

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 867**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2017 PCT/US2017/037549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17218702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2017 E 17814042 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023 EP 3469367**

54 Título: **Análogos de éteres de fosfolípidos para la identificación y aislamiento de células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

14.06.2016 US 201662349713 P

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

06.11.2023

73 Titular/es:

**CELLECTAR BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
100 Campus Drive Suite 207
Florham Park, NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**WEICHERT, JAMEY;
PAK, CHOROM;
PINCHUK, ANATOLY;
KOZAK, KEVIN y
LONGINO, MARC**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 952 867 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

Análogos de éteres de fosfolípidos para la identificación y aislamiento de células tumorales circulantes

5 Solicitud(es) relacionada(s)

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos núm. 62/349,713, presentada el 14 de junio de 2016.

10 Antecedentes

Las células tumorales circulantes ("CTC") son un marcador de la sangre que se supone que tiene un valor predictivo y pronóstico en la detección y progresión del cáncer. Específicamente, se teoriza que las CTC son una fuente mínimamente invasiva de células tumorales tanto del tumor primario como de los sitios metastásicos. (Alix-Panabieres C y otros, Challenges in circulating tumour cell research, Nat Rev Cancer, septiembre de 2014, 14(9), 623-31 y Yap T y otros, Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker, Clin Cancer Res, 15 de mayo de 2014, 20(10), 2553-68.) Se conoce o se prevé que muchos tipos de cáncer, incluido el mieloma múltiple, dan lugar a las CTC. Paiva B y otros, Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile, Blood, 21 de noviembre de 2013, 122(22), 3591-3598. Además, se teoriza que las células madre cancerosas ("CSC"), otro posible tipo de célula cancerosa que se prevé que tiene valor pronóstico, son una subpoblación de las CTC. Scatena R y otros, Circulating tumour cells and cancer stem cells: a role for proteomics in defining the interrelationships between function, phenotype and differentiation with potential clinical applications, Biochim Biophys Acta, abril de 2013; 1835(2), 129-143; Faltas B. Cornering metastases: therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells, Front Oncol, 3 de julio de 2012, (2)68. Por definición, una CTC es una célula nucleada, negativa para CD45, positiva para la molécula de adhesión de células epiteliales ("EpCAM") y positiva para todas las citoqueratinas. Sin embargo, la identificación y el aislamiento de las CTC a partir de la sangre completa es un desafío técnico porque las CTC son extremadamente raras y pueden estar a una concentración tan baja como 1 célula en 7,5 mililitros ("ml") de sangre (es decir, 1 en varios billones de células).

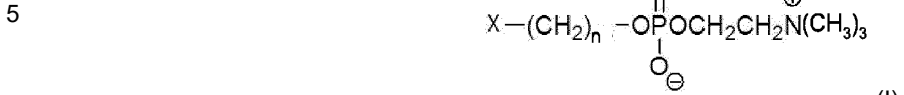
Actualmente, la única indicación aceptada y aprobada para las CTC es la enumeración como marcador pronóstico de la progresión del cáncer. El sistema CellSearch® (CellSearch es una marca registrada de Johnson & Johnson Corp) es, actualmente, el único ensayo aprobado por la FDA para enumerar las CTC. (Ignatiadas M y otros, Circulating tumor cells and circulating tumor DNA for precision medicine: dream or reality?, Ann Oncol, diciembre de 2014, 25(12), 2304-13 y Toss A y otros, CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine, Ann Transl Med, noviembre de 2014, 2(11):108, 1-16.) Desafortunadamente, CellSearch® solo está aprobado para el cáncer metastásico de mama, colorrectal y de próstata. (Hayes DF y otros, Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival, Clin Cancer Res, 15 de julio de 2006, 12(1), 4218-24; Cristofanilli M y otros, Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, N Engl J Med, 19 de agosto de 2004, 351(8), 781-91; De Bono JS y otros, Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer, Clin Cancer Res, 1 de octubre de 2008, 14(19), 6302-9; y Cohen SJ y otros, Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer, J Clin Oncol, 1 de julio de 2008, 26(19), 3213-21.)

Aún existen desafíos para identificar las CTC bajo la definición actual. En primer lugar, existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a las células epiteliales circulantes positivas para EpCAM. En segundo lugar, pueden producirse resultados falsos negativos debido a que las células tumorales experimentan una transición de epitelial a mesenquimatoso que resulta en la expresión reducida de marcadores epiteliales. (Yu M y otros, Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition, Science, 1 de febrero de 2013, 339(6119), 580-4.) En tercer lugar, existe evidencia creciente en la bibliografía de que no todas las CTC expresan EpCAM y que determinados tipos de cáncer, tal como el cáncer renal, tienen una expresión baja o heterogénea de EpCAM. (Eichelberg C y otros, Epithelial cell adhesion molecule is an independent prognostic marker in clear cell renal carcinoma, Int J Cancer, 15 de junio de 2013, 132(12), 2948-55 y Spizzo G y otros, EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis, J Clin Pathol, mayo de 2011, 64(5):415-20.) El documento US 2012/178645 describe un método para diagnosticar el cáncer en un sujeto, dicho método comprende las etapas de proporcionar una muestra biológica de un sujeto y determinar la expresión del gen MCAM en una célula tumoral circulante en dicha muestra biológica. El documento US 2007/020178 describe métodos para tratar, detectar y localizar la recurrencia del cáncer, el cáncer insensible a la radiación y la quimioterapia o la metástasis del cáncer en tumores. El documento US 2009/0047656 describe un método para propagar las células de interés obtenidas a partir de un espécimen biológico. Por tanto, existe la necesidad clínica de un ensayo robusto y económico que use un marcador tumoral amplio que pueda identificar, posiblemente y sin sesgos, todas las CTC. Los análogos de alquilfosfolina ("APC") dirigidos al cáncer ofrecen un método nuevo para la identificación y el aislamiento de las CTC a partir de una amplia gama de diferentes tipos de cáncer.

65

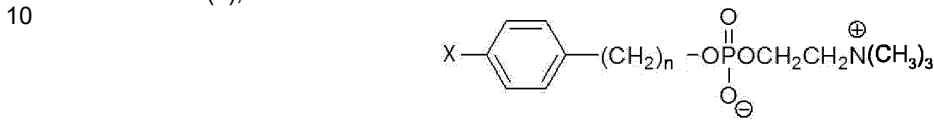
Resumen de la invención

La presente invención se dirige a un método para identificar una o más células tumorales circulantes que comprende:
 (i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I),



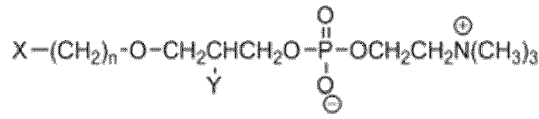
fórmula (I),

(I),



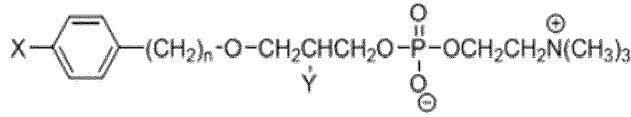
(II),

fórmula (III)



(III),

o fórmula (IV)



(IV),

en donde:

n es un número entero de 16 a 30;

Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde

R¹ es un alquilo; y

X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador; y

30

35

(ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, en donde la una o más CTC se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer colorrectal, una célula madre cancerosa, una célula de leucemia y una célula de linfoma.

La presente invención se dirige además a un método para aislar una o más células tumorales circulantes que comprende las etapas de:

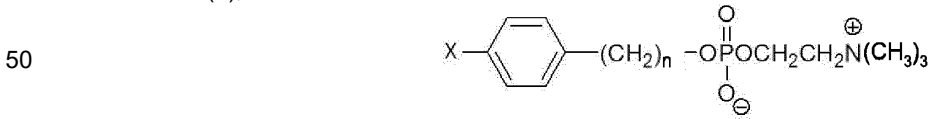
40

(i) administrar a un sujeto una composición que comprende un compuesto de fórmula (I),



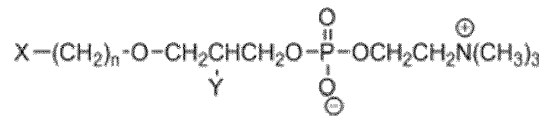
fórmula (I),

(I),



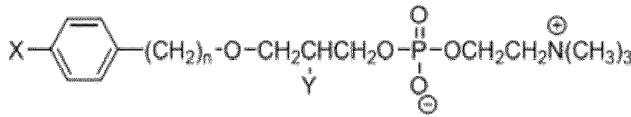
(II),

fórmula (III)



(III),

o fórmula (IV)



(IV),

en donde:

n es un número entero de 16 a 30;

65

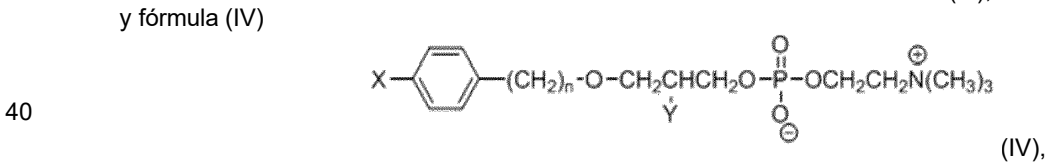
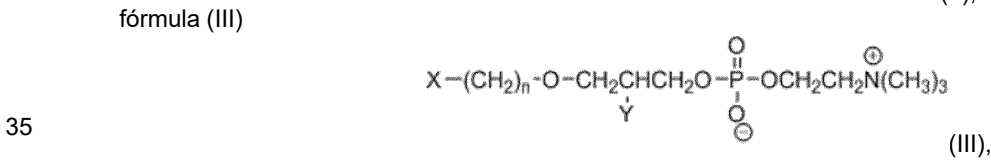
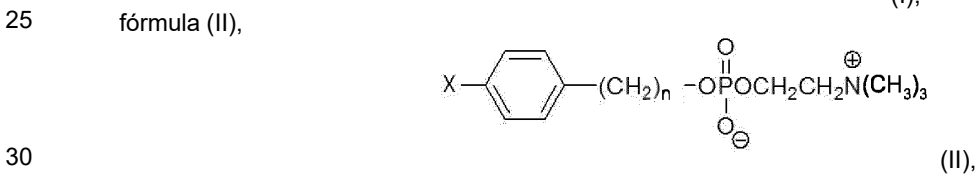
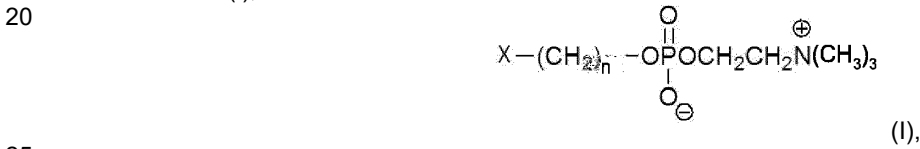
Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo; y X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador; y

5 (ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a citometría de flujo o a un campo magnético, en donde la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto se somete a citometría de flujo cuando X es una molécula luminiscente;

10 en donde la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto se somete a un campo magnético cuando X es una perla magnética unida a través de un enlazador; y en donde la una o más CTC se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer colorrectal, una célula madre cancerosa, una célula de leucemia y una célula de linfoma.

15 En una modalidad, la una o más células tumorales circulantes comprenden células madre cancerosas.

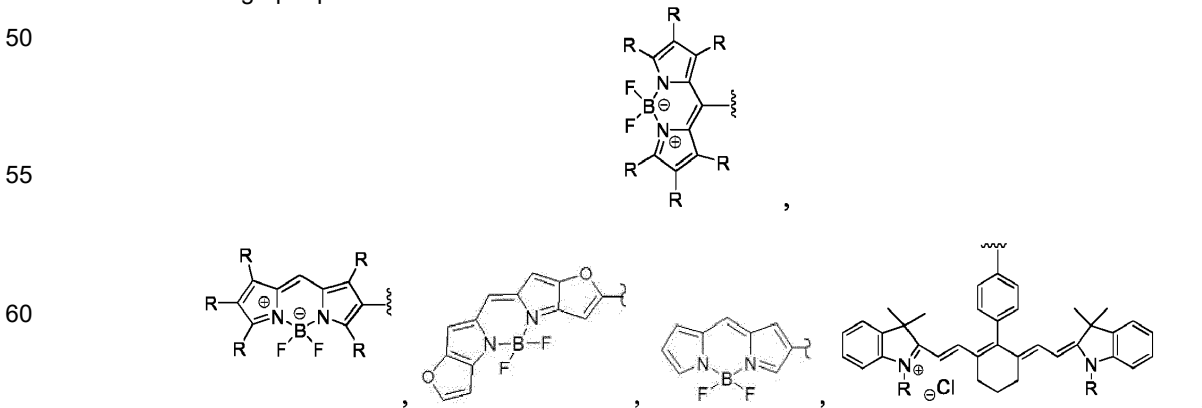
20 El análogo de PLE unido a un artículo de la presente invención es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (I),

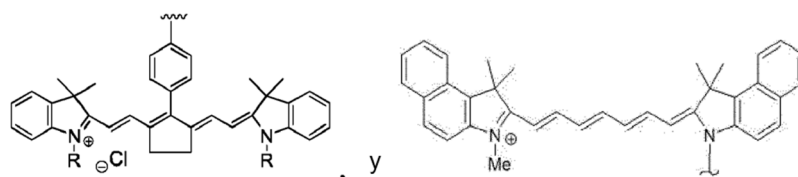


en donde:

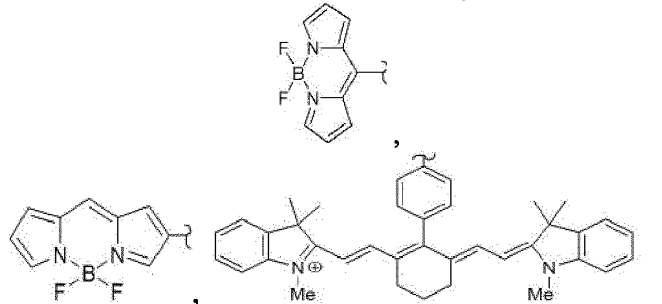
45 n es un número entero de 16 a 30, preferentemente 18; Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo; y X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador.

50 En una modalidad preferida, la molécula luminiscente es un fluoróforo, con mayor preferencia, el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en





en donde cada R se selecciona independientemente de H, CH₃, C₂H₅ y C₃H₇, con la máxima preferencia



En otra modalidad preferida, la perla magnética se selecciona del grupo que consiste en perlas nanomagnéticas, perlas micromagnéticas, perlas paramagnéticas y perlas superparamagnéticas, en donde la perla magnética se une al análogo de PLE a través de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en un enlazador de biotina-estreptavidina, un enlazador de azetidiona y un enlazador de grupos amina, azida, alquino, carboxilo e hidroxilo y sus combinaciones.

La una o más células tumorales circulantes de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal, una célula de mieloma múltiple, una célula madre cancerosa, preferentemente una célula de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal y, con mayor preferencia, una célula de cáncer de próstata o una célula de cáncer de páncreas.

En otra modalidad preferida, los métodos de la presente invención pueden utilizarse en tecnologías de adquisición de datos subsiguientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de proteínas, aislamiento de ARN, aislamiento de ADN, análisis de translocación de genes y/o amplificación e hibridación fluorescente in situ.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Análisis gráfico de células CD45-, CD34- aisladas del paciente 108 (cáncer colorrectal). El panel A muestra las células teñidas con todos los marcadores excepto CD14. El panel B muestra las células teñidas con todos los marcadores. El cuadrante superior izquierdo indica las células CD14-/CLR1501+, el superior derecho indica CD14+/CLR1501+, el inferior derecho indica CD14+/CLR1501- y el inferior izquierdo indica CD14-/CLR1501-.

Descripción detallada de la invención

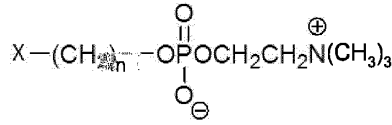
Los análogos de PLE tienen la capacidad de identificar, aislar y permitir el análisis subsiguiente de las CTC de todo tipo. Las células cancerosas tienen de cinco a diez veces más balsas lipídicas que las células sanas. Las balsas lipídicas son regiones especializadas de la bicapa de fosfolípidos de la membrana que contienen altas concentraciones de colesterol y esfingolípidos y sirven para organizar la superficie celular y las moléculas de señalización intracelulares (por ejemplo, factor de crecimiento y receptores de citocinas, la vía de supervivencia de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt). Los datos sugieren que las balsas lipídicas sirven como portales de entrada para los PLE. La marcada selectividad de estos compuestos por las células cancerosas frente a las células no cancerosas se atribuye a la alta afinidad de los PLE por el colesterol y la abundancia de balsas lipídicas ricas en colesterol en las células cancerosas. El papel fundamental que desempeñan las balsas lipídicas se destaca por el hecho de que la alteración de la arquitectura de las balsas lipídicas suprime la captación de los PLE en las células cancerosas. Se ha demostrado que la captación de los PLE se reduce en un 60 % cuando se bloquea la formación de las balsas lipídicas.

Los resultados preliminares obtenidos en más de 55 modelos tumorales de xenoinjerto y espontáneos han demostrado universalmente que CLR1404 experimenta una captación selectiva y una retención prolongada en los tumores. Weichert, JP y otros, Alkylphosphocholine analogs for broad-spectrum cancer imaging and therapy, Sci Transl Med, 11 de junio de 2014, 6(240ra75). Lo que no se conocía anteriormente era si los análogos de PLE podían ser absorbidos por las CTC en la medida en que las CTC pudieran identificarse y aislarse.

La presente invención se dirige a un método para identificar una o más células tumorales circulantes que comprende:

(i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I),

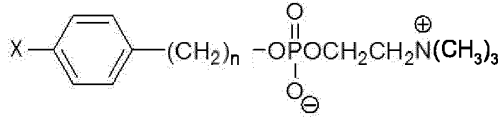
5



(I),

fórmula (II),

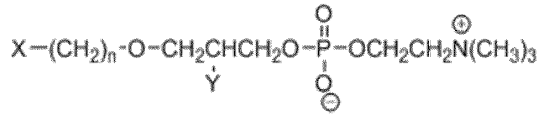
10



(II),

fórmula (III)

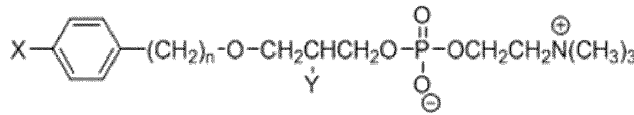
15



(III),

o fórmula (IV)

20



(IV),

25

en donde:

n es un número entero de 16 a 30;

Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo; y

X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador; y

30

(ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, en donde la una o más CTC se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer colorrectal, una célula madre cancerosa, una célula de leucemia y una célula de linfoma.

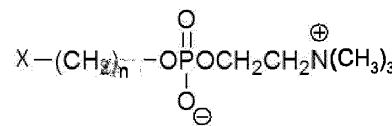
35

La presente invención se dirige además a un método para aislar una o más células tumorales circulantes que comprende las etapas de:

40

(i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I),

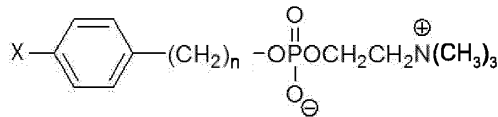
45



(I),

fórmula (II),

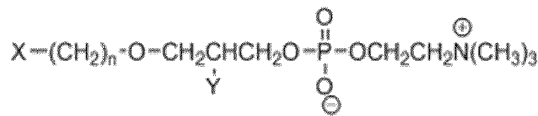
50



(II),

fórmula (III)

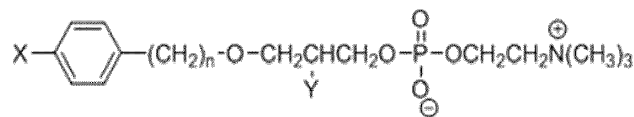
55



(III),

o fórmula (IV)

60



(IV),

en donde:

65

n es un número entero de 16 a 30;

Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo; y

X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador; y

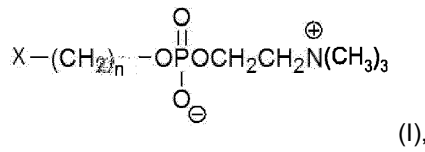
(ii) someter una muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a citometría de flujo, preferentemente a la clasificación de células activada por fluorescencia o a un campo magnético, en donde

la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto se somete a citometría de flujo cuando X es una molécula luminiscente;

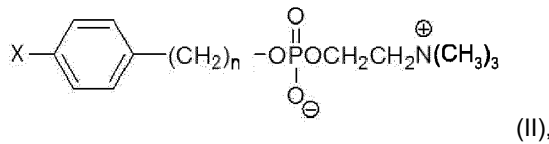
en donde la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto se somete a un campo magnético cuando X es una perla magnética unida a través de un enlazador; y

en donde la una o más CTC se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer colorrectal, una célula madre cancerosa, una célula de leucemia y una célula de linfoma.

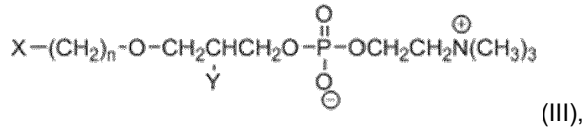
El análogo de PLE unido a un artículo de la presente invención es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la fórmula (I),



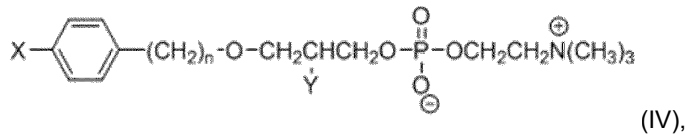
fórmula (II),



fórmula (III)



y fórmula (IV)



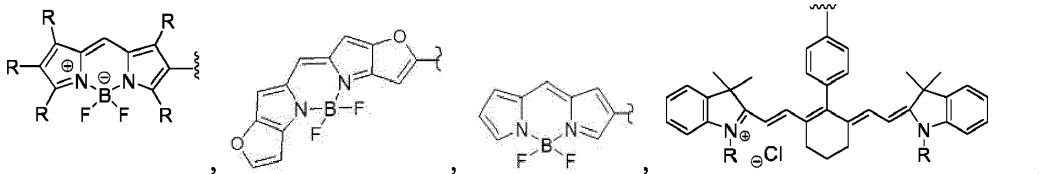
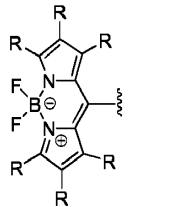
en donde:

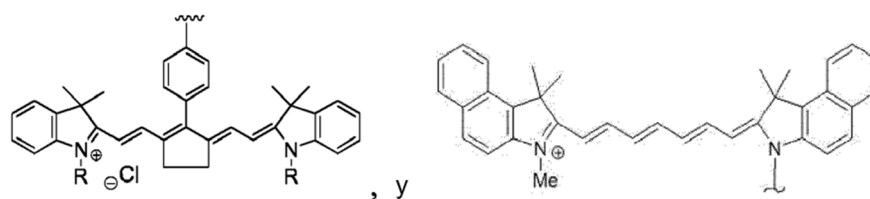
n es un número entero de 16 a 30, preferentemente 18;

Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo; y

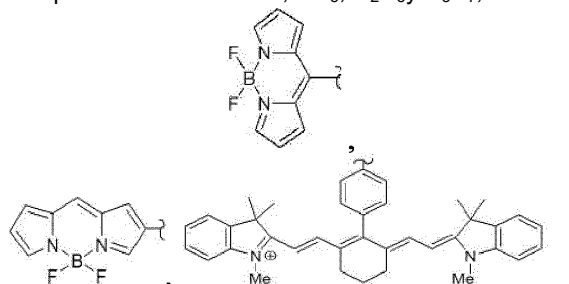
X es una molécula luminiscente o una perla magnética.

En una modalidad preferida, la molécula luminiscente es un fluoróforo, con mayor preferencia, el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en





en donde cada R se selecciona independientemente de H, CH₃, C₂H₅ y C₃H₇, con la máxima preferencia



En otra modalidad preferida, la perla magnética se selecciona del grupo que consiste en perlas nanomagnéticas, perlas micromagnéticas, perlas paramagnéticas y perlas superparamagnéticas, en donde la perla magnética se une al análogo de PLE a través de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en un enlazador de biotina-estreptavidina, un enlazador de azetidina y un enlazador de grupos amina, azida, alquino, carboxilo e hidroxilo y sus combinaciones.

La una o más células tumorales circulantes de la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de cuello uterino, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal y una célula madre cancerosa y una célula plasmática maligna, preferentemente una célula de cáncer de próstata o una célula de cáncer de páncreas.

En otra modalidad preferida, los métodos de la presente invención pueden utilizarse en tecnologías de adquisición de datos subsiguientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de proteínas, aislamiento de ARN, aislamiento de ADN, análisis de translocación de genes y/o amplificación e hibridación fluorescente in situ.

Definiciones

En general, la referencia a "una célula tumoral circulante" se refiere a una sola célula, mientras que la referencia a "células tumorales circulantes" o "conglomerado de células tumorales circulantes" se refiere a más de una célula cancerosa. Sin embargo, un experto en la técnica entendería que la referencia a "células tumorales circulantes" pretende incluir una población de células tumorales circulantes que incluye una o más células tumorales circulantes, mientras que la referencia a "una célula tumoral circulante" podría incluir más de una célula tumoral circulante.

El término "célula tumoral circulante" o "células tumorales circulantes", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier célula cancerosa o conglomerado de células cancerosas que se encuentran en la muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto. Las CTC también pueden contener o consistir en una célula madre cancerosa o un conglomerado de células madre cancerosas que se encuentran en la muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto.

Como se usa en la presente descripción, el término "célula madre cancerosa" se refiere a una célula cancerosa capaz de autorrenovarse y diferenciarse en los distintos tipos de células cancerosas que se encuentran en un tumor maligno.

El término "cáncer", como se usa en la presente descripción, se refiere, pero no se limita a, una variedad de tipos de cáncer, que incluyen el cáncer de mama, que incluye el cáncer de mama masculino; cánceres digestivos/gastrointestinales que incluyen cáncer anal, cáncer de apéndice, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumores del estroma gastrointestinal ("GIST"), tumores de células de los islotes, cáncer de hígado primario en adultos, cáncer de hígado infantil, cáncer de páncreas, cáncer de recto, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago (gástrico); cánceres endocrinos y neuroendocrinos que incluyen adenocarcinoma pancreático, carcinoma adrenocortical, tumores neuroendocrinos pancreáticos, carcinoma de células de Merkel, tumor neuroendocrino de pulmón no microcítico, tumor neuroendocrino de pulmón microcítico, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, tumor pituitario y cáncer de tiroides; cánceres de ojo que incluyen melanoma y retinoblastoma intraocular; cáncer genitourinario que incluye cáncer de vejiga, cáncer de riñón (células renales), cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréter, cáncer testicular, cáncer de uretra y tumor de Wilms; cánceres de células germinales que incluyen cáncer del sistema nervioso central infantil, tumor de células germinales

extracraneal infantil, tumor de células germinales extragonadal, tumor de células germinales de ovario y cáncer testicular; cánceres ginecológicos que incluyen cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, tumor trofoblástico gestacional, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, sarcoma uterino, cáncer de vagina y cáncer de vulva; cánceres de cabeza y cuello, incluido el cáncer de hipofaringe, cáncer de laringe, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario oculto, cáncer de boca, cáncer de nasofaringe, cáncer de orofaringe, cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de faringe, cáncer de glándula salival y cáncer de garganta; leucemias que incluyen leucemia linfoblástica aguda del adulto, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mielóide aguda del adulto, leucemia mielóide aguda infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas; mieloma múltiple que incluye neoplasia de células plasmáticas; linfomas que incluyen linfoma relacionado con el SIDA, linfoma cutáneo de células T, linfoma de Hodgkin en adultos, linfoma de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin durante el embarazo, micosis fungoide, linfoma no Hodgkin en adultos, linfoma no Hodgkin infantil, linfoma no Hodgkin durante el embarazo, linfoma primario del sistema nervioso central, síndrome de Sézary y macroglobulinemia de Waldenström; cánceres musculoesqueléticos que incluyen sarcoma de Ewing, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno de hueso, rabdomiosarcoma infantil y sarcoma de tejido blando; cánceres neurológicos que incluyen tumor cerebral del adulto, tumor cerebral infantil, astrocitomas, glioma del tronco encefálico, tumor teratoide rabdoide atípico del sistema nervioso central, tumores embrionarios del sistema nervioso central, craneofaringioma, ependimoma, neuroblastoma, linfoma primario del sistema nervioso central (SNC); cánceres respiratorios/torácicos que incluyen cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico, mesotelioma maligno, timoma y carcinoma tímico; y cánceres de piel que incluyen sarcoma de Kaposi, melanoma y carcinoma de células escamosas.

Como se usa en la presente descripción, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra adecuada para los métodos proporcionados por la presente invención. La muestra puede ser cualquier muestra que incluya células tumorales circulantes adecuadas para la detección. Las fuentes de las muestras incluyen sangre completa, médula ósea, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva y lavados bronquiales. En un aspecto, la muestra es una muestra de sangre que incluye, por ejemplo, sangre completa o cualquier fracción o componente de la misma. Una muestra de sangre adecuada para su uso con la presente invención puede extraerse de cualquier fuente conocida que incluya células sanguíneas o componentes de las mismas, tales como sangre venosa, arterial, periférica, tisular y de cordón umbilical. Por ejemplo, una muestra puede obtenerse y procesarse mediante el uso de métodos clínicos rutinarios y bien conocidos (por ejemplo, procedimientos para extraer y procesar la sangre completa). En una modalidad, una muestra ilustrativa puede ser sangre periférica extraída de un sujeto con cáncer.

Como se usa en la presente descripción, el término "identificar" se refiere a visualizar la existencia de una CTC.

Como se usa en la presente descripción, el término "aislar" se refiere a separar físicamente las CTC de otros tipos de células que se encuentran en la muestra de un sujeto.

Como se usa en la presente descripción, el término "contacto" o "poner en contacto" se refiere a poner en contacto un sujeto, tejido, órgano o células con un análogo de PLE de la presente invención. Como se usa en la presente descripción, el contacto puede lograrse *ex vivo* o *in vitro*, es decir, en un tubo de ensayo, en células o tejidos de organismos vivos, por ejemplo, seres humanos. Un "paciente" o "sujeto", usado de manera equivalente en la presente descripción, se refiere a un mamífero, preferentemente a un ser humano.

Como se usa en la presente descripción, el término "alquilo" se refiere a un alquilo de cadena lineal o ramificada que consiste de un grupo hidrocarburo saturado de 1 a 24 átomos de carbono (C₁-C₂₄) a menos que se indique de cualquier otra manera. El grupo alquilo puede ser cíclico o acíclico.

Como se usa en la presente descripción, el término "amina" se refiere a un grupo funcional que contiene un átomo de nitrógeno con un par de electrones solitario.

Como se usa en la presente descripción, el término "azida" se refiere a un grupo funcional que contiene tres átomos de nitrógeno consecutivos.

Como se usa en la presente descripción, el término "alquino" se refiere a un grupo funcional que contiene dos átomos de carbono que tienen un enlace triple entre sí.

Como se usa en la presente descripción, el término "carboxilo" se refiere a un grupo funcional que contiene una estructura C(O)O.

Como se usa en la presente descripción, el término "hidroxilo" se refiere a un grupo funcional que contiene un OH.

Como se usa en la presente descripción, "n" es un número entero de 16 a 30.

Como se usa en la presente descripción, "Y" se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR, -C(O)OH y -OC(O)R.

Como se usa en la presente descripción, "R" se refiere a un alquilo.

Como se usa en la presente descripción, el término "R" se refiere a un H, CH₃, C₂H₅ y C₃H₇.

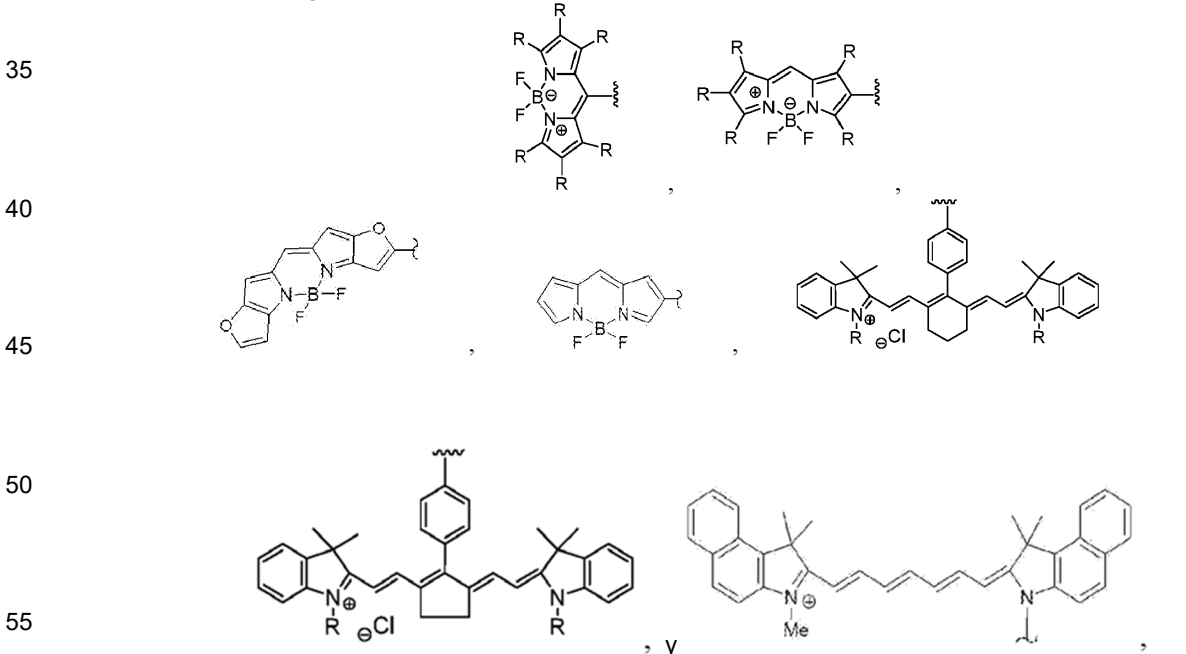
5 Como se usa en la presente descripción, "X" es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a un enlazador.

La citometría de flujo útil en la presente invención incluye, pero no se limita a, la clasificación de células activada por fluorescencia ("FACS") y citometría de flujo multicolor.

10 Las perlas magnéticas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, perlas nanomagnéticas que tienen un tamaño en el intervalo de los nanómetros y, a veces, se denominan nanopartículas magnéticas, por ejemplo, perlas MACS[®] de 50 nm (MACS es una marca registrada y está disponible en Miltenyi Biotec GmbH), microperlas magnéticas que tienen un tamaño en el intervalo de los micrómetros, por ejemplo, Dynabeads[®] de 1-3 μm (Dynabeads es una marca registrada y está disponible en Invitrogen Dynal AS Corp), perlas paramagnéticas y perlas superparamagnéticas.

Las moléculas luminiscentes útiles en la presente invención incluyen fluoróforos.

20 Los fluoróforos incluyen, pero no se limitan a, compuestos de Alexa Fluor[®] (Alexa Fluor es una marca registrada y está disponible en Molecular Probes, Inc.) que incluyen 350, 405, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750 y 790, compuestos de Brilliant Violet[™] (Brilliant Violet está disponible en BioLegend[®]) que incluyen 420, 510, 605, 650, 711 y 786, compuestos de Brilliant Ultra-Violet[™] (Brilliant Ultra-Violet está disponible en BD Biosciences, Inc.) que incluyen los de las siguientes frecuencias 395 y 737 nm, compuestos Dylight[®] (Dylight es una marca registrada y está disponible en Pierce Biotechnology, Inc.) que incluyen 350, 405, 488, 550, 594, 633, 650, 680, 755 y 800, Violetfluor[®] 450, Redfluor[®] 710, (Violetfluor y Redfluor son marcas registradas y están disponibles en Tonbo Biotechnologies Corporation), aloficocianina ("APC"), APC Alexa Fluor[®] 750, APC-Cy7, complejos de proteínas peridina y clorofila ("PerCP"), PerCP-Cy5, PerCP-Cy5.5, PerCP-Cy7, yoduro de propidio ("PI"), ficoeritrina ("PE"), PE-Cy5, PE -Cy5.5, PE-Cy7, PE-Texas Red[®] (Texas Red es una marca registrada de Molecular Probes, Inc.), fluoresceína ("FITC"), aminometilcumarina ("AMCA"), Marina Blue[®], Cascade Blue[®] (Marina Blue y Cascade Blue son marcas registradas y están disponibles en Molecular Probes, Inc.), Cascade Yellow, Pacific Blue, Qdot[®] 605 (Qdot es una marca registrada de Life Technologies Corp), tetrametilrodamina ("TR1TC"), Cy3, Cy5, Cy5.5, Texas Red[®] y compuestos de las siguientes estructuras,



en donde cada R se selecciona independientemente de H, CH₃, C₂H₅ y C₃H₇.

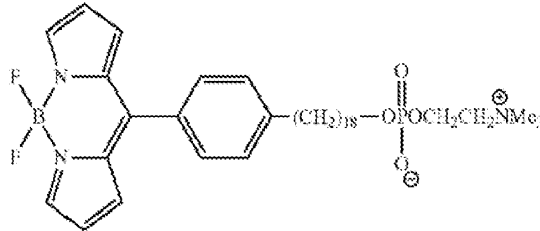
60 Los enlazadores útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un enlace, enlazador de biotina-estreptavidina, un enlazador de azetidiona y un enlazador de grupos amina, azida, alquino, carboxilo, hidroxilo y sus combinaciones.

65 Las siguientes modalidades preferidas se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Modalidades preferidas

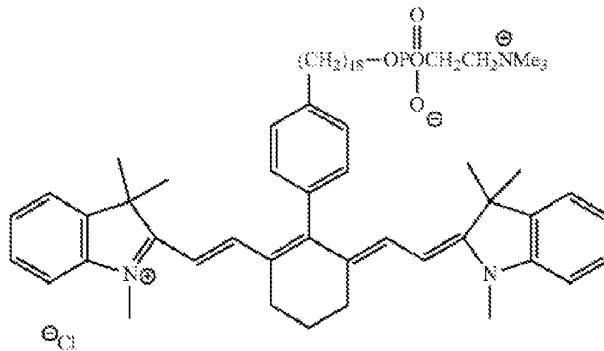
En una modalidad preferida, la presente invención se dirige a un método para identificar una célula circulante de cáncer de próstata que comprende:

- 5 (i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (V)



(V)

CLR1501 o fórmula (VI)



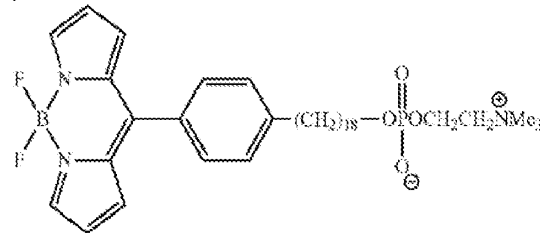
(VI)

CLR1502; y

- (ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a microscopía de fluorescencia o citometría de flujo.

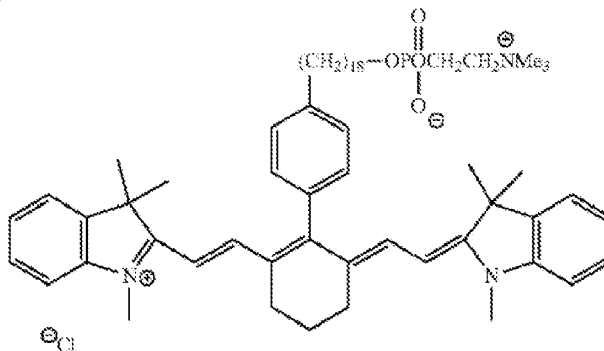
35 En una modalidad preferida, la presente invención se dirige a un método para aislar una célula circulante de cáncer de próstata que comprende:

- 40 (i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (V)



(V)

CLR1501 o fórmula (VI)



(VI)

CLR1502; y

- 65 (ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a la clasificación de células activada por fluorescencia.

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

Ejemplos

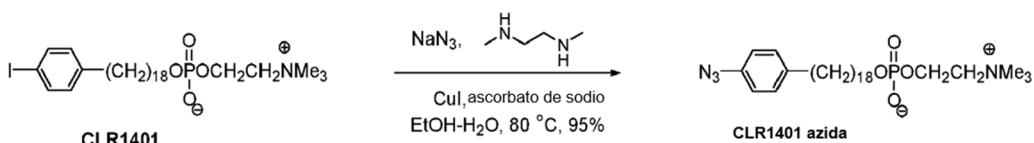
5

Ejemplo 1-Síntesis de un conjugado PLE-perla magnética

10

En primer lugar, tanto un PLE de fórmula I-IV como una perla magnética, como se describe en la presente descripción, están unidos a su propio grupo funcional. Luego, los grupos funcionales se unen a través de la química clic. Como ejemplo, un PLE de fórmula I de la presente invención puede unirse a un grupo funcional azida y una perla magnética puede unirse a un grupo funcional alquino. Los grupos funcionales de azida y alquino pueden unirse a través de la química clic, tal como la cicloadición de azida y alquino catalizada por cobre ("CuAAC"). En general, las perlas magnéticas unidas a un grupo funcional se conocen como "perlas magnéticas funcionalizadas" y están disponibles en múltiples fuentes tales como Nanocs, Inc.

15



20

Síntesis de CLR1401 azida

25

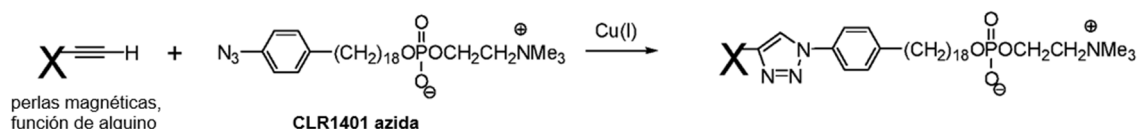
Se disolvieron 18-(p-yodofenil)octadecilfosfocolina (4,01 g, 6,3 mmol), azida de sodio (818 mg, 12,6 mmol) y ascorbato de sodio (140 mg, 0,71 mmol) en la mezcla de etanol desgasificado (28 ml) y agua. (12 ml) en el recipiente de reacción. Se añadieron yoduro de cobre (I) (120 mg, 0,63 mmol) y *N,N'*-dimetiletilendiamina (0,1 ml, 0,94 mmol) a la mezcla de reacción. El recipiente de reacción se cerró herméticamente y la mezcla se agitó a 80 °C durante 45 min. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se añadió agua (60 ml) y la mezcla se agitó durante 30 min al aire libre. La mezcla se transfirió al embudo de decantación, se añadieron cloroformo (80 ml) y metanol (52 ml), y se realizó la extracción mediante agitación. Se retiró la capa de cloroformo y se repitió la extracción (2 × 80 ml de cloroformo). Los extractos de cloroformo combinados se lavaron con HCl 0,01 N, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron hasta la sequedad. El residuo se disolvió en cloroformo (4 ml) y se añadió lentamente acetona (170 ml) con agitación. La mezcla se agitó durante 30 min y se filtró. El producto se enjuagó sobre el filtro con acetona y se secó a alto vacío para dar 3,31 g (95 %) de 18-(p-azidofenil)octadecilfosfocolina.

30

35

Unión de un PLE-azida a una perla magnética funcionalizada con alquino

40

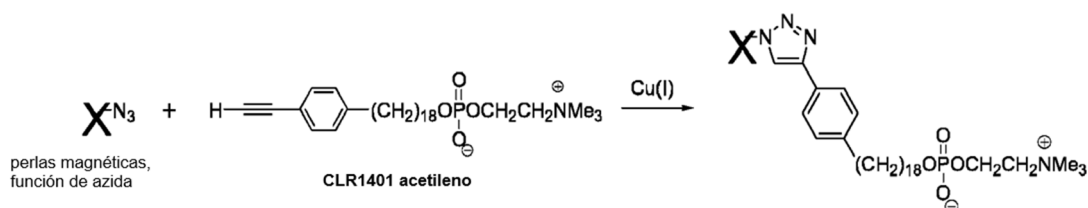


45

El CLR1401 azida se une a una perla magnética funcionalizada con alquino a través de la química clic. Arriba hay un ejemplo de la CuAAC. La CuAAC se describe en Himo F y otros, Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates, *J Am Chem Soc*, 12 de enero de 2005, 127(1), 210-216. Brevemente, la perla magnética funcionalizada con alquino y el CLR1401 azida se mezclan en una relación 1:1 de agua y alcohol *tert*-butílico en presencia de un catalizador de óxido de cobre ("Cu(I)") durante 6 a 12 horas. Opcionalmente se añade ascorbato de sodio a la mezcla. Luego, el PLE-perla magnética final puede aislarse de la solución mediante filtración o extracción simple.

50

55

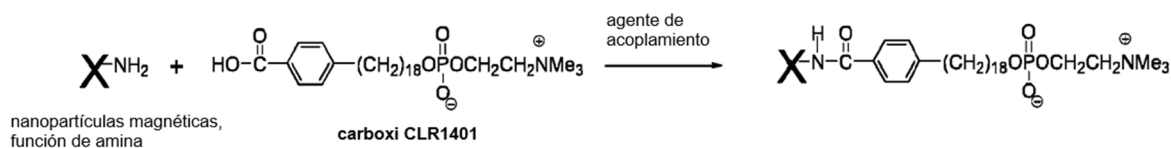


60

Unión de un PLE-acetileno a una perla magnética funcionalizada con azida

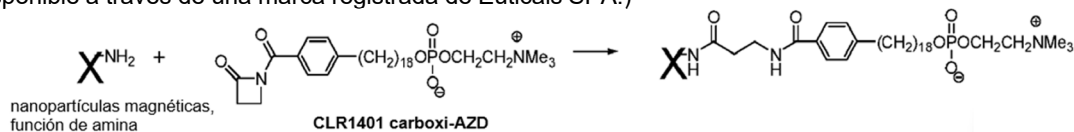
El CLR1401 acetileno se une a una perla magnética funcionalizada con azida a través de la química clic. La misma reacción CuAAC usada para la unión del CLR1401 azida a una perla magnética funcionalizada con alquino puede usarse como se describió anteriormente.

65



Unión de un carboxi-PLE a una nanopartícula magnética funcionalizada con amina

10 El carboxi CLR1401 se une a una nanopartícula magnética funcionalizada con amina a través de un enlace amida. El enlace amida puede lograrse con cualquier reactivo de acoplamiento adecuado para la formación de un enlace amida, tales como los reactivos usados para la síntesis de péptidos que incluyen, pero no se limitan a, (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) ("HBTU"), (hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido) ("HATU"), COMU® (COMU está disponible en Sigma Aldrich Co, LLC y es una marca registrada de Luxembourg Biotechnologies Ltd.) y anhídrido de ácido propano fosfónico ("PPAA" o T3P®, T3P está disponible a través de una marca registrada de Euticals SPA.)



20 Unión de un PLE carboxi-AZD a una nanopartícula magnética funcionalizada con amina

25 Como alternativa al enlace amida descrito anteriormente, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con amina pueden unirse a un carboxi-PLE a través de un enlazador de azetidiona ("AZD"). Como ejemplo, el CLR1401 carboxi-AZD puede unirse a una nanopartícula magnética funcionalizada con amina a través de un enlazador AZD. El enlace AZD se describe en Roberts LR y otros, Kappa agonist CovX-Bodies, Bioorg Med Chem Lett, 15 de junio de 2012, 22(12), 4173-4178 y Sato S y otros, Chemically Programmed Antibodies AS HIV-1 Attachment Inhibitors, ACS Med Chem Lett, 9 de mayo de 2013, 4(5), 460-465.

30 Ejemplo 2-Identificación y enumeración de células tumorales circulantes de pacientes con cáncer de pulmón, tiroides, mama, cuello uterino, carcinoma de células escamosas y cáncer colorrectal mediante el uso de un análogo de PLE fluorescente

35 Métodos

La sangre completa se recolectó en tubos de recolección Cell Save® o tubos de recolección con ácido etilendiaminotetraacético ("EDTA") a partir de siete pacientes con cáncer de pulmón (pacientes 101 y 103), tiroides (paciente 102), mama (paciente 106), cuello uterino (paciente 104), carcinoma de células escamosas (107), y cáncer colorrectal (paciente 108) antes (extracción 1) y después (extracción 2) de la terapia, cuando estuvo disponible. Las células mononucleares se aislaron a partir de sangre completa mediante el uso de un gradiente de densidad Ficoll-Paque. Luego, las células de cada paciente se incubaron con un bloqueador de Fc. Luego, las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia contra CD45, CD14, CD34, EpCAM y todas las citoqueratinas (CK) y un análogo de PLE fluorescente ("CLR1501") durante 30 minutos. Luego, las células se analizaron mediante citometría de flujo para indicar el número de células de cada muestra de sangre completa que eran positivas y/o negativas para un marcador particular. De acuerdo con la definición actual, las CTC se identificaron como células vivas que eran CD45-, CD14-, CD34-, CK+ y EpCAM+ ("por definición"). Debido a la experiencia previa con los monocitos/macrófagos CD14+ (Figura 1), las células CD14+ se eliminaron de los análisis debido a la alta captación de CLR1501. Las células epiteliales normales CD34+ también se eliminaron de los análisis. En comparación, las células CD45+ y CD34+ restantes en el mismo paciente no absorberán CLR1501 en gran medida. Los resultados de este análisis se explican más abajo y se resumen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Identificación y enumeración de células tumorales circulantes en muestras de sangre de pacientes con diversos tipos de cáncer recolectadas en tubos de recolección Cell Save®

	Cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	Cáncer de tiroides	Cáncer de tiroides	Cáncer de pulmón	Cáncer de cuello uterino
Cell Save® (número)	101 (1)	101 (2)	102 (1)	102 (2)	103	104 (1)
CTC (por definición)	0	10	29 980	22 246	6380	944
CK+	4,7 M	10	1,0 M	3,5 M	3,3 M	6,8 M
CK+/CLR 1501+	4,7 M	10	1,0 M	3,3 M	3,3 M	6,8 M
EpCAM+	20	41	38 594	24 674	10 610	1087
EpCAM+/CLR 1501+	20	31	37 355	24 919	11 139	998
CK-/EpCAM-/CLR1501+	1,4 M	121 696	6,7 M	7,9 M	5,3 M	1,3 M

	Cáncer de cuello uterino	Cáncer de mama	Carcinoma	Cáncer colorrectal	Cáncer colorrectal
Cell Save® (número)	104 (2)	106	107	108 (1)	108 (2)
CTC (por definición)	26	30	1034	5	30
CK+	789	60	54 661	5	15 423
CK+/CLR 1501+	789	60	54 391	5	15 418
EpCAM+	1069	105	6968	40	222
EpCAM+/CLR 1501+	942	75	6686	15	109
CK-/EpCAM-/CLR1501+	36,4 M	278	611 622	1062	1,1 M

M denota millones

Tabla 2. Identificación y enumeración de células tumorales circulantes en muestras de sangre de pacientes con diversos tipos de cáncer recolectadas en tubos de recolección con EDTA

EDTA (número)	Cáncer de pulmón	Cáncer de pulmón	Cáncer de tiroides	Cáncer de tiroides	Cáncer de pulmón
	101 (1)	101 (2)	102 (1)	102 (2)	103
CTC (por definición)	26	0	730	8808	192
CK+	1,8 M	0	46 155	16 797	13 290
CK+/CLR 1501+	1,8 M	0	46 132	16 755	13 012
EpCAM+	178	0	2353	10 236	1517
EpCAM+/CLR 1501+	153	0	2720	10 375	1896
CK-/EpCAM-/CLR1501+	1,8 M	30 222	1,5 M	10,9 M	2,5 M

EDTA (número)	Cáncer de cuello uterino	Cáncer de mama	Carcinoma	Cáncer colorrectal	Cáncer colorrectal
	104	106	107	108 (1)	108 (2)
CTC (por definición)	22 965	12	1896	0	76
CK+	9,6 M	98	13 805	76	968
CK+/CLR 1501+	9,6 M	86	13 788	76	917
EpCAM+	24 722	17	8088	662	433
EpCAM+/CLR 1501+	23 493	17	9469	382	229
CK-/EpCAM-/CLR1501+	4,0 M	19 585	147 641	29 584	753 387

M denota millones

Resultados

Las siete muestras contenían CTC detectables (por definición) que mostraron una captación positiva de CLR1501 (compare la fila 1 con las filas 3, 5 y 6 en las Tablas 1 y 2). En la Figura 1 se muestra una imagen representativa de citometría de flujo que representa una alta captación de CLR1501 en las células CD14+ de muestras de sangre del

paciente 8. En la Figura 1, el cuadrante superior izquierdo indica las células CD14-/CLR1501+, el superior derecho indica CD14+/CLR1501+, el inferior derecho indica CD14+/CLR1501- y el inferior izquierdo indica CD14-/CLR1501-. En el panel A, las células negativas para CD45 y CD34 (es decir, posibles células tumorales circulantes) aisladas de la sangre extraída del paciente 108 se muestran teñidas con todos los marcadores, excepto con CD14 Brilliant Violet 785™. Las células positivas para CD14 marcadas se muestran en el eje x y las células positivas para CLR1501 en el eje y. El panel A se usó como control para configurar las puertas para las células positivas para CD14 Brilliant Violet 785™. En el panel B, las células negativas para CD45 y CD34 aisladas de la sangre extraída del paciente 108 se muestran teñidas con todos los marcadores, incluido el CD14 Brilliant Violet 785™. Como se muestra, el 99,7 % de las células positivas para CD14+ también lo son para CLR1501. Compare en la Figura 1, el panel B con el panel A.

Adicionalmente, CLR 1501 pudo identificar ~99-100 % de las células CK+ (compare la fila 2 con la fila 3 de la Tabla 1 o 2) y ~35-100 % de las células EpCAM+ (compare la fila 4 o la fila 5 de la Tabla 1 o 2), en todos los tipos de cáncer, independientemente del tubo de recolección de sangre que se utilizó. Sorprendentemente, había un gran número de células que eran CLR 1501+, pero CK-, EpCAM-, CD45-, CD14-, CD34- y contenían un núcleo (fila 6, Tablas 1-2). Las células indicadas en la fila 6 de las Tablas 1 y 2 no son tipos de células sanguíneas, pero pueden ser otras células tumorales que pueden tener una expresión disminuida o nula de EpCAM y CK. Se informa que muchos cánceres expresan marcadores tumorales alternativos, tienen una expresión heterogénea de EpCAM y/o CK, o pueden estar experimentando una transición de epitelial a mesenquimatoso (EMT) y, por tanto, perder la expresión de marcadores epiteliales. Yu 2013, Eichelberg 2013 y Spizzo 2011. Por tanto, CLR1501 es capaz de identificar células tumorales circulantes que, de cualquier otra manera, serían indetectables en los ensayos actuales de uno o varios marcadores.

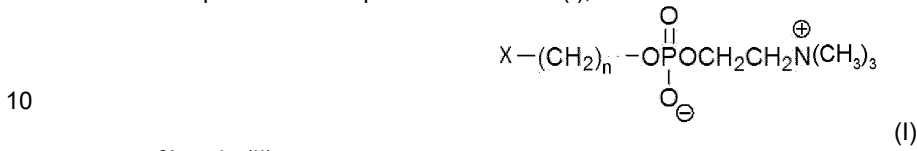
A los pacientes 101, 102, 104 y 108 se les extrajo sangre antes y después de la terapia (Extracción 1 y 2, respectivamente). El paciente 101 tuvo una muy buena respuesta parcial a la terapia; sin embargo, de la extracción 1 a la 2, el recuento de CTC de este paciente, por definición, aumentó de 0 a 10, lo que indica progresión del cáncer (Tabla 1). Si solo se utilizó CK como marcador de células tumorales, el recuento de células tumorales del paciente 101 disminuyó de 4,7 millones a 10 (Tabla 1, compare la extracción 1 con la extracción 2). Si solo se utilizó EpCAM como marcador de células tumorales, el recuento de células tumorales del paciente 101 aumentó de 20 a 41 (Tabla 1, compare la extracción 1 con la extracción 2). Sin embargo, el recuento total de células tumorales del paciente 101 (números de CK+ y EpCAM+) disminuyó de la extracción 1 a la extracción 2, lo que indica que los marcadores separados pueden ser una medida más precisa de la respuesta clínica y que las células cancerosas del paciente 101 muestran una expresión heterogénea de CK y EpCAM. Además, el recuento de todas las células CLR 1501+ del paciente 101 disminuyó drásticamente de la extracción 1 a la 2. Esta tendencia también se observa en los tubos de recolección de sangre con EDTA para el paciente 101 (Tabla 2). Por tanto, CLR 1501, por sí solo, puede ser una medida más precisa de la respuesta clínica que los ensayos actuales, lo que elimina la necesidad de identificar tanto EpCAM como CK.

En general, el análogo de PLE fluorescente CLR1501 se usó con éxito para identificar las CTC de pacientes con cáncer de pulmón, tiroides, mama, cuello uterino, carcinoma de células escamosas y cáncer colorrectal.

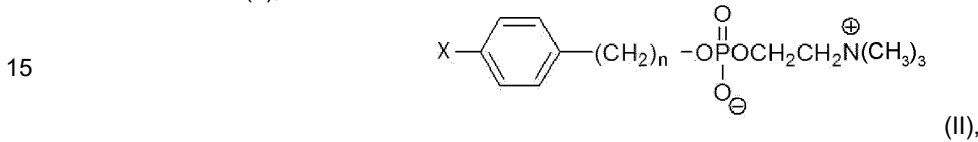
REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una o más células tumorales circulantes (CTC) que comprende:

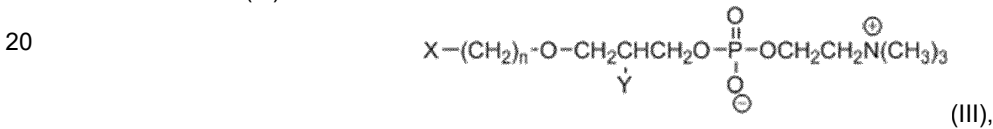
5 (i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I),



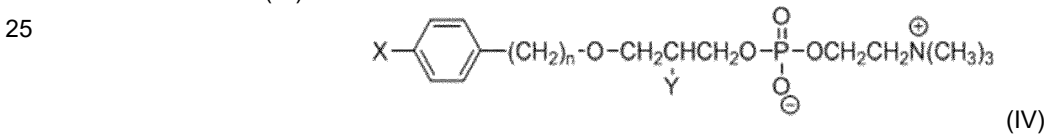
fórmula (II),



fórmula (III)



o fórmula (IV)



en donde:

n es un número entero de 16 a 30;

Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo;

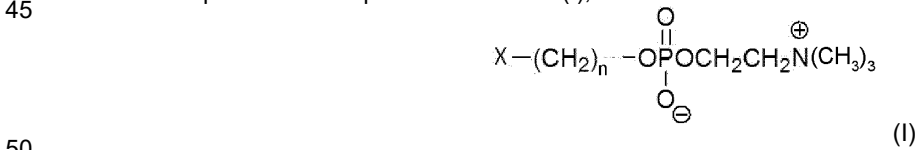
y

X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador; y

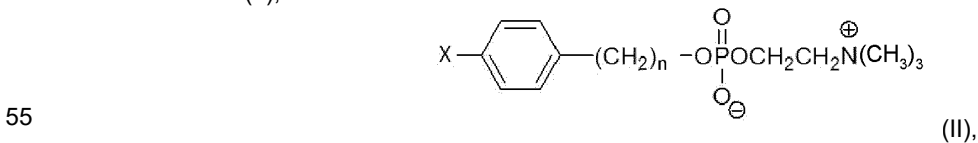
35 (ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, en donde la una o más CTC se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer colorrectal, una célula madre cancerosa, una célula de leucemia y una célula de linfoma.

2. Un método para aislar una o más células tumorales circulantes (CTC) que comprende las etapas de:

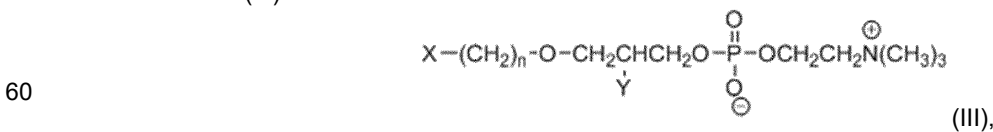
45 (i) poner en contacto una muestra de sangre o suero sanguíneo de un sujeto con una composición que comprende un compuesto de fórmula (I),



fórmula (II),

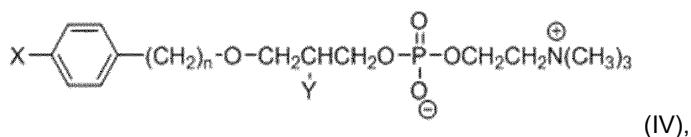


fórmula (III)



o fórmula (IV)

65



en donde:

n es un número entero de 16 a 30;

Y se selecciona del grupo que consiste en -H, -OH, -OR¹, -C(O)OH y -OC(O)R¹, en donde R¹ es un alquilo;

y

X es una molécula luminiscente o una perla magnética unida a través de un enlazador; y

(ii) someter la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto a citometría de flujo o a un campo magnético,

en donde la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto se somete a citometría de flujo cuando X es una molécula luminiscente;

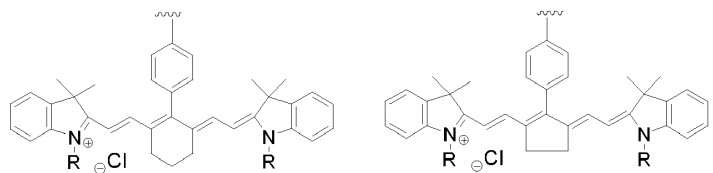
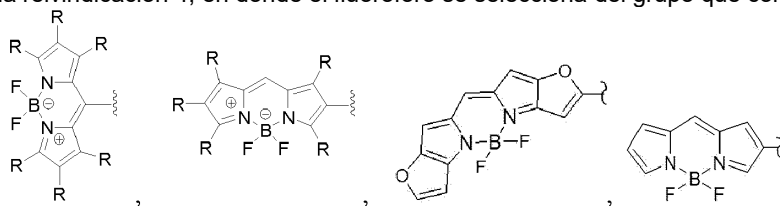
en donde la muestra de sangre o suero sanguíneo del sujeto se somete a un campo magnético cuando X es una perla magnética unida a través de un enlazador; y

en donde la una o más CTC se seleccionan del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de carcinoma de células escamosas, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer colorrectal, una célula madre cancerosa, una célula de leucemia y una célula de linfoma.

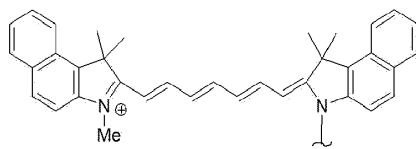
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde X es una molécula luminiscente.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la molécula luminiscente es un fluoróforo.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en

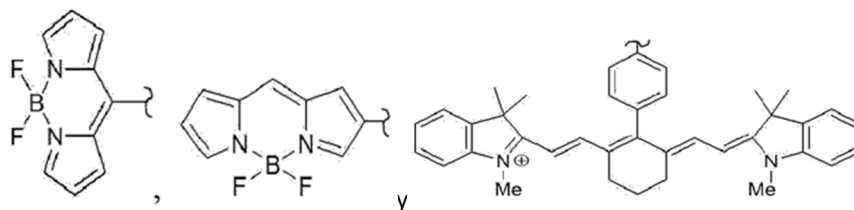


y



en donde cada R se selecciona independientemente de H, CH₃, C₂H₅ y C₃H₇.

6. El método de la reivindicación 5, en donde el compuesto es un compuesto de fórmula (II) y el fluoróforo se selecciona del grupo que consiste en



7. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde X es una perla magnética unida a través de un enlazador.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la perla magnética se selecciona del grupo que consiste en perlas nanomagnéticas, perlas micromagnéticas, perlas paramagnéticas y perlas superparamagnéticas.
- 5 9. El método de la reivindicación 1 o 7, en donde el enlazador se selecciona del grupo que consiste en un enlazador de biotina-estreptavidina, un enlazador de azetidiona y un enlazador de grupos amina, azida, alquino, carboxilo e hidroxilo y sus combinaciones.
10. El método de la reivindicación 2, que comprende además aislar la una o más CTC.
- 10 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además utilizar las CTC aisladas en una tecnología seleccionada del grupo que consiste en aislamiento de proteínas, aislamiento de ARN, aislamiento de ADN, análisis de translocación de genes, análisis de amplificación de genes e hibridación fluorescente in situ.
- 15 12. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula de leucemia es una célula de leucemia linfoblástica aguda, una célula de leucemia mieloide aguda, una célula de leucemia linfocítica crónica, una célula de leucemia mielógena crónica o una célula de leucemia de células pilosas.
- 20 13. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula de linfoma es una célula de linfoma cutáneo de células T, una célula de linfoma de Hodgkin o una célula de linfoma no Hodgkin.

FIGURA 1

