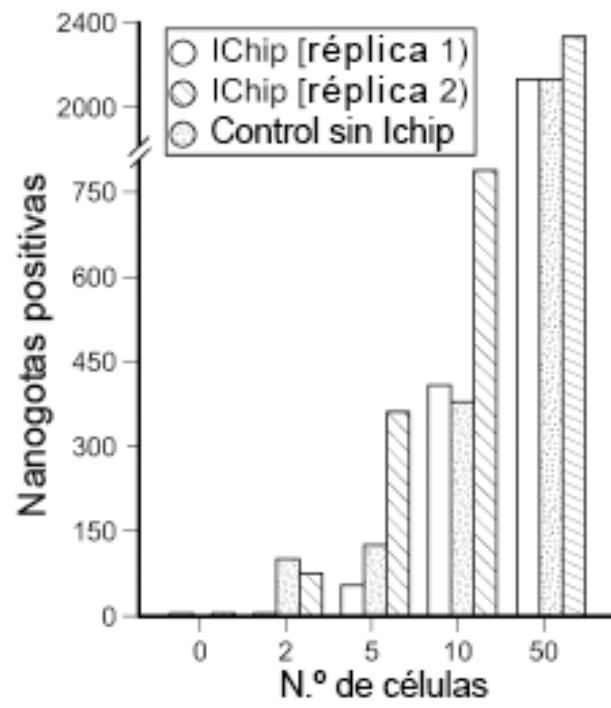


FIG. 3

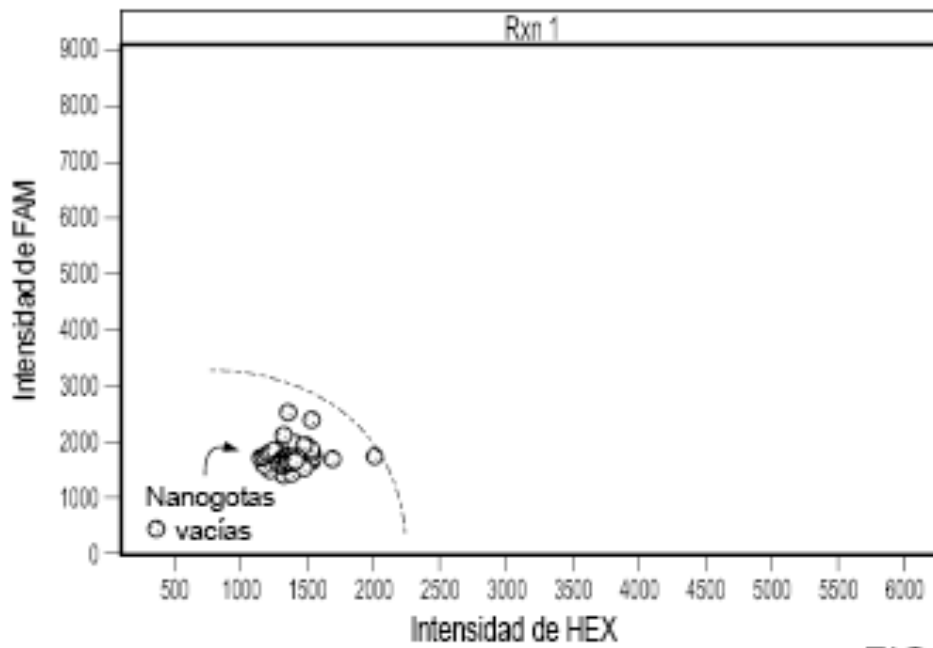


FIG. 4

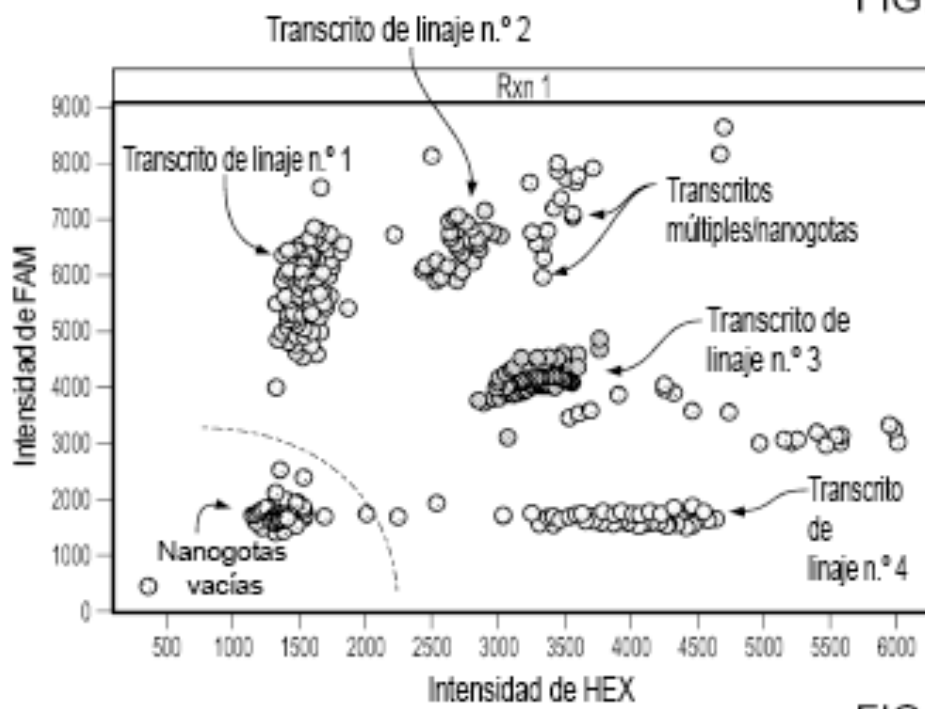


FIG. 5

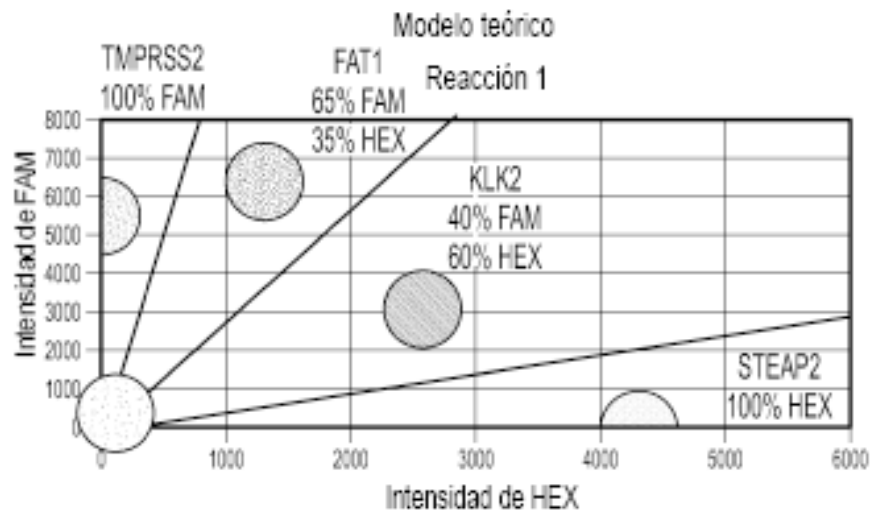


FIG. 6A

Datos de línea celular de cáncer de próstata

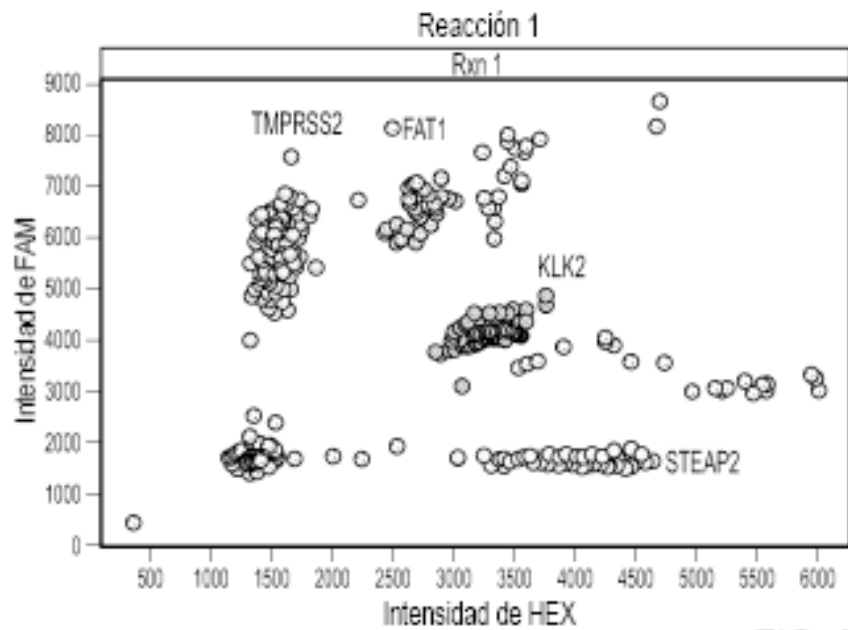


FIG. 6B

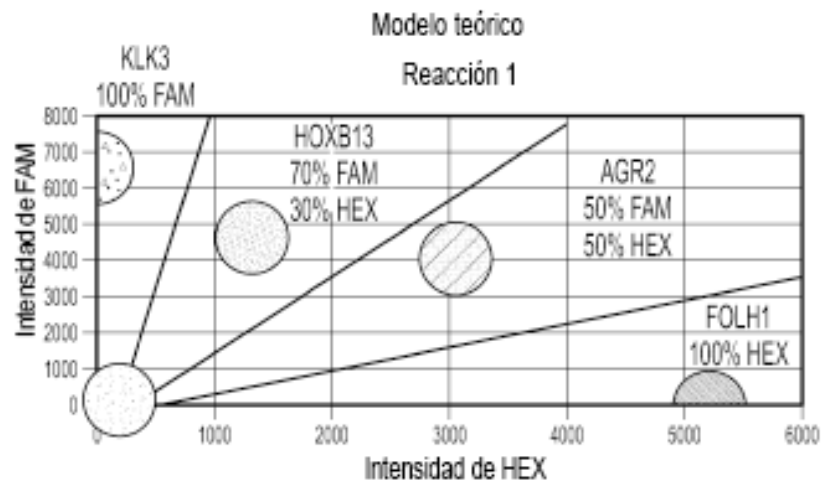


FIG. 7A

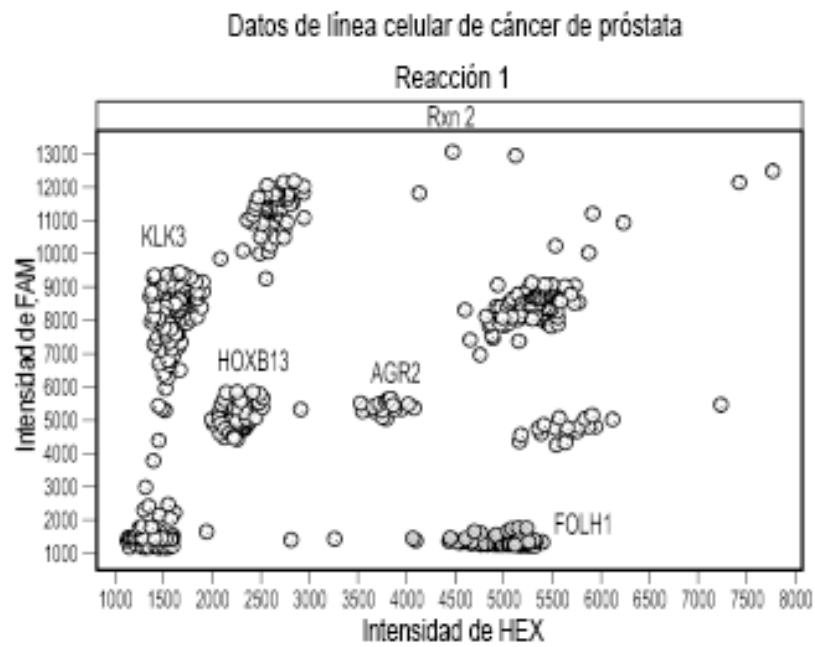


FIG. 7B

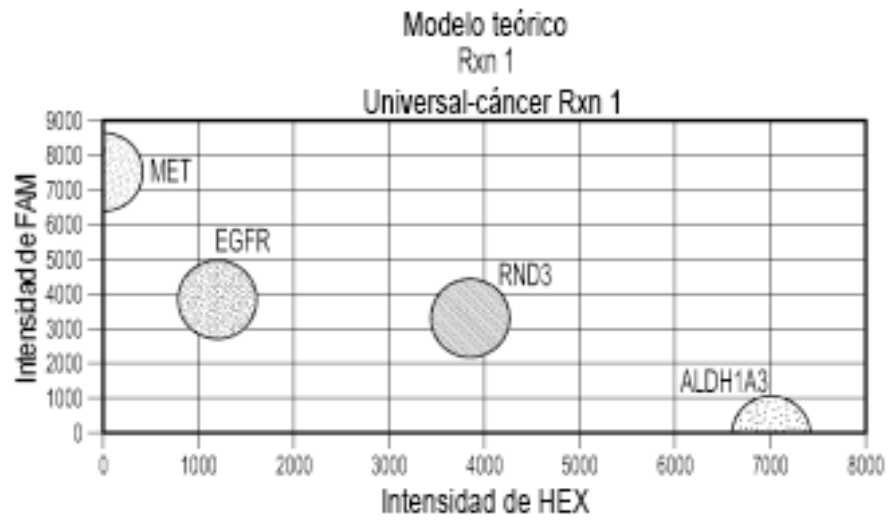


FIG. 8A

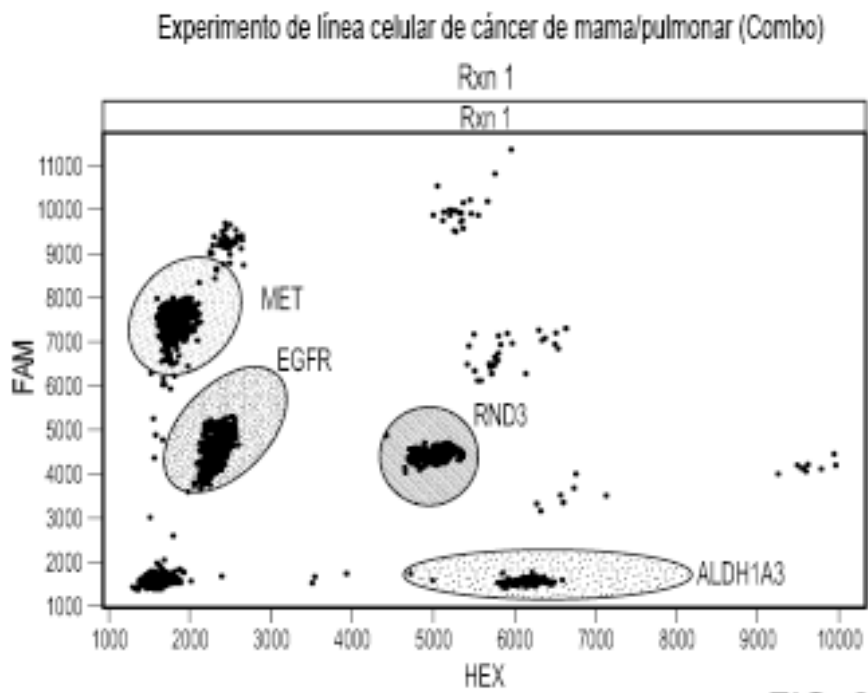


FIG. 8B

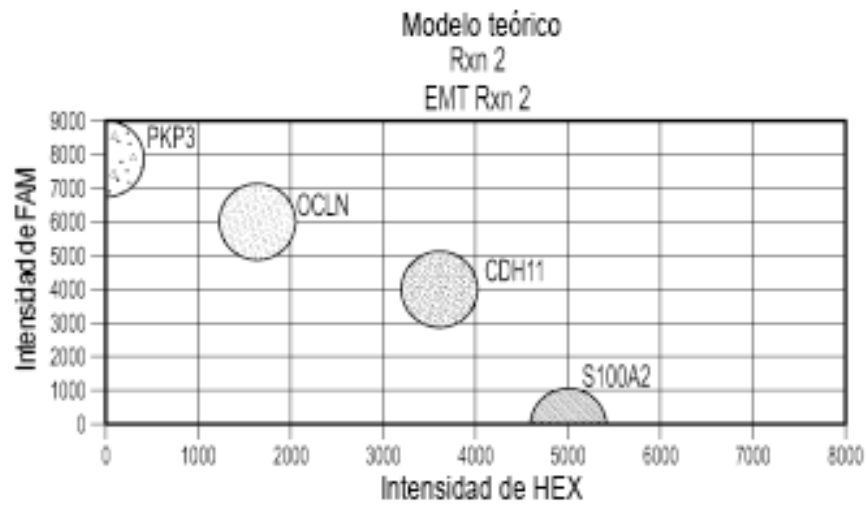


FIG. 9A

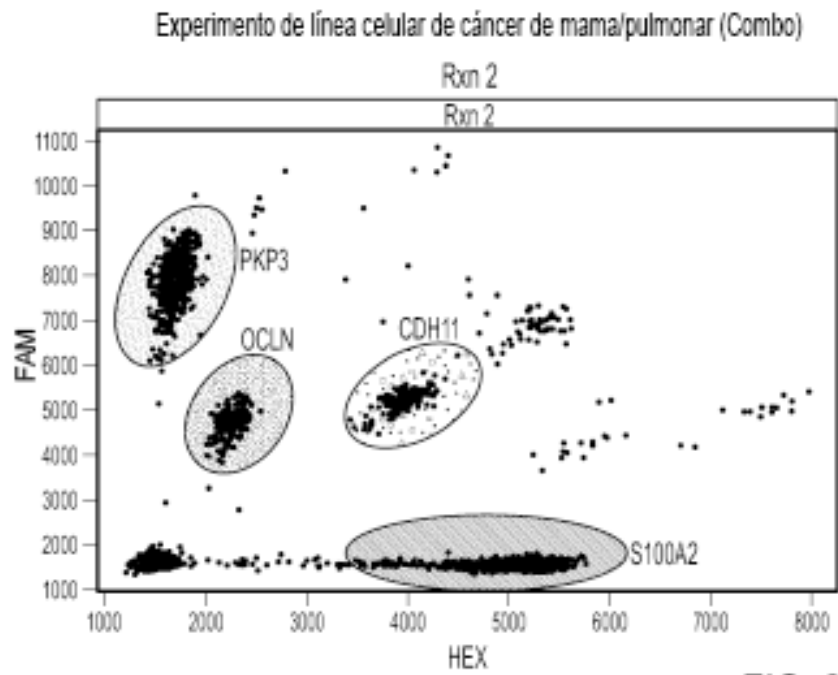


FIG. 9B

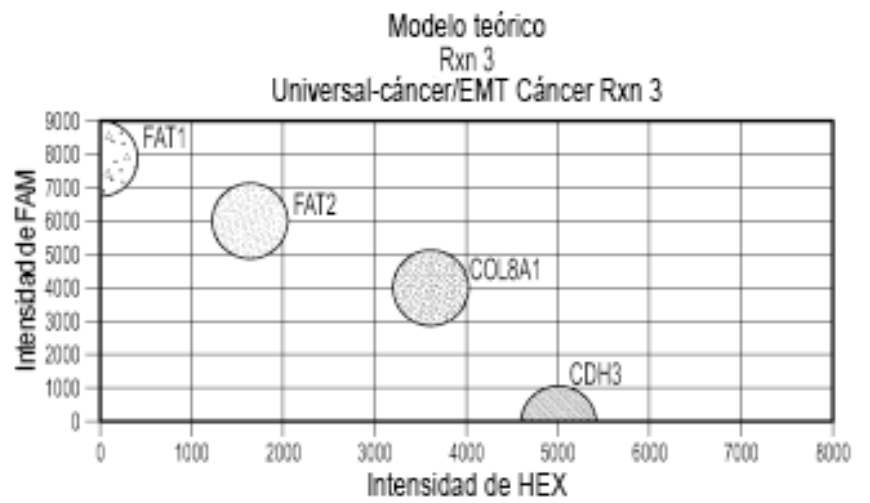


FIG. 10A

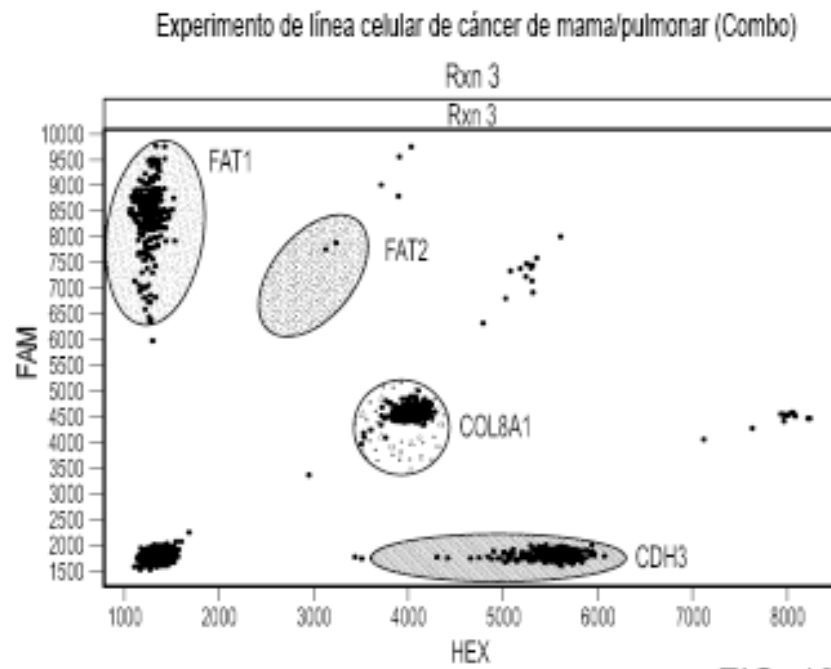


FIG. 10B

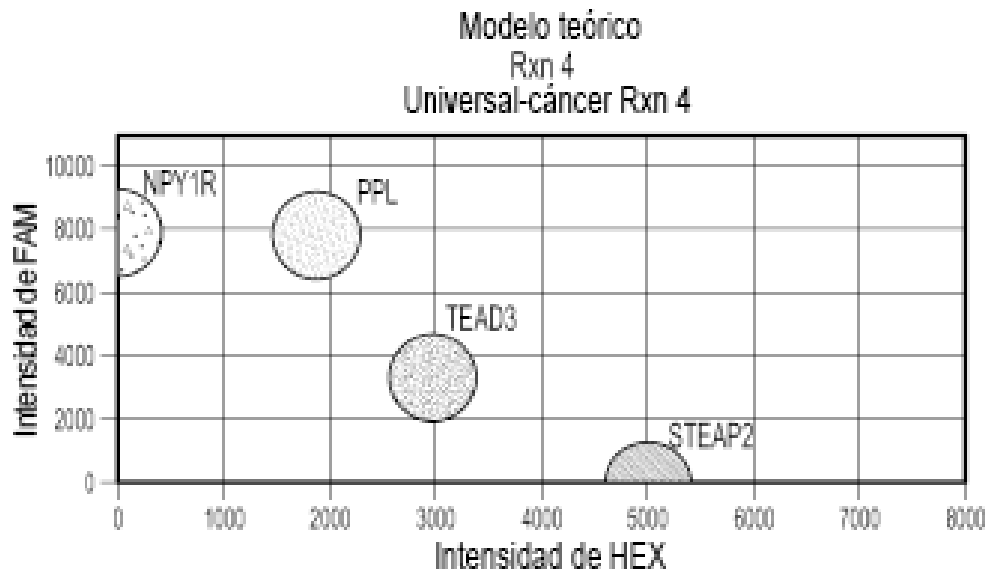


FIG.11A

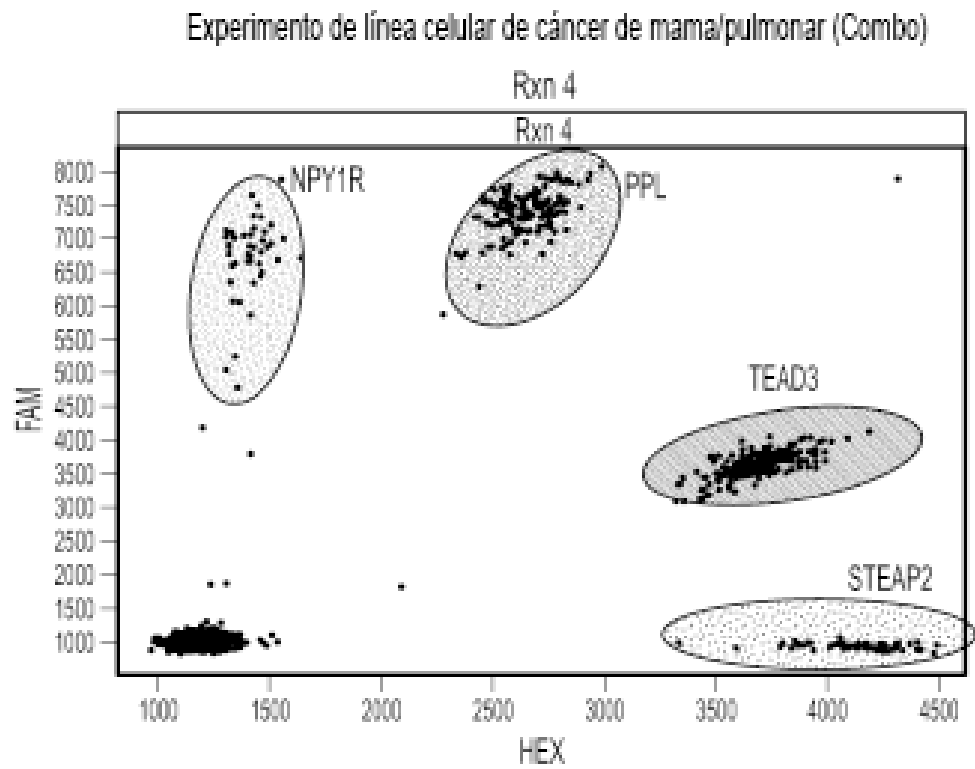


FIG. 11B

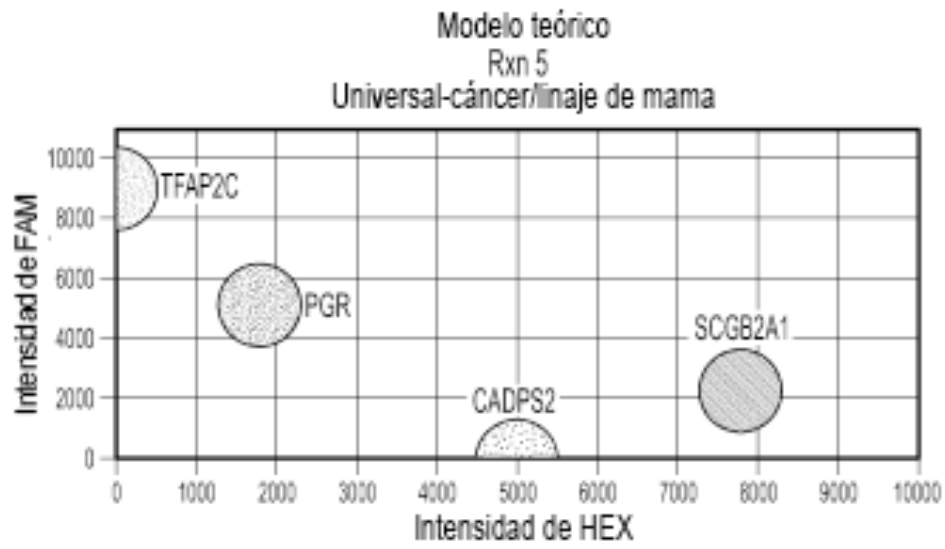


FIG.12A

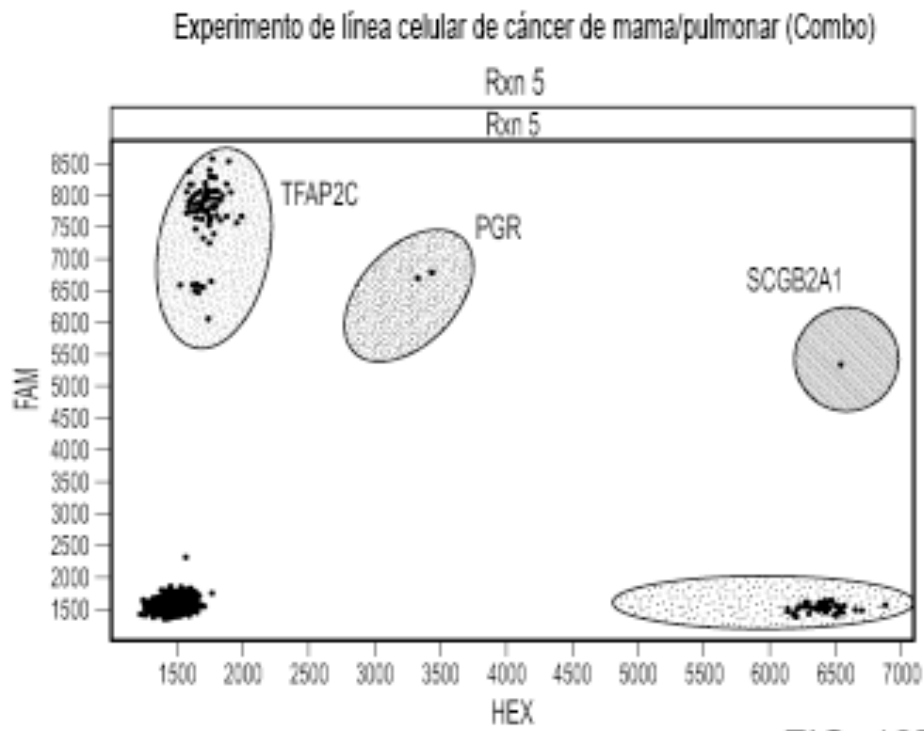


FIG. 12B

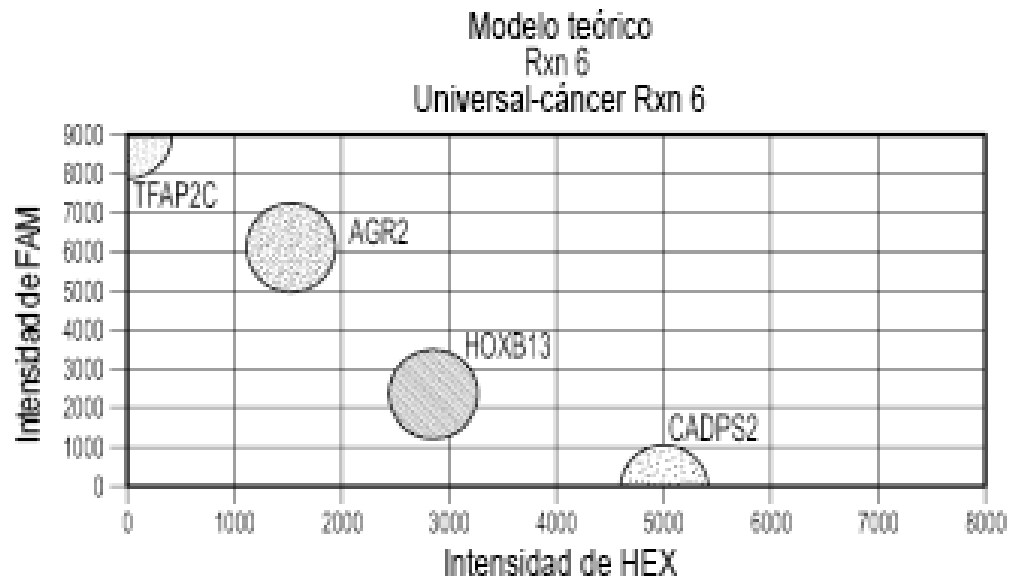


FIG. 13A

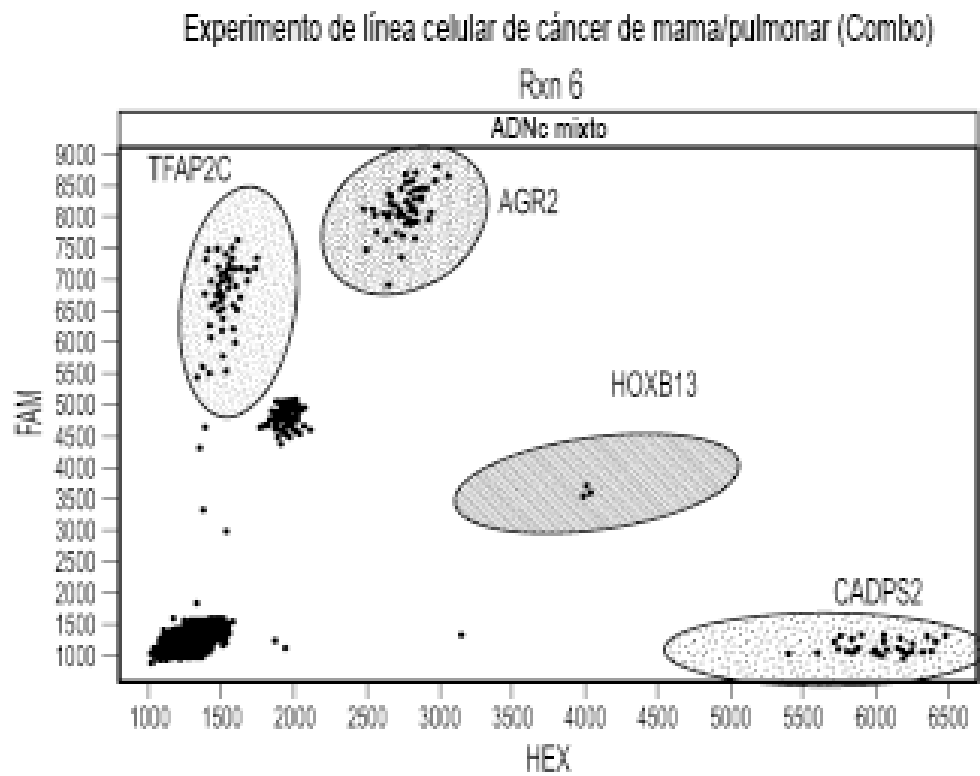


FIG. 13B

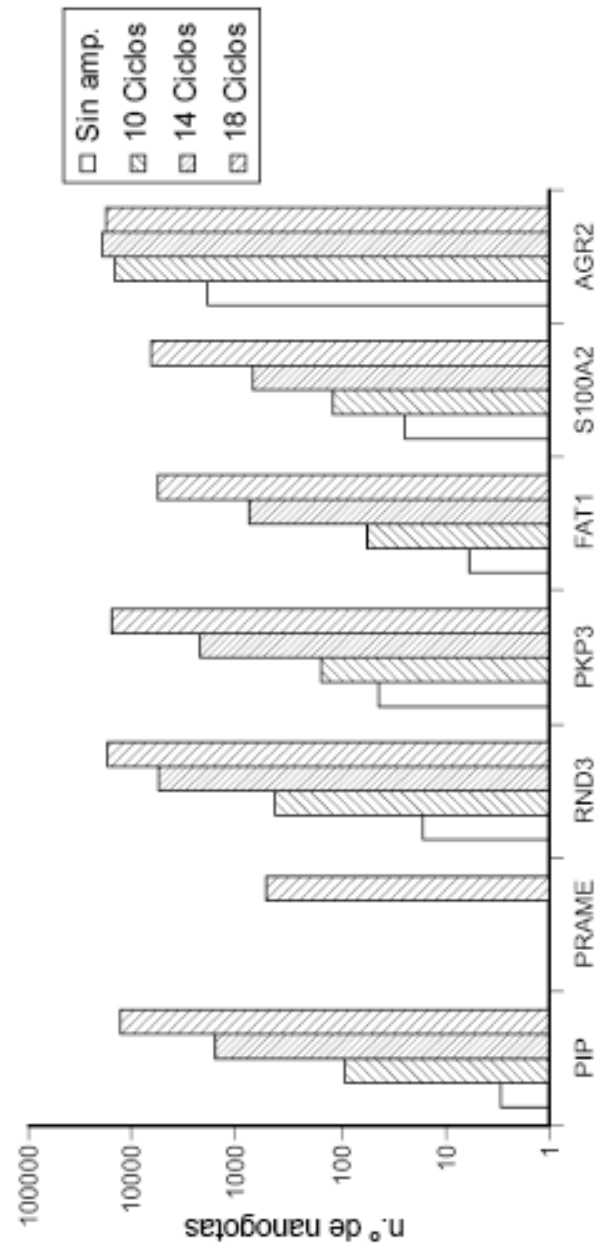
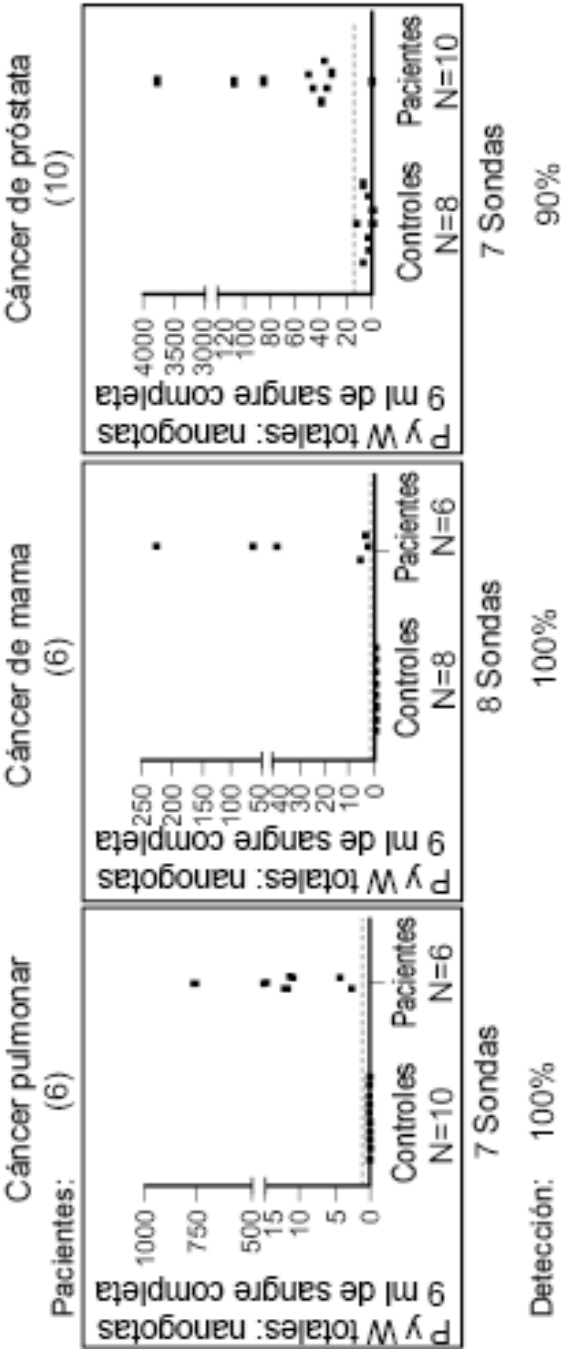


FIG. 14



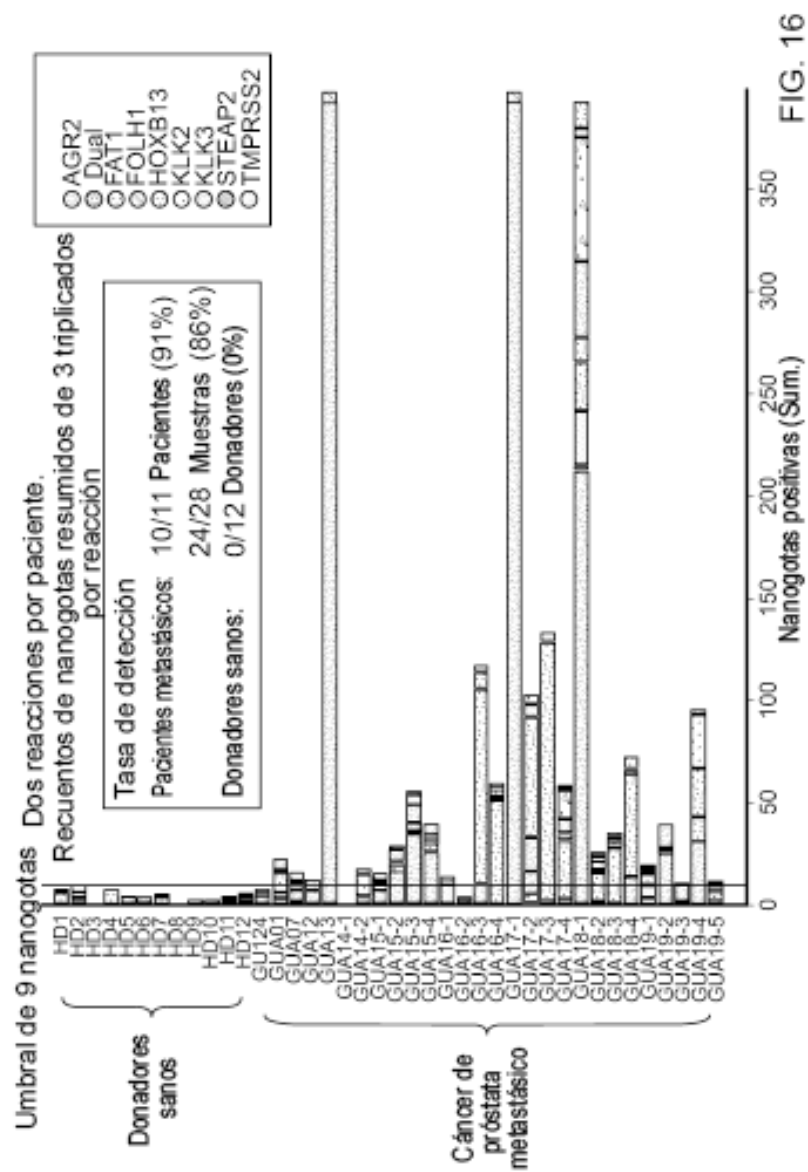


FIG. 16

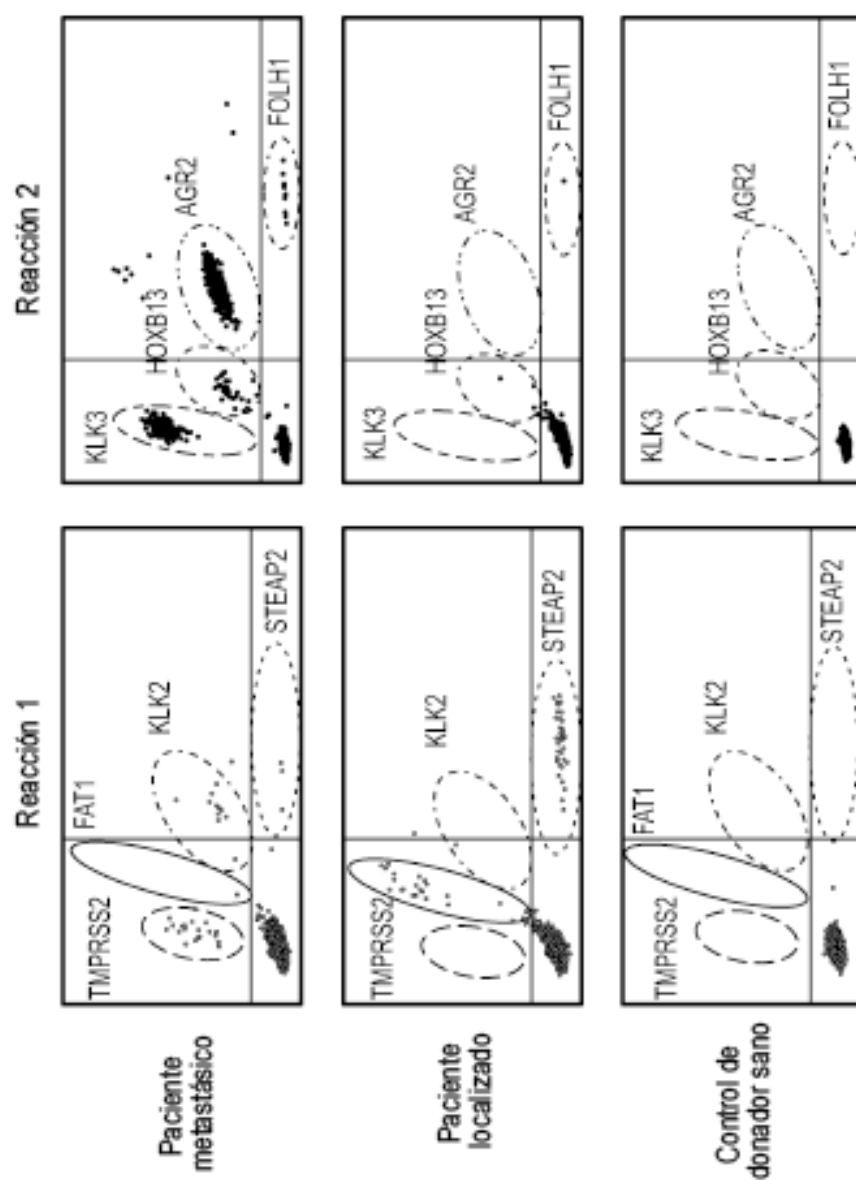


FIG. 17

Uso de marcadores de señalización de receptor de andrógenos para lectura de respuesta al fármaco

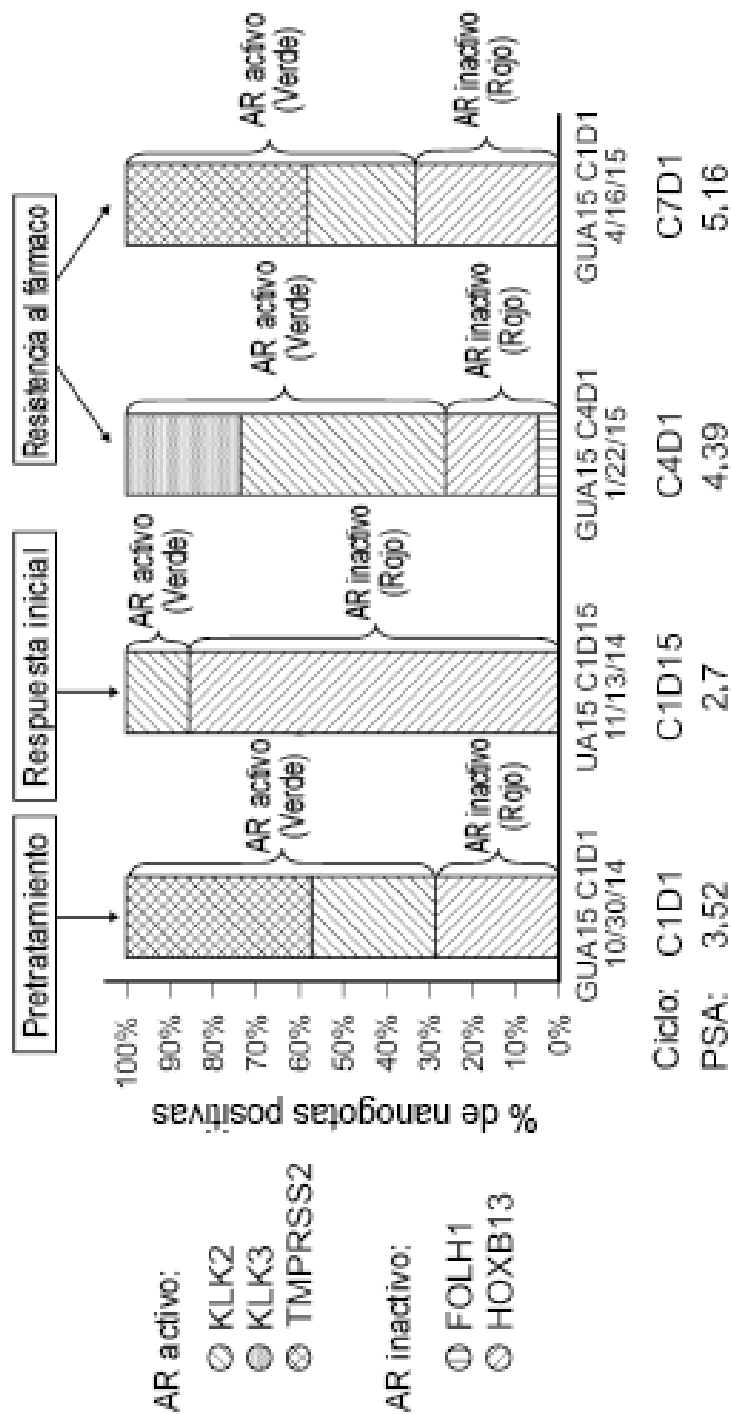


FIG. 18

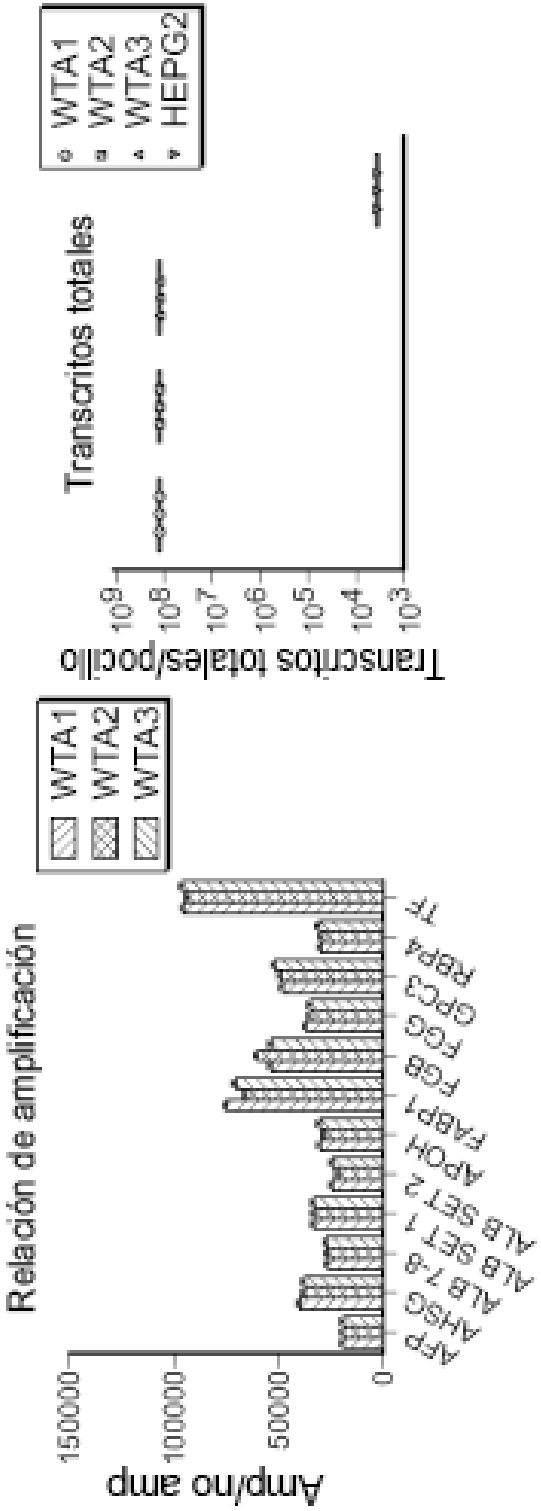


FIG. 19A

FIG. 19B

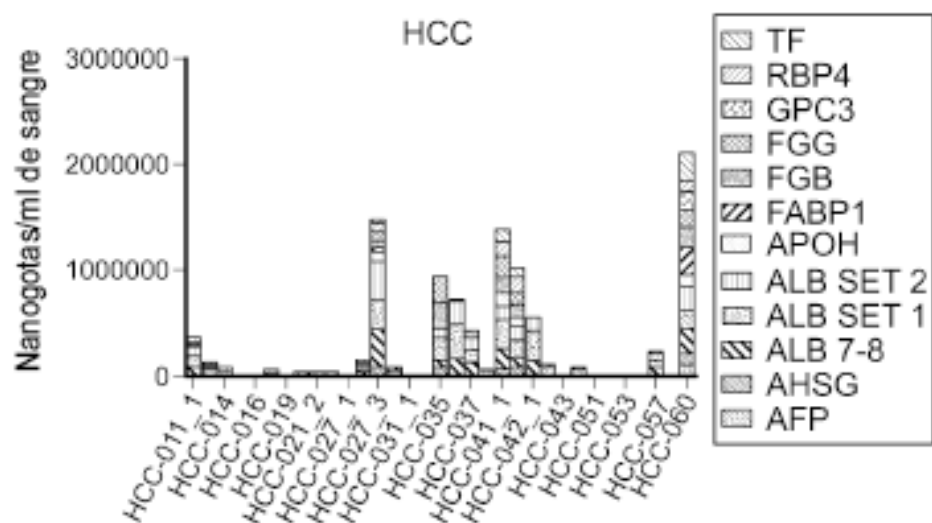


FIG. 20A

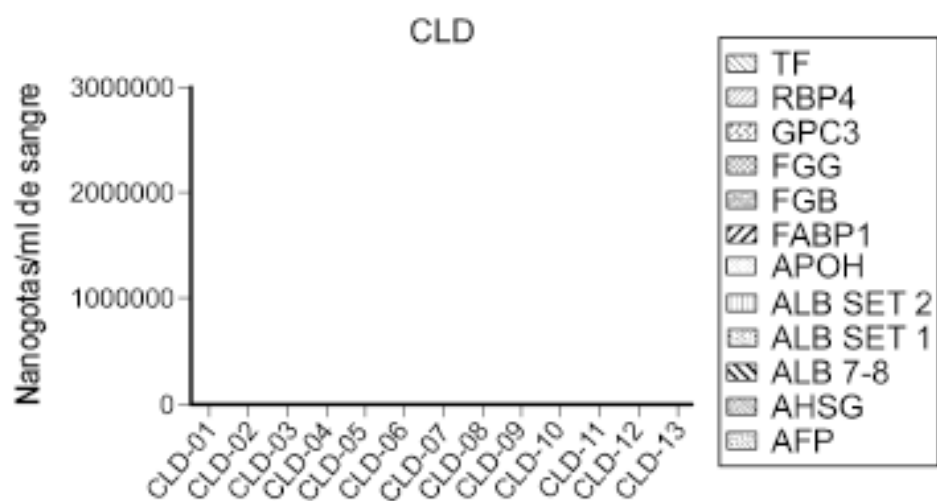


FIG. 20B

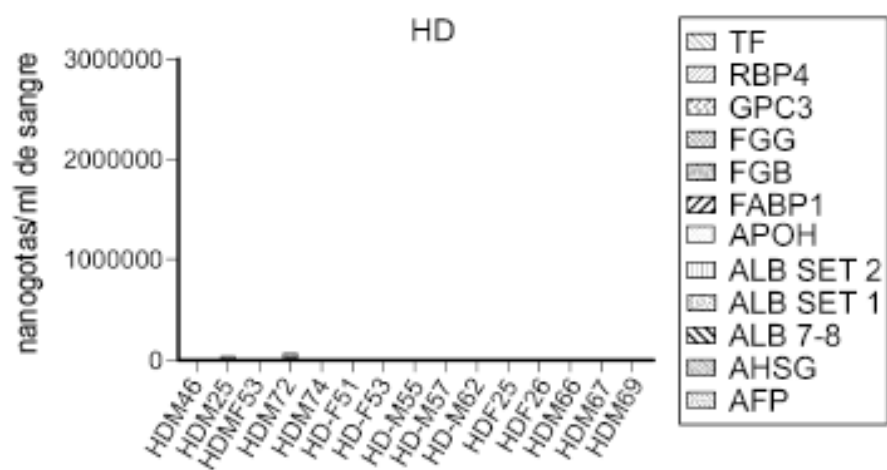


FIG. 20C

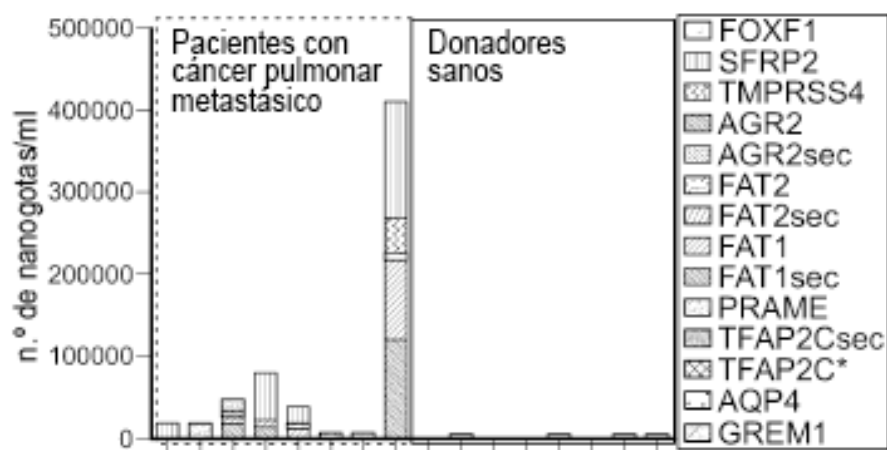


FIG. 21A

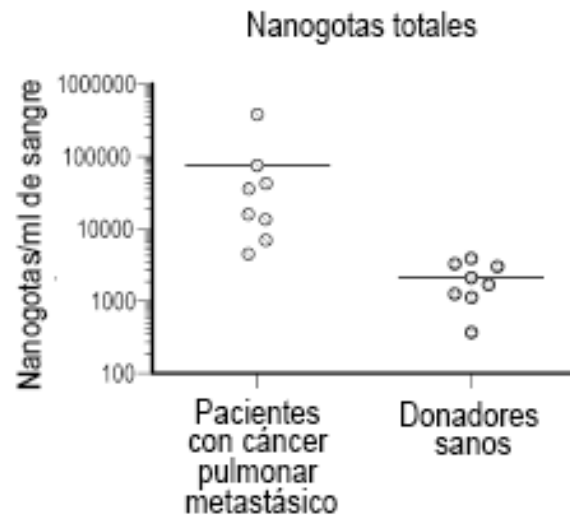


FIG. 21B

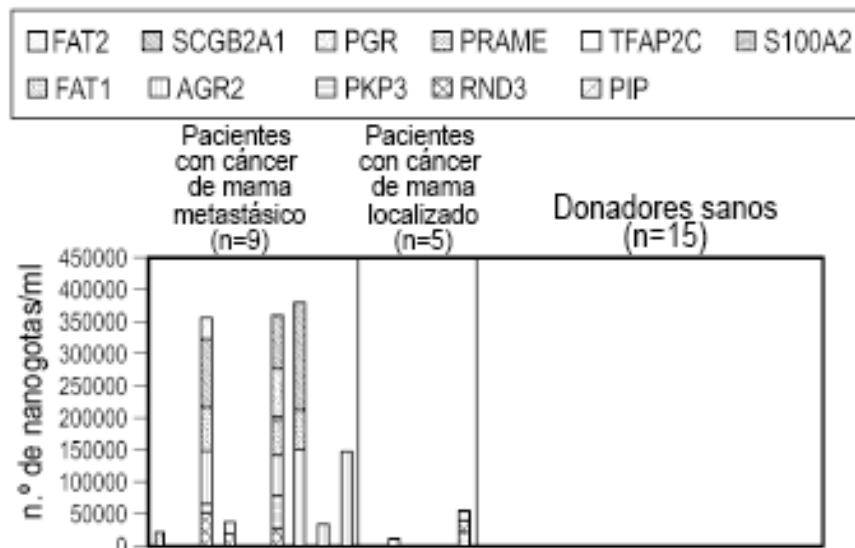


FIG. 22

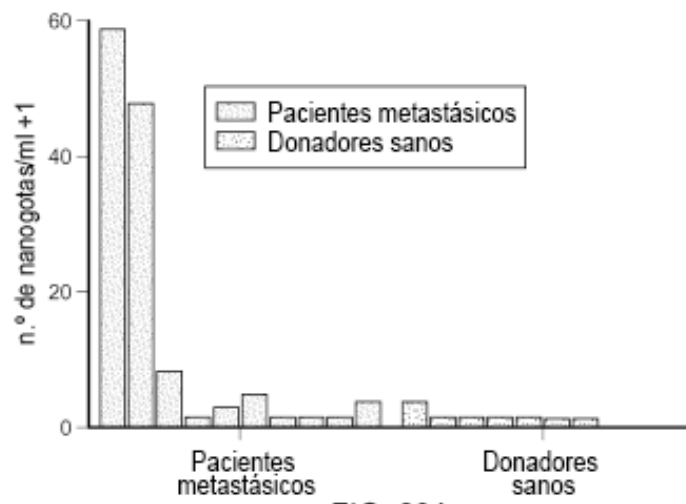


FIG. 23A

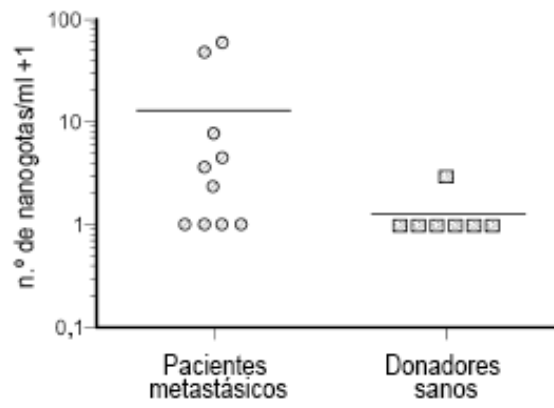


FIG. 23B

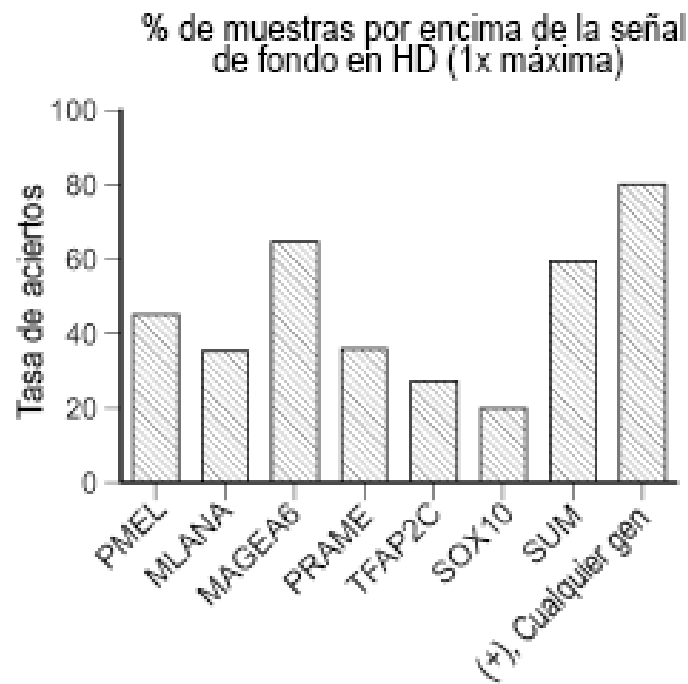


FIG. 24A

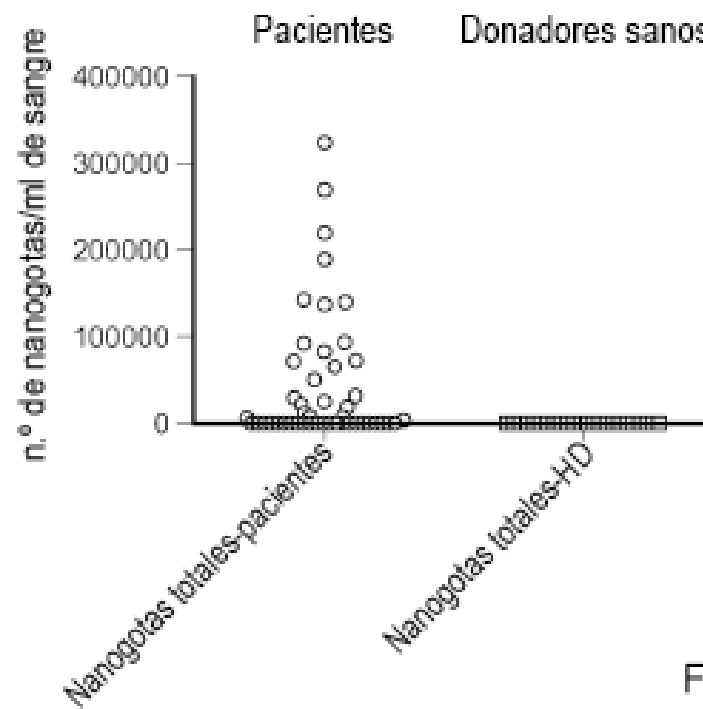


FIG. 24B