

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 312**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

A61B 8/13 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

G01N 15/14 (2014.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2016** **PCT/US2016/068859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017** **WO17117210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2016** **E 16882553 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3338086**

54 Título: **Sistema y procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de displasia**

30 Prioridad:

30.12.2015 US 201562273127 P

26.07.2016 US 201662367000 P

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

14.11.2024

73 Titular/es:

VISIONGATE, INC. (100.0%)
17280 Woodinville Redmond Rd NE No. 800
Woodinville, WA 98072, US

72 Inventor/es:

NELSON, ALAN C. y
MEYER, MICHAEL G.

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 987 312 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

Sistema y procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de displasia

- 5 La presente invención se refiere a la tomografía óptica a escala celular y subcelular. Más particularmente, la invención se refiere a un sistema y procedimiento para determinar displasia en una muestra analizada mediante un sistema de tomografía óptica adaptado para la detección de células displásicas.

Antecedentes

- 10 El cáncer de pulmón es el segundo cáncer más frecuente en los Estados Unidos y es el más letal. Más de 31 millones de pacientes en los Estados Unidos (EE. UU.) corren un alto riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, principalmente debido a la edad, el historial de tabaquismo, la contaminación y otros factores, incluida la exposición al radón, antecedentes familiares de cáncer de pulmón, etc. Aproximadamente 160.000 pacientes estadounidenses mueren de cáncer de pulmón cada año. En el momento de redactar este texto, el cáncer de pulmón solo se puede curar con cirugía cuando se detecta en etapas tempranas, principalmente en las etapas I y II. Sin embargo, se sabe que el cáncer de pulmón está precedido por afecciones precancerosas que se presentan como células displásicas. La detección de estas condiciones precancerosas puede desencadenar un tratamiento preventivo que puede reducir el riesgo de contraer cáncer de pulmón.

- 20 En un avance significativo en la lucha contra el cáncer de pulmón, la patente estadounidense número 8.623.917, titulada "Uses of Prostacyclin Analogs" (Usos de análogos de prostaciclina), otorgada el 7 de enero de 2014 a Keith et al., revela un procedimiento para reducir el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en un exfumador humano. El procedimiento enseñado en la patente de Keith comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de análogo de prostaciclina que comprende iloprost al exfumador de modo que el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en el exfumador se reduzca al menos en un 10% en relación con un grupo de control con factores de riesgo similares. Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para reducir el riesgo de desarrollar displasia premaligna avanzada en un sujeto. Si bien la invención de Keith constituye un avance importante en el área de la prevención del cáncer de pulmón, existen importantes dificultades para implementar este procedimiento terapéutico.

- 35 Un obstáculo importante para implementar el tratamiento enseñado en la patente de Keith es identificar a los sujetos con displasia que se beneficiarían más con la administración de un fármaco de quimioprevención como el iloprost. Si bien los pacientes con displasia pulmonar pueden tener un riesgo elevado de cáncer de pulmón, generalmente no presentan síntomas y desconocen su condición. Actualmente, la técnica más confiable para identificar displasia en un paciente, el examen broncoscópico, requiere anestesia o sedación. El examen broncoscópico del pulmón generalmente incluye varias biopsias de ambos pulmones, es decir, un procedimiento invasivo seguido de un análisis patológico. Como resultado, hasta la fecha, la clase de pacientes que ha demostrado beneficiarse con el tratamiento con iloprost se limita a los ex fumadores porque, como clase, tienen un alto riesgo de cáncer de pulmón y se ha demostrado que el tratamiento beneficiaría a los ex fumadores como clase incluso sin más pruebas para detectar displasia. Sin embargo, no se prescribiría un medicamento quimiopreventivo en ausencia de una prueba diagnóstica para la displasia.

- 45 Además, ciertos no fumadores también pueden tener una incidencia inaceptablemente alta de cáncer de pulmón debido a factores como la exposición al gas radón, al polvo de carbón, a productos químicos y a otras causas, tanto conocidas como desconocidas. Y los ex fumadores que no presentan displasia podrían no recibir ningún beneficio del tratamiento con el medicamento. Por lo tanto, se necesita urgentemente una prueba no invasiva que permita detectar de forma fiable las células displásicas para identificar a los sujetos con riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, ya sean fumadores, ex fumadores o no fumadores.

- 50 Otro estudio está en ensayos clínicos continuos desde abril de 2016 para determinar si el calcitriol puede prevenir el cáncer de pulmón en pacientes con metaplasia o displasia de los pulmones. El propósito de este ensayo clínico es estudiar los efectos secundarios y la mejor dosis de calcitriol para prevenir el cáncer de pulmón en fumadores actuales y ex fumadores con alto riesgo de cáncer de pulmón. El estudio lo está llevando a cabo el Instituto de Cáncer Roswell Park en colaboración con el Instituto Nacional del Cáncer (NCI). Los objetivos principales del estudio son establecer la seguridad del calcitriol en pacientes con alto riesgo de cáncer de pulmón. Determinar las toxicidades limitantes de la dosis del calcitriol en estos pacientes.

- 60 En desarrollos relacionados, Nelson ha implementado avances en la obtención de imágenes en 3D de células biológicas mediante tomografía óptica, como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense número 6.522.775, expedida el 18 de febrero de 2003 y titulada "Apparatus and Method for Imaging Small Objects in a Flow Stream Using Optical Tomography" (Aparato y procedimiento para obtener imágenes de objetos pequeños en una corriente de flujo mediante tomografía óptica). Otros desarrollos importantes en este campo se enseñan en

Fauver et al., Patente de EE. UU. número 7.738.945, emitida el 15 de junio de 2010, titulada "Method and Apparatus for Pseudoprojection Formation for Optical Tomography" (Procedimiento y aparato para la formación de pseudoproyecciones para tomografía óptica) (Fauver '945) y Fauver et al., Patente de EE. UU. número 7.907.765, emitida el 15 de marzo de 2011, titulada "Focal Plane Tracking for Optical Microtomography" (Seguimiento del plano focal para microtomografía óptica) (Fauver 765). Basándose en las enseñanzas allí expuestas, VisionGate, Inc., Phoenix, AZ, ha desarrollado y comercializado por completo una tecnología de detección temprana del cáncer de pulmón para proporcionar ventajas de medición que han demostrado una gran mejora en las características operativas de los análisis de citología morfológica convencionales.

El documento US 2003/031352 A1 divulga un procedimiento para la detección de células con compartimentación de marcadores moleculares asociados con malignidad y/o enfermedad, incluido el cáncer. El procedimiento comprende a) obtener una muestra de células que tiene una pluralidad de células y suspender la pluralidad de células en una solución, b) si es necesario, fijar la pluralidad de células de la muestra de células, c) marcar al menos un marcador molecular en la pluralidad de células con sondas o tinciones moleculares marcadas, y d) iluminar al menos una célula de la pluralidad de células con al menos una fuente puntual de luz. El procedimiento incluye además e) obtener al menos dos imágenes de proyección diferentes a través de la al menos una celda con un detector de matriz digital, f) compensar las al menos dos imágenes de proyección por variaciones en la iluminación, g) analizar las al menos dos imágenes de proyección para detectar al menos un marcador molecular marcado que tenga características densitométricas y de ubicación, y h) analizar la ubicación del al menos un marcador molecular dentro de la al menos una célula. Además, el procedimiento incluye i) medir la compartimentación del al menos un marcador molecular marcado mediante el uso de características densitométricas y de ubicación, y j) analizar la compartimentación del al menos un marcador molecular marcado con al menos un clasificador para la detección de la compartimentación del marcador molecular asociado a malignidad y/o enfermedad. La etapa de obtener al menos dos imágenes de proyección diferentes puede comprender además la operación de un sistema de tomografía óptica (OT) para obtener las al menos dos imágenes de proyección, en donde el sistema OT puede comprender un sistema de tomografía óptica de flujo (FOT).

Michael Meyer et al: "The Cell-CT 3-dimensional cell imaging technology platform enables the detection of lung cancer using the noninvasive LuCED sputum test: Lung Cancer Detection by LuCED" (La plataforma de tecnología de imágenes celulares tridimensionales Cell-CT permite la detección de cáncer de pulmón utilizando la prueba de esputo no invasiva LuCED: detección de cáncer de pulmón mediante LuCED), Cancer Cytopathology, vol. 123, n.º 9, 6 de julio de 2015, páginas 512-523, DOI:10.1002/cncy.21576 revisa la prueba LuCED para la detección de cáncer de pulmón temprano. Este documento divulga un sistema de tomografía óptica según el preámbulo de la reivindicación 1 y el procedimiento correspondiente según el preámbulo de la reivindicación 3.

R.L. Kieth et al: "Oral Iloprost Improves Endobronchial Dysplasia in Former Smokers" (El Iloprost oral mejora la displasia endobronquial en ex fumadores), Cancer Prevention Research, vol. 4, no. 6, 1 de junio 2011, páginas 793 - 802, DOI: 10.1158/1940-6207. CAPR-11-0057, describe un ensayo multicéntrico, doble ciego, aleatorizado, de fase II, controlado con placebo de iloprost oral en fumadores actuales o ex fumadores con atipia citológica del esputo o displasia endobronquial. Se realizó una broncoscopia al inicio del estudio y después de completar seis meses de terapia.

El procesamiento en un sistema de tomografía óptica de este tipo comienza con la recolección y preparación del espécimen. Para aplicaciones de diagnóstico en enfermedades pulmonares, el esputo del paciente se puede recolectar de forma no invasiva en una clínica o en el hogar. En el laboratorio clínico, el esputo se procesa para eliminar el material no diagnóstico, se fija y luego se tiñe. Luego, los especímenes teñidos se mezclan con un gel óptico y la suspensión se inyecta en un tubo microcapilar. Se recogen imágenes de objetos, como células, en el espécimen mientras las células giran 360 grados con respecto a la óptica de recogida de imágenes en un sistema de tomografía óptica. Las imágenes resultantes comprenden un conjunto de imágenes de profundidad de campo extendida desde diferentes perspectivas denominadas "imágenes de pseudoproyección". El conjunto de imágenes de pseudoproyección se puede reconstruir matemáticamente utilizando técnicas de retroproyección y filtrado para obtener una reconstrucción 3D de una célula de interés. Tener una resolución isométrica o aproximadamente igual en las tres dimensiones es una ventaja en la obtención de imágenes tomográficas de células en 3D, especialmente para mediciones de características cuantitativas y análisis de imágenes.

La imagen digital reconstruida en 3D queda luego disponible para su análisis con el fin de permitir la cuantificación mediante la medición de estructuras subcelulares, moléculas o sondas moleculares de interés. Un objeto tal como una célula biológica puede teñirse o marcarse con al menos un agente de contraste absorbente o una sonda molecular marcada, y la cantidad medida y la estructura de este biomarcador pueden proporcionar información importante sobre el estado de la enfermedad de la célula, incluidos, entre otros, varios tipos de cáncer, como el de pulmón, mama, próstata, cuello uterino, estómago y páncreas, y varias etapas de displasia.

Sin embargo, hasta la presente divulgación, no existía un procedimiento confiable para emplear la tomografía óptica para identificar condiciones precancerosas como la displasia. Al proporcionar aquí un procedimiento y un sistema para identificar células displásicas, un paciente puede ser tratado con un fármaco de quimioprevención como iloprost para reducir el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en una clase más específica de pacientes en riesgo que, alternativamente, administrar el tratamiento solo a pacientes que tienen un riesgo extremadamente alto de cáncer de pulmón debido a la edad y la exposición a carcinógenos.

Breve resumen de la divulgación

La invención se define mediante un sistema de tomografía óptica que comprende las características de la reivindicación 1 y un procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de la displasia mediante el análisis de datos de característica de imágenes 3D de células obtenidas de un espécimen de esputo obtenido de un sujeto, que comprende las características de la reivindicación 3.

Breve descripción de los dibujos

Si bien las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas, la invención, tanto en lo que respecta a su organización como a su contenido, se entenderá y apreciará mejor, junto con otros objetos y características de la misma, a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos, en los que:

FIG. 1 muestra esquemáticamente una descripción general funcional de una prueba de cáncer de pulmón para el análisis de un espécimen de esputo.

FIG. 2 muestra esquemáticamente los componentes básicos del sistema de un sistema de imágenes de tomografía óptica 3D utilizado en un sistema de prueba de cáncer de pulmón.

FIG. 3 ilustra gráficamente una correlación de las etapas de premalignidad con el riesgo de cáncer de pulmón.

FIG. 4 muestra el porcentaje de especímenes de esputo donde se encontraron células displásicas versus la histología del tumor para los casos de cáncer.

FIG. 5 muestra el porcentaje de especímenes de esputo donde se encontraron células displásicas versus el estadio del tumor para los casos de cáncer.

FIG. 6A-FIG. 6D muestra vistas de reconstrucción 3D de células identificadas como atipia glandular, displasia moderada/severa y células cancerosas.

FIG. 7 muestra una curva ROC de sensibilidad vs. 1-especificidad para un clasificador de células displásicas.

FIG. 8 muestra esquemáticamente un diagrama de bloques funcional de un sistema de clasificación celular para el análisis de un espécimen de esputo para displasia y cáncer.

FIG. 9 muestra esquemáticamente un diagrama de bloques funcional de un ejemplo de un clasificador de células cancerosas.

FIG. 10 muestra esquemáticamente un diagrama de bloques funcional de alto nivel de un generador de protocolo de tratamiento.

En los dibujos, números de referencia idénticos indican elementos o componentes similares. Los tamaños y las posiciones relativas de los elementos en los dibujos no están necesariamente dibujados a escala. Por ejemplo, las formas de varios elementos y ángulos no están dibujados a escala, y algunos de estos elementos están ampliados y posicionados arbitrariamente para mejorar la legibilidad del dibujo. Además, las formas particulares de los elementos tal como están dibujados no pretenden necesariamente transmitir ninguna información sobre la forma real de los elementos particulares y se han seleccionado únicamente para facilitar su reconocimiento en los dibujos.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La siguiente divulgación describe un procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de la displasia mediante el análisis de imágenes 3D de células obtenidas de un espécimen de esputo. En las figuras se exponen y describen varias características de los procedimientos y sistemas de acuerdo con las realizaciones de ejemplo. Se apreciará que los procedimientos y sistemas de acuerdo con otras realizaciones de ejemplo pueden incluir procedimientos o características adicionales diferentes a los que se muestran en las figuras. Se describen

en este documento ejemplos de realizaciones con respecto a un sistema de obtención de imágenes celulares por tomografía óptica.

La presente invención proporciona un sistema de detección temprana de displasia y cáncer de pulmón que utiliza especímenes que incluyen esputo del paciente que se procesa mediante un sistema de tomografía óptica que produce imágenes de células 3D isométricas con una resolución submicrónica que luego se procesan mediante algoritmos automatizados de extracción de características y clasificación para identificar células anormales en el esputo con alta precisión. Dado que las células anormales son raras en el esputo y los contaminantes no diagnósticos son abundantes, solo un sistema capaz de detectar células con alta sensibilidad y muy alta especificidad puede gestionar la detección de cáncer de pulmón en el esputo de manera eficiente y al mismo tiempo garantizar la idoneidad del espécimen. Existen muchos usos potenciales del sistema de tomografía óptica descrito actualmente; el más ventajoso es en especímenes que tienen bajos rendimientos de células neoplásicas o en las que las células anormales son difíciles de reconocer en comparación con el fondo de células no neoplásicas. Los ejemplos incluyen la detección de células displásicas, células tumorales circulantes en la sangre y células neoplásicas en el esputo en casos de cáncer de pulmón temprano o periférico.

Definiciones

Generalmente, como se usan en este documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que el uso en el contexto indique lo contrario:

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones o la especificación significa uno o más de uno, a menos que el contexto indique lo contrario.

El término "aproximadamente" significa el valor indicado más o menos el margen de error de medición o más o menos el 10% si no se indica ningún procedimiento de medición.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se utiliza para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o si las alternativas son mutuamente excluyentes.

Los términos "comprender", "tener", "incluir" y "contener" (y sus variantes) son verbos de enlace abiertos y permiten la adición de otros elementos cuando se utilizan en una reivindicación.

La referencia a lo largo de esta especificación a "un ejemplo" o "una realización de ejemplo", "una realización" o combinaciones y/o variaciones de estos términos significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la realización está incluida en al menos una realización de la presente divulgación. Por lo tanto, las apariciones de la frase "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta especificación no necesariamente se refieren todas a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

"Adecuación" se refiere al contenido del espécimen y define un límite para las células objetivo para determinar si se ha analizado un sedimento celular suficiente.

"Calcitriol", tal como se utiliza en este documento, es una forma activa sintética (artificial) de vitamina D3 (colecalfiferol).

"Tubo capilar" tiene su significado generalmente aceptado y pretende incluir tubos microcapilares transparentes y artículos equivalentes con un diámetro interior generalmente de 500 micras o menos, pero se podrían utilizar diámetros mayores.

"Célula" significa célula biológica, como una célula humana, de mamífero o animal.

"Plataforma Cell-CT®" se refiere a un sistema de tomografía óptica fabricado por VisionGate, Inc. de Phoenix, AZ, que incorpora enseñanzas de las patentes de Nelson y Fauver mencionadas anteriormente y mejoras de esas enseñanzas.

"CellGazer", una utilidad basada en software que facilita la revisión de imágenes 2D y 3D de células generadas por el Cell-CT. El resultado de la revisión celular es un diagnóstico diferencial detallado del tipo de célula que luego determina el resultado final de un caso procesado, por ejemplo, mediante la prueba LuCED.

Los "receptores de antígenos quiméricos (CAR)", tal como se utilizan en este documento, significa que los receptores de células T artificiales (también conocidos como receptores de células T quiméricos o

inmunorreceptores quiméricos) son receptores diseñados que injertan una especificidad arbitraria en una célula efectora inmunitaria.

5 "CIS" como se utiliza en este documento tiene su significado generalmente aceptado de carcinoma in situ, también conocido como neoplasia in situ.

"Profundidad de campo" es la longitud a lo largo del eje óptico dentro de la cual se puede desplazar el plano focal antes de que se produzca una borrosidad inaceptable en la imagen para una característica específica.

10 "Enriquecimiento" se refiere al proceso de extracción de células objetivo de un espécimen bruto. El proceso produce un pellet enriquecido cuyas células pueden luego ser visualizadas de manera más eficiente en el sistema Cell-CT.

15 "Iloprost", tal como se utiliza en este documento, es un análogo sintético de la prostaciclina PGI₂.

"Prueba LuCED®" se refiere a una prueba de detección temprana de cáncer de pulmón que emplea la plataforma Cell-CT® desarrollada por VisionGate, Inc. de Phoenix, AZ, que incorpora las enseñanzas de las patentes de Nelson y Fauver mencionadas anteriormente y mejoras de esas enseñanzas.

20 "El proceso LuCED®" se refiere al mecanismo de reconstrucción celular 3D, clasificación para encontrar células anormales y confirmación de la patología.

"LDCT" significa exploración radiográfica por tomografía computarizada (TC) de baja dosis.

25 "Objeto" significa una célula individual, célula humana, célula de mamífero, artículo, cosa u otra entidad.

30 "Pseudoproyección" incluye una imagen única que representa un volumen muestreado de una extensión mayor que la profundidad de campo nativa de la óptica, donde la imagen de pseudoproyección así formada incluye una integración de una gama de imágenes del plano focal desde un punto de vista fijo. El concepto de pseudoproyección se enseña en Fauver '945.

35 "Especimen" significa un producto completo obtenido de una única prueba o procedimiento de un paciente individual (por ejemplo, esputo enviado para análisis, una biopsia o un hisopo nasal). Un espécimen puede estar compuesto de uno o más objetos. El resultado del diagnóstico de la muestra pasa a formar parte del diagnóstico del caso.

"ROC" tiene su significado generalmente aceptado de Característica del Operador del Receptor.

40 "Muestra" significa una preparación celular terminada que está lista para el análisis, incluida la totalidad o parte de una alícuota o espécimen.

"Sujeto" como se utiliza en este documento significa un paciente humano.

45 "Célula objetivo" se refiere a una célula de un espécimen cuya caracterización o enumeración se desea especialmente. Por ejemplo, en la prueba LuCED, las células objetivo son las células epiteliales bronquiales normales. Se debe enumerar un número mínimo de éstos durante la prueba para que un espécimen se considere adecuado.

50 "Umbral", tal como se utiliza en el contexto del procesamiento de imágenes, incluye un valor límite de decisión para cualquier característica medible de un elemento. Los umbrales pueden determinarse o establecerse de acuerdo con las especificaciones del instrumento, tasas de error aceptables, estadísticas u otros criterios de acuerdo con los principios de reconocimiento de patrones aceptados.

55 "Estadio TNM" se utiliza en este documento en su sentido generalmente aceptado dentro del contexto del cáncer de pulmón y significa la estadificación de tumor, ganglio y metástasis (TNM) según la definición de asociaciones médicas como, por ejemplo, la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC).

60 El vorinostat, también conocido como ácido suberanilohidroxámico, se utiliza en su significado habitual como un inhibidor de la histona desacetilada (HDAC) utilizado en el esófago de Barrett.

"Vóxel", tal como se utiliza en el contexto del procesamiento de imágenes, es un elemento de volumen en una cuadrícula 3D.

Descripción general

Con referencia a la FIG. 1, se muestra esquemáticamente una descripción general funcional de un sistema de prueba de displasia y cáncer de pulmón para el análisis de un espécimen de esputo. El sistema de prueba 5 incluye aparatos y procedimientos para la recolección de especímenes de esputo 10 seguida de una prueba para la detección temprana de cáncer de pulmón 12 tal como, por ejemplo, la prueba LuCED®. La prueba temprana de cáncer de pulmón 12 incluye además un aparato y procedimientos para la tinción y enriquecimiento de espécimen 14, toma de imágenes 3D de células 20, clasificación 3D de células 22 y revisión por parte del médico de células candidatas anormales 25.

La recolección de esputo generalmente se realiza a través de tos espontánea en el hogar del paciente o mediante inducción en una clínica. El esputo se procesa para eliminar contaminantes y células epiteliales no bronquiales, por ejemplo, eliminando los glóbulos blancos y las células escamosas orales. La muestra enriquecida se procesa en la plataforma Cell-CT® que genera imágenes de células digitalmente en 3D real con resolución isométrica submicrónica como se describe, por ejemplo, en Nelson y Fauver mencionados anteriormente. Los biomarcadores asociados con el cáncer se miden en imágenes 3D de células y se combinan en una puntuación que se utiliza para identificar aquellas pocas células que tienen características de cáncer. Estas células se muestran opcionalmente para que el citólogo las revise manualmente mediante una estación de revisión como la estación de revisión CellGazer™ desarrollada por VisionGate, Inc., Phoenix, AZ. La estación de revisión proporciona visualizaciones que permiten al citólogo ver imágenes de células en 2D y 3D para establecer un estado definitivo normal o anormal para células candidatas específicas. La clasificación celular tridimensional (3D) 22 se puede llevar a cabo utilizando técnicas como las que se describen a continuación.

El sistema de toma de imágenes de células 20 incluye un proceso implementado a través de un software de computadora ejecutado, por ejemplo, por una computadora personal que interactúa con dispositivos optomecánicos para corregir el movimiento que surge durante la captura de imágenes. La mayoría de las imágenes de células surgen de la retroproyección filtrada de una manera bien reconstruida. Este algoritmo identifica las células que fueron mal reconstruidas para que puedan rechazarse y no se las procese más. Meyer et al. enseñan un ejemplo de un procedimiento para detectar reconstrucciones de mala calidad en la patente estadounidense número 8.155.420, expedida el 10 de abril de 2012 y titulada "System and Method for Detecting Poor Quality in 3D Reconstructions" (Sistema y procedimiento para detectar mala calidad en reconstrucciones 3D).

Los intentos anteriores de desarrollar un programa de detección del cáncer de pulmón se basaron en la citología del esputo, que mostró una sensibilidad insuficiente para la detección de la enfermedad por el ojo humano (alrededor del 60% en promedio) pero con muy buena especificidad (Schreiber y McCrory (2003) Chest 123 (1 Suplemento): 115). Esta experiencia llevó a algunos a concluir que el esputo no es valioso para la detección del cáncer de pulmón. Un análisis cuidadoso que involucra esputo incluido en bloques de parafina (Böking A, Biesterfeld S, Chatelain R, Gien-Gerlach G, Esser E., Diagnosis of bronchial carcinoma on sections of paraffin-embedded sputum. Sensitivity and specificity of an alternative to routine cytology. (Diagnóstico de carcinoma bronquial en secciones de esputo incluido en parafina Sensibilidad y especificidad de una alternativa a la citología de rutina). Acta Cytol. 1992;36(1):37-47) mostró que el espécimen en realidad contiene células anormales en el 86% o más de los pacientes con cáncer. La recolección mediante toses matinales durante tres días sucesivos dio resultados óptimos. Un análisis adicional mostró que hay células anormales presentes en el esputo estratificado por todos los factores clínicos relevantes, incluido el tipo histológico del tumor, el tamaño, el estadio y la ubicación (Neumann T, Meyer M, Patten F, Johnson F, Erozan Y, Frable J, et al. Premalignant and Malignant Cells in Sputum from Lung Cancer Patients (Células premalignas y malignas en el esputo de pacientes con cáncer de pulmón). Citopatología del cáncer, 2009; 117(6):473-481). Con base en estas características del espécimen, la prueba de detección de cáncer de pulmón actualmente divulgada emplea esputo de tos espontánea. Las evaluaciones iniciales han mostrado resultados satisfactorios utilizando la fijación del esputo mediante Cytot (Hologic, Marlborough, MA) o el conocido procedimiento de Saccomanno. La cuestión de la adecuación de la muestra también es importante para la citología del esputo. Los intentos de aumentar el volumen del esputo expectorado han tenido un éxito variable. La inducción de esputo aumenta la producción de flema para ayudar a lograr una muestra general adecuada.

Ejemplos de enriquecimiento y preparación del esputo

En un ejemplo de una prueba de detección de cáncer de pulmón adaptada para la detección de displasia, los especímenes de esputo se someten a tres etapas de procesamiento antes del análisis: 1) aislamiento de células de esputo y criopreservación; 2) enriquecimiento mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS); y 3) incrustación de células enriquecidas en un aceite óptico cuyo índice coincide con el de los componentes ópticos del sistema de imágenes de tomografía óptica.

Criopreservación y enriquecimiento por FACS (FACS es un ejemplo)

El esputo se trata con el agente mucolítico ditioneitol (DTT) (Fisher Scientific, Waltham, MA). En un ejemplo, para un almacenamiento a largo plazo, la muestra se filtró a través de una red de nailon de 41 µm y se mantuvo a -80 °C en dimetilsulfóxido (DMSO) al 15 % (Fisher Scientific, Waltham, MA). Después de la filtración, se extrae una alícuota de hasta 100 µL de la muestra conservada para el análisis de la prueba de detección de cáncer de pulmón. En primer lugar, las células del esputo se tiñeron con hematoxilina (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) para obtener imágenes de pruebas de detección de cáncer de pulmón posteriores. Luego, las células fueron tratadas con un cóctel de anticuerpos que contenía conjugados fluorescentes elegidos tanto para enriquecer las células epiteliales bronquiales como para eliminar las células inflamatorias contaminantes (neutrófilos y macrófagos). Un cóctel conjugado anti-citoqueratina-FITC (Cell Signaling, Danvers, MA) se dirige a las citoqueratinas expresadas en células epiteliales normales y malignas. Un conjugado anti-CD45-APC (Myltleni, Bergisch Gladbach, Alemania) se dirige a las células inflamatorias para una selección negativa. Las células también se tiñen con DAPI (Life Technologies, Grand Island, NY) antes de la clasificación celular. Para el enriquecimiento de FACS, se creó una puerta madre DAPI positiva para excluir células dobles y desechos, seguida de la exclusión de eventos de alta dispersión lateral, que son principalmente células escamosas orales. Posteriormente, se extrae una puerta hija con alto contenido de citoqueratina (FITC alto) y bajo contenido de CD45 (APC bajo). La población de células en esta puerta hija fueron las células epiteliales objetivo enriquecidas clasificadas para un análisis de prueba de detección de cáncer de pulmón más eficiente y posterior utilizando un sistema de tomografía óptica como el sistema de tomografía óptica Cell-CT®.

Incorporación de células enriquecidas

Después del enriquecimiento mediante FACS (o cualquier otro proceso de enriquecimiento), las células se deshidratan en etanol y luego se suspenden en xileno. Luego, las células se transfieren y se incorporan a un volumen adecuado del medio óptico. El medio óptico es un aceite viscoso con un índice de refracción adecuado para el sistema de tomografía óptica. Una vez incorporadas, las células se inyectan en un cartucho desechable para la toma de imágenes en el sistema de tomografía óptica.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 2, se muestran los componentes básicos del sistema de toma de imágenes por tomografía óptica 3D utilizado en un sistema de prueba de cáncer de pulmón. El sistema de toma de imágenes de células 20 es un microscopio tomográfico 3D automatizado de alta resolución y un sistema computacional para obtener imágenes de células en flujo. Se incluye una fuente de iluminación 90 acoplada ópticamente a una lente condensadora 92 que coopera ópticamente con una lente objetivo 94 para escanear imágenes de objetos 1 contenidos en un tubo capilar 96. Las imágenes se obtienen escaneando el volumen ocupado por el objeto mediante un espejo oscilante 102 y se transmiten a través de un divisor de haz 104 a una cámara de alta velocidad 106. La cámara de alta velocidad produce una pluralidad de imágenes de pseudoproyección 110. Se produce un conjunto de imágenes de pseudoproyección para numerosas posiciones de rotación del tubo axial para cada objeto.

Aunque el sistema de prueba no está limitado a ningún procedimiento de contraste en particular, en un ejemplo la prueba de detección de cáncer de pulmón se dirige específicamente a la morfología celular basándose en la tinción de hematoxilina utilizada tradicionalmente. En la aplicación de la prueba de detección de cáncer de pulmón, el sistema de tomografía óptica calcula imágenes de células en 3D con la misma resolución en todas las dimensiones (es decir, resolución isotrópica), lo que permite que las mediciones sean independientes de la orientación. Además, la eliminación de la ambigüedad del plano focal y las dependencias de la orientación de la vista típicas de la microscopía convencional proporciona contenido de información para reconocer automáticamente un amplio espectro de tipos de células e identificar de manera inequívoca células anormales raras en una población de células predominantemente normales. La salida del sistema de tomografía óptica identifica aproximadamente el 0,5% de todas las células como candidatas anormales para ser verificadas utilizando la estación de trabajo CellGazer™ (VisionGate, Phoenix, AZ), una herramienta de software de imágenes que permite la revisión humana de imágenes libres de ambigüedad en el plano focal y la orientación.

La toma de imágenes mediante sistema de tomografía óptica se realiza en una suspensión líquida de pequeño volumen. Para las pruebas de detección de cáncer de pulmón, estas células provienen de la población de células epiteliales enriquecida mencionada anteriormente. Debido a que el sistema de tomografía óptica puede separar objetos estrechamente coincidentes, un núcleo estrechamente enfocado de flujo de células de una sola fila, aunque es un requisito en la citometría de flujo estándar, es innecesario.

El funcionamiento de ejemplos de sistemas de prueba de cáncer de pulmón se describe en las referencias de Nelson y Fauver, así como en otras patentes, incluida la patente estadounidense número 8.254.023 de Watson et al., expedida el 28 de agosto de 2012 y titulada "Optical Tomography System with High-Speed Scanner" (Sistema de tomografía óptica con escáner de alta velocidad). Durante el funcionamiento, los núcleos teñidos de una célula biológica 1 se suspenden en un medio óptico 112 y se inyectan en un tubo capilar 96 que tiene, por ejemplo, un

diámetro interior de 62 μm . El sistema capilar ha sido diseñado para ser desechable, eliminando así la posibilidad de contaminación cruzada entre muestras. Se aplica presión 114 al fluido que mueve los objetos 1 a la posición para la obtención de imágenes, antes de que se recopilen datos 3D a medida que gira el tubo. Se acciona un espejo 102 para barrer el plano de enfoque a través del objeto, y la imagen es integrada por la cámara para crear una pseudoproyección desde cada perspectiva individual. No se muestra el soporte de vidrio que conecta el tubo capilar 96 al sistema de tomografía óptica. El soporte tiene un orificio cortado en el medio que es ligeramente más grande que el diámetro exterior del capilar y superficies de vidrio en cada lado para permitir el acoplamiento óptico a las lentes del objetivo y del condensador. Un tubo capilar cargado con células incrustadas en un medio de transporte se introduce a través del soporte. El medio de transporte que sostiene las células, el capilar de vidrio, el soporte del capilar, el aceite para interconectar las lentes y las lentes mismas están hechos de materiales del mismo índice óptico. Como consecuencia, los rayos de luz pasan a través de la óptica, el capilar y las células del sistema de tomografía óptica sin refracción mientras que la célula puede rotarse para permitir la captura de un conjunto de 500 pseudoproyecciones que se toman a medida que el capilar gira 360 grados. Debido a que las células están suspendidas en un medio fluido, son propensas a una pequeña cantidad de movimiento mientras se recogen imágenes de pseudoproyección 110.

Por lo tanto, las imágenes de células en las pseudoproyecciones deben registrarse en un centro común para que las características de las células se refuercen entre sí durante la reconstrucción. La patente estadounidense número 7.835.561, titulada "Method for Image Processing and Reconstruction of Images for Optical Tomography" (Procedimiento para el procesamiento de imágenes y reconstrucción de imágenes para tomografía óptica), revela técnicas de corrección de errores para pseudoproyecciones. El conjunto de pseudoproyecciones corregidas se procesa utilizando un algoritmo de retroproyección filtrada, similar al que se utiliza en la tomografía computarizada de rayos X convencional, para calcular la reconstrucción celular tomográfica en 3D. Se muestran imágenes de pseudoproyecciones 110 tomadas en tres posiciones angulares: 0°, 90° y 180°. La iluminación es proporcionada por una fuente de luz de 90 a 585 nm de longitud de onda para optimizar el contraste de la imagen según el espectro de absorción de hematoxilina. En la reconstrucción, los píxeles o vóxeles 3D son cúbicos, con un tamaño de 70 nm en cada dimensión. Los volúmenes de reconstrucción varían en tamaño, ya que el volumen de colección de imágenes se recorta alrededor del objeto. Normalmente, los volúmenes son de aproximadamente 200 a 300 píxeles por lado.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 3, se ilustra gráficamente una correlación de las etapas de premalignidad con el riesgo de cáncer de pulmón. El gráfico 300 ilustra cómo las etapas de premalignidad se correlacionan con el riesgo de cáncer de pulmón en un rango diagnóstico de análisis de células. La curva 301 representa una medida relativa de riesgo que aumenta de izquierda a derecha. Una primera etapa 302 representa un diagnóstico de un epitelio normal. Una segunda etapa 304 representa un diagnóstico de metaplasia. Una tercera etapa 306 representa un diagnóstico de displasia leve. Una cuarta etapa 308 representa una displasia moderada. Una quinta etapa 310 representa una displasia grave. Una sexta etapa 320 representa un diagnóstico de cáncer que requiere cirugía y/o quimioterapia. Una etapa final 312 representa metástasis. Existe una ventana de quimioprevención 322 antes de la etapa de cáncer 320 y durante cualquiera de las etapas de displasia. A modo de comparación, la línea ancha 332 representa el límite diagnóstico de la LDCT.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 4, se representa el porcentaje de especímenes de esputo donde se encontraron células displásicas versus el estadio del tumor para los casos de cáncer. En la gráfica 400 se desglosa el porcentaje de casos de cáncer con células displásicas encontrados mediante el proceso LuCED por histología. La barra 401 representa el 90% de detección de células displásicas de cáncer de células escamosas de una población de 10 células conocidas. La barra 402 representa una detección del 86% de células displásicas de adenocarcinoma de una población de 21 células conocidas. La barra 404 representa una detección del 33% de células displásicas de carcinoma de células pequeñas de una población de 6 células conocidas.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 5, se representa el porcentaje de especímenes de esputo donde se encontraron células displásicas versus la histología del tumor para los casos de cáncer. La gráfica 500 proporciona una evaluación del porcentaje de casos de cáncer con células displásicas encontrados a través del proceso LuCED subdividido según el estadio del tumor. La barra 501 representa una tasa de detección del 89% para células displásicas de una población de 9 células cancerosas en estadio I. La barra 502 representa una tasa de detección del 83% para células displásicas de una población de 6 células cancerosas en estadio II. La barra 503 representa una tasa de detección del 73% para células displásicas de una población de 11 células cancerosas en estadio III. La barra 504 representa una tasa de detección del 71% para células displásicas de una población de 7 células cancerosas en estadio IV. La barra 505 representa una tasa de detección del 50% para células desconocidas de una población de 2 desconocidos. La barra 512 representa una tasa de detección del 50% para células displásicas de una población de 2 desconocidos.

Haciendo referencia ahora a las FIG. 6A-FIG. 6D, se muestran vistas de imágenes de células tridimensionales seccionadas identificadas como atipia glandular, displasia moderada/severa y células cancerosas. Las figuras

están escaladas en relación a 5 micrones como se muestra. A cada célula fotografiada se le asigna una puntuación de clasificación como se analiza en este documento con referencia, por ejemplo, a la FIG. 9. El diagnóstico final de displasia moderada, células columnares atípicas, etc., lo realiza un patólogo que examina las células enviadas para su revisión mediante la prueba LuCED®.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 7, se muestra una curva ROC para un clasificador de células displásicas. La curva ROC 700 es un gráfico de la sensibilidad a las células displásicas en el eje vertical 701 frente a la 1-especificidad en el eje horizontal 703. El punto 707 indica una región donde el clasificador de células displásicas funciona con una sensibilidad del 75% y una especificidad de casi el 100%. El clasificador se construyó utilizando un conjunto de datos que incluía células que indicaban un proceso pulmonar anormal que consistía en displasia moderada a grave y algunas condiciones celulares atípicas. El entrenamiento del clasificador se implementó utilizando un conjunto de aproximadamente 150 células displásicas conocidas y aproximadamente 25.000 células normales conocidas. La precisión se demuestra mediante la curva ROC de célula única 700 que muestra una detección casi perfecta de células displásicas. La precisión del clasificador a menudo se expresa como el área bajo la curva ROC (AROC). La discriminación perfecta resulta cuando el AROC es 1. El valor AROC de LuCED es 0,991. Para la detección de células individuales, se seleccionó un punto operativo que proporciona una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100%. La clasificación celular se relaciona con la detección del caso como se muestra en la siguiente lista. Por ejemplo, si se encuentra una célula anormal durante el análisis de LuCED, la probabilidad de detección del caso sería 0,75, o 75%. Si LuCED encontrara dos células anormales, la probabilidad de detección de casos sería $(1 - (1 - 0,75)^2) = 0,9375$ o casi un 94 % de sensibilidad al caso, etc.

1 célula - 75% de sensibilidad de caso,

2 células - 94% de sensibilidad de caso, y

3 células - 98% de sensibilidad de caso.

Clasificación celular

Ahora, con referencia a la FIG. 8, se incluyen varios algoritmos de clasificación de células en el sistema para la detección de displasia y otras afecciones. En un ejemplo, los clasificadores incluyen un clasificador para detectar reconstrucciones deficientes 30, un clasificador de adecuación 910, un clasificador de células normales/anormales 32, un clasificador de tinción 36, un clasificador de células anormales 42, un clasificador de células precancerosas 43, un clasificador de células cancerosas 45 y un clasificador de células displásicas 50. El clasificador de células precancerosas 43, el clasificador de células cancerosas 45 y el clasificador de células displásicas 50 están acoplados para proporcionar datos de clasificación a un generador de protocolo de tratamiento 836 (que se analiza en detalle a continuación). Los clasificadores utilizados en el sistema de detección citológica se entrenan como se describe a continuación. En un ejemplo útil, el clasificador para detectar reconstrucciones deficientes 30 puede ser como el descrito anteriormente con referencia a Meyer et al. Antes de clasificar la célula como normal o anormal, se aplica el clasificador de adecuación del espécimen 910. Un procedimiento de este tipo para determinar la adecuación de la muestra se enseña en detalle en la solicitud de patente estadounidense copendiente número 14/788.015, de Meyer et. al., uno de los inventores aquí, presentada el 30/6/2015. En un ejemplo, los clasificadores para una galería de células normales 32 identifican células normales para servir como punto de referencia para la identificación humana de células anormales utilizando una estación de revisión. Los tipos de células normales pueden subdividirse en clases que incluyen células intermedias escamosas normales y otras células normales, incluidas las células epiteliales columnares normales y los macrófagos normales.

El clasificador de tinción 36 funciona, por ejemplo, procesando células identificadas como células intermedias escamosas para determinar si las células están en el rango de tinción correcto para la prueba LuCED. El núcleo de una célula intermedia escamosa tiene ploidía constante, lo que hace que su valor de densidad óptica en escala de grises integrada general sea una característica ideal que puede usarse para evaluar si la tinción de la muestra está en el rango correcto para un contraste de absorción óptimo. Se pueden calcular valores de escala de grises promedio y mediano para cada núcleo y mantener un promedio móvil. El valor estable para el promedio es la mancha que puede usarse como normalización para los valores de escala de grises individuales del núcleo en consideración.

El clasificador de células anormales 42 se genera al ser entrenado para identificar células objetivo que tienen características anormales utilizando procedimientos de entrenamiento de clasificadores descritos en este documento. Estas células diana (normalmente el 0,5 % de todas las células procesadas) pasan a ser examinadas por un patólogo utilizando la estación de revisión 25, como una estación de trabajo CellGazer™ desarrollada por VisionGate, Inc. de Phoenix, AZ. En ciertas realizaciones, las células diana incluyen células escamosas anormales, células de adenocarcinoma, células de carcinoma bronquioloalveolar, células neuroendocrinas anormales, células de carcinoma de células pequeñas, células de carcinoma de células grandes, células columnares de pulmón,

células tumorales, células neoplásicas y células de carcinoma bronquioloalveolar y otras células y objetos encontrados en el esputo. El clasificador de células anormales funciona para identificar células cancerosas y precancerosas.

5 Las células precancerosas se analizan más a fondo mediante el clasificador de células precancerosas 43. El clasificador precanceroso distingue entre células precancerosas de origen glandular y precancerosas de origen escamoso (displasia). Si las células son displásicas, se envían al clasificador de células displásicas 50. El clasificador de células displásicas 50 se genera al ser entrenado para identificar células diana que tienen características utilizando procedimientos de entrenamiento de clasificador. Como se explicó anteriormente con
10 referencia a la FIG. 7, el clasificador displásico se entrenó utilizando un conjunto de aproximadamente 150 células displásicas conocidas y aproximadamente 25 000 células normales conocidas. El clasificador de células displásicas 50 identifica además las células que presentan displasia leve, moderada o grave.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 9, se muestra esquemáticamente un diagrama de bloques funcional de un ejemplo de un clasificador de células cancerosas 45 para el análisis de un espécimen de esputo en busca de displasia y cáncer. El clasificador de células cancerosas clasifica además las células como adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas o células de carcinoma escamoso.

Para promover una mejor comprensión del sistema y el procedimiento aquí descritos, a continuación se describirá en detalle un ejemplo del funcionamiento del sistema. Las opciones de tratamiento se seleccionan dependiendo de las clasificaciones determinadas por los algoritmos de clasificación a partir de un espécimen de esputo como se explicó anteriormente.

Haciendo referencia ahora a la FIG. 10, se muestra esquemáticamente un diagrama de bloques funcional de alto nivel de un generador de protocolo. En funcionamiento, si el clasificador de células normales/anormales 32 detecta células anormales, el clasificador de células anormales 42 clasifica dichas células anormales como precancerosas 842 o cancerosas 840. Como se describió anteriormente, las células clasificadas como cancerosas 840 se identifican además como adenocarcinoma 854, carcinoma de células pequeñas 852 o células de carcinoma escamoso 850. Se puede realizar una biopsia para verificar lesiones sospechosas. Si se detecta cáncer como resultado de la biopsia, se pueden realizar procedimientos quirúrgicos para extirpar la lesión o lesiones cancerosas junto con un tratamiento de quimioprevención farmacéutica 860.

Si se detectan células precancerosas, se utiliza el clasificador de células precancerosas 43 para clasificar las células del espécimen de esputo como células precancerosas de origen glandular 842 o displásicas 838. Si las células se clasifican como precancerosas, entonces se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo contra el cáncer durante un período de tiempo predeterminado. Posteriormente, las células displásicas se clasifican mediante el clasificador de células displásicas en displasia leve-moderada, displasia moderada a severa o displasia severa. Si las células se clasifican como displasia leve, moderada o grave, entonces se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo contra el cáncer 856 durante un período de tiempo predeterminado. En el caso en
40 que se descubran células precancerosas y cancerosas, se verifica el estado de cáncer de cualquier lesión sospechosa y, si se encuentra cáncer, se pueden administrar procedimientos quirúrgicos para eliminar la lesión cancerosa y se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo contra el cáncer durante un período de tiempo predeterminado. Los productos farmacéuticos útiles para la quimioprevención del cáncer incluyen medicamentos seleccionados del grupo que consiste en un análogo de prostaciclina, iloprost, un receptor de antígeno quimérico (CAR) para células T y Vorinostat u otros inhibidores de HDAC.

Entrenamiento del clasificador: entradas y procedimientos

La creación y optimización de los clasificadores de detección de células descritos anteriormente generalmente se conoce como "entrenamiento de clasificadores", ya que el proceso tiene como objetivo diagnosticar células con precisión de acuerdo con una referencia o verdad fundamental. La precisión tiene dos aspectos principales: el primero es la especificidad (las células normales son llamadas normales por el clasificador) y el segundo es la sensibilidad (las células anormales son llamadas anormales por el clasificador). Los procedimientos de entrenamiento de algoritmos incluyen regresión logística potenciada adaptativamente y bosque aleatorio. Los expertos en la materia estarán familiarizados con cómo aplicar otras técnicas de entrenamiento clásicas para clasificadores, como procedimientos de plantilla, procesamiento adaptativo y similares.

Los procedimientos utilizados para entrenar el clasificador garantizan un resultado extremadamente bueno dados los datos utilizados como entrada. Básicamente, la precisión del clasificador se garantiza cuando las entradas al proceso de entrenamiento del clasificador describen con precisión aspectos clínicamente relevantes de las células y son resistentes a los factores ambientales que podrían influir en los resultados del sistema de tomografía óptica:

1. Como se muestra arriba con referencia a la FIG. 6A-FIG. 6D, las imágenes de células tridimensionales generadas por el sistema de tomografía óptica tienen alta resolución, lo que permite mediciones precisas de características críticas que respaldan una clasificación correcta.

2. Algunas características que son útiles para la clasificación surgen sólo en la imagen 3D. En consecuencia, el conjunto de características 3D no solo es más descriptivo de la célula sino también más rico, lo que hace que la clasificación basada en imágenes tridimensionales sea más precisa que la de las imágenes 2D.

3. Se han desarrollado algoritmos de segmentación de imágenes tridimensionales para aislar la célula completa del fondo y el núcleo de la célula. La precisión de estos algoritmos de segmentación se verificó comparando el rastro segmentado con rastros de células o envolturas nucleares derivadas de humanos.

4. Las mediciones de características describen varios aspectos de la célula, el núcleo celular, el citoplasma y los nucléolos celulares. En un ejemplo de un sistema de prueba, se calculan 594 características para cada imagen de célula 3D que representan la forma del objeto, el volumen, la distribución de la cromatina y otros elementos morfométricos más sutiles. Se ha verificado que el cálculo de estas características es independiente de la orientación de la célula.

5. La verdad diagnóstica (el estándar de oro de la patología) para el entrenamiento del clasificador se basa en diagnósticos celulares jerárquicos proporcionados por dos citotecnólogos y un citopatólogo.

Entrenamiento de clasificadores: consideraciones estadísticas

En segundo lugar, en una prueba realizada por los inventores en este trabajo, se aseguró la precisión del proceso de entrenamiento del clasificador a través de un proceso riguroso que abarcó tres aspectos:

1. La base de datos que se utilizó para entrenar el clasificador se formuló para contener suficiente material para garantizar que los intervalos de confianza binomiales del 95% mantengan la varianza de las estimaciones de rendimiento dentro de límites aceptables.

2. El sobreentrenamiento es un posible obstáculo del proceso de entrenamiento: se podría incluir demasiada información en el clasificador y el resultado podría volverse demasiado especializado en relación con los datos utilizados en el entrenamiento. Esta situación genera una estimación demasiado optimista del rendimiento del clasificador. Los riesgos de sobreentrenamiento se pueden mitigar mediante la validación cruzada, que implica tomar una parte de los datos de entrenamiento y utilizarla como datos de prueba. Los límites para la cantidad de información que se puede utilizar en el clasificador se alcanzan cuando las estimaciones de rendimiento basadas en datos de entrenamiento exceden las estimaciones de los datos de prueba.

3. Por último, como garantía adicional contra el sobreentrenamiento, el clasificador se probó con datos de un segundo conjunto de células que no formaban parte del proceso de entrenamiento.

Resumen del entrenamiento del clasificador de células anormales

Las siguientes consideraciones se utilizaron para definir los parámetros que rigen el entrenamiento del clasificador de células anormales 42:

1. Dado que las células anormales en los especímenes de esputo son escasas y los elementos no diagnósticos en el esputo son abundantes, el clasificador debe operar con alta sensibilidad y muy alta especificidad. Como se describe más adelante en la Tabla 1, se mantiene una alta sensibilidad de detección de casos cuando la sensibilidad del clasificador de células individuales es del 75 % y la muestra contiene más de una célula anormal.

2. Para garantizar que la carga de trabajo se mantenga dentro de límites razonables, el objetivo de especificidad se estableció en el 99%.

3. Los intervalos para el límite de confianza binomial inferior del 95%⁽²¹⁾ debían mantenerse por encima del 70% para la sensibilidad y del 98,5% para la especificidad.

Al final, se desea una alta tasa de detección para cada caso positivo. La sensibilidad de la detección de células individuales se traduce en la detección del caso anormal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Número de células anormales en el análisis	Sensibilidad de caso basada en una sensibilidad de celda individual del 71% (%)
1	71,0
2	91,6
3	97,6

Las implicaciones de la Tabla 1, son importantes para la prueba de detección del cáncer de pulmón. Los resultados mostrados en esta tabla indican que, si una célula anormal está en el grupo analizado por la prueba de detección de cáncer de pulmón, será detectada con confianza, de modo que el caso se identificará con alta sensibilidad. Esto deja la cuestión de la presencia de células anormales en el análisis de la prueba de detección de cáncer de pulmón como el factor restante que determina la tasa de detección de cáncer.

Adecuación de la muestra

Debido a que el esputo es un espécimen muy variable de un paciente a otro, se necesita un proceso para evaluar si las células analizadas mediante la prueba de detección de cáncer de pulmón comprenden una muestra pulmonar suficiente para la detección de la enfermedad. La adecuación del esputo clásico se evalúa en función de la presencia de abundantes macrófagos alveolares, sin embargo, estos tipos de células no se conservan durante el proceso de enriquecimiento celular de la prueba de detección de cáncer de pulmón. Además, evaluaciones previas de la relación entre la presencia de macrófagos y la presencia de células anormales en el esputo no han brindado confianza en este procedimiento de determinación de la adecuación. En consecuencia, la adecuación de la prueba de detección del cáncer de pulmón se basa en una enumeración de células de referencia, como las células epiteliales bronquiales normales, incluidas las células metaplásicas y las células columnares. La prueba de detección de cáncer de pulmón enumera automáticamente estas células, por lo que no se requiere un análisis manual separado para comprobar su idoneidad. Como se señaló, el procesamiento de muestras para pruebas de detección de cáncer de pulmón elimina elementos no diagnósticos del esputo. Este procesamiento tiene el efecto de aleatorizar el contenido celular dentro del pellet celular enriquecido. Esto implica que la probabilidad de encontrar una célula anormal durante el análisis de una muestra de un paciente con cáncer durante una prueba de detección de cáncer de pulmón depende principalmente de la relación entre células anormales y el número de células normales en la muestra y el número de células normales procesadas por la prueba de detección de cáncer de pulmón. Esta relación depende de muchos factores, incluido el tamaño de la lesión, la dinámica de la tos, etc. La detección de casos depende entonces principalmente del procesamiento de suficientes células epiteliales bronquiales normales para que las células anormales también sean procesadas.

Desarrollo y características del clasificador

Generalmente, las características se calculan para proporcionar una representación numérica de varios aspectos del tomograma 3D. Las características calculadas se utilizan junto con el diagnóstico experto de los objetos para desarrollar un clasificador que pueda distinguir entre tipos de objetos. Por ejemplo, un conjunto de datos con M tomografías 3D calculadas para objetos de un primer tipo, tipo 1, y N tomografías 3D pueden calcularse para objetos de un segundo tipo, tipo 2, como células normales y anormales. Aquí "M" y "N" representan el número de valores de tipo 1 y tipo 2 respectivamente. El conjunto de datos se genera preferiblemente mediante un sistema de tomografía óptica. El sistema de tomografía óptica proporciona tomografías 3D que incluyen imágenes en 3D de objetos como, por ejemplo, una célula. Una célula normalmente incluye otras características, como un núcleo que tiene orgánulos como nucléolos. Los tipos de objetos pueden incluir diferentes tipos de células, orgánulos, células que presentan estados de enfermedad seleccionados, sondas, células normales u otras características de interés. Se calcula un conjunto de x características de imagen 3D basándose en tomografías 3D para todos los objetos M+N. A continuación, se busca un conjunto de características refinado de y características de imagen 3D que discriminan mejor los tipos de objetos, donde "x" e "y" representan el número de características de imagen 3D en cada etapa. El conjunto de características de imagen 3D refinadas se utiliza para construir un clasificador cuya salida se correlaciona con el tipo de objeto. En una realización de ejemplo, en la etapa 102 se ensambla un conjunto de tomografías 3D, donde el conjunto ensamblado representa sustancialmente todos los marcadores importantes que utilizaría un experto para distinguir tipos de objetos biológicos 3D. Una vez ensamblado un conjunto representativo de tomografías 3D, se puede calcular un conjunto de características de imagen 3D para cada objeto que caracteriza los marcadores importantes.

Características

Los tomogramas de objetos biológicos, como células, exhiben una pluralidad de características observables y mensurables, algunas de las cuales pueden usarse como características para la clasificación. En la Tabla 2 a continuación se ofrece un resumen resumido de las características, es decir, los marcadores importantes utilizados para fomentar los objetivos de clasificación.

Tabla 2

CARACTERÍSTICAS

Nombre de la característica	Breve descripción
Volumen	Número de vóxeles conectados que componen un objeto.
Área de superficie	Número de vóxeles en la superficie exterior de un objeto discreto.
Características de la forma	Basado en el cuadro delimitador, relación área de superficie/volumen.
Ubicación	Centro geométrico y centro de masa de un objeto.
Vacíos	Basado en un umbral T, número, volumen, área de superficie, forma y ubicación de los huecos internucleares.
Invaginaciones	Basado en un umbral T, recuento, tamaño y localización de invaginaciones nucleares.
Vacíos de invaginación	Basado en un umbral T, volumen, área de superficie, forma, ubicación de huecos conectados a invaginaciones.
Nucléolos	Basado en un umbral T, volumen, área de superficie, forma y ubicación de objetos que probablemente sean nucléolos o condensaciones de cromatina.
Textura nuclear	La técnica de un residuo borroso, que utiliza elementos de estructura de características de varios tamaños, se utiliza para separar características de varios tamaños dentro del núcleo. Luego se calcula el volumen 3D general, así como el número de componentes discretos, el histograma de volumen, el volumen y la varianza promedio y el histograma de forma.
Métricas de distancia	Las métricas describen las relaciones espaciales entre los nucléolos, las invaginaciones, los vacíos y la envoltura nuclear. Por ejemplo, si se encuentran tres nucléolos, se puede encontrar la media y la varianza y la distancia mínima y máxima entre nucléolos. También se puede encontrar la distancia entre las coordenadas promedio del conjunto de nucléolos y el centro de masa de todo el objeto. Se pueden realizar cálculos similares sustituyendo cualquiera de las entidades anteriores por los nucléolos y el centro de masa nuclear.
Características de FFT	La FFT de una tomografía 3D y las características de la FFT caracterizan los elementos FFT prominentes y promedio.
Características estadísticas del histograma	Características estadísticas relacionadas con el histograma 3D de valores de gris para vóxeles como la curtosis, el momento estadístico de
Características 2D	Las características bidimensionales incluyen características de textura como residuos borrosos y características geométricas que incluyen el perímetro y la circularidad del objeto.

- 5 A modo de explicación adicional, en un ejemplo útil, se ha descubierto que los vacíos que aparecen en objetos biológicos 3D son características de clasificación útiles basadas en criterios de medición que incluyen la comparación con un umbral calculado o seleccionado. Otra característica relacionada con los vacíos puede incluir el número de vacíos en un objeto. Otra característica relacionada con los vacíos incluye el volumen de un vacío o
- 10 el número de vacíos. Otra característica incluye el área de superficie de un vacío o el número de vacíos. La forma y la ubicación de los vacíos internucleares también pueden emplearse como una característica distintiva útil. Además, también se pueden utilizar combinaciones de elementos característicos para construir un clasificador como se describe anteriormente.
- 15 De manera similar, ahora se ha descubierto que las invaginaciones que se producen en objetos biológicos 3D son características de clasificación útiles basadas en criterios de medición que incluyen la comparación con un umbral calculado o seleccionado. Otra característica relacionada con las invaginaciones puede incluir el número de invaginaciones en un objeto. Otra característica relacionada con las invaginaciones incluye el volumen de una invaginación o el número de invaginaciones. Otra característica incluye el tamaño de una invaginación o el número
- 20 de invaginaciones. La localización de las invaginaciones nucleares también constituye una característica útil. Además, también se pueden utilizar combinaciones de elementos característicos para construir un clasificador como se describe anteriormente.
- 25 Se ha descubierto que las invaginaciones que se producen en objetos biológicos 3D son características de clasificación útiles basadas en criterios de medición que incluyen la comparación con un umbral calculado o seleccionado. El volumen de los vacíos de invaginación, el área de superficie, la forma, la ubicación de los vacíos

conectados a las invaginaciones y las combinaciones de características de invaginación también se pueden utilizar de manera ventajosa para construir un clasificador como se describe anteriormente.

Se ha descubierto que los nucléolos presentes en objetos biológicos tridimensionales son características de clasificación útiles basadas en criterios de medición que incluyen la comparación con un umbral calculado o seleccionado. El volumen, la superficie, la forma, la ubicación de los objetos que probablemente sean nucléolos o condensaciones de cromatina y las combinaciones de las características mencionadas anteriormente también pueden usarse de manera ventajosa para construir un clasificador como el descrito anteriormente. Se ha descubierto que las características de textura nuclear que aparecen en objetos biológicos 3D son características de clasificación útiles. Utilizando elementos de estructura de distintos tamaños, se utiliza la técnica de residuo borroso para separar características de distintos tamaños dentro del núcleo. Las técnicas de residuos borrosos generalmente requieren desenfocar una imagen usando un filtro y medir los residuos borrosos resultantes mediante la aplicación de operaciones de marcado. Luego se calcula el volumen 3D general, así como el número de componentes discretos, el histograma de volumen, el volumen y la varianza promedio y el histograma de forma.

Ahora se ha descubierto que las métricas de distancia que describen las relaciones espaciales entre nucléolos, invaginaciones, vacíos y la envoltura nuclear son características de clasificación útiles. Por ejemplo, si se encuentran tres nucléolos, se puede encontrar la media y la varianza y la distancia mínima y máxima entre nucléolos. Además, se puede encontrar la distancia entre las coordenadas promedio del grupo de nucléolos y el centro de masa de todo el objeto. Se pueden realizar cálculos similares sustituyendo cualquiera de las entidades anteriores por los nucléolos y el centro de masa nuclear.

Ahora también se ha descubierto que las características de la Transformada Rápida de Fourier (FFT) son características de clasificación útiles. Las características FFT se forman mediante una Transformada Rápida de Fourier de un tomograma 3D. Las características FFT caracterizan los elementos prominentes y promedio de la clasificación FFT.

Metodologías de ejemplo

Después de haber proporcionado una descripción detallada de los procedimientos y sistemas para determinar células displásicas y la administración del tratamiento, se considera útil para la comprensión de la invención proporcionar algunos ejemplos detallados de construcción y uso del sistema.

En un ejemplo, un procedimiento para la detección y el monitoreo automatizados de condiciones celulares precancerosas mediante el análisis de imágenes 3D de células basadas en pseudoproyecciones obtenidas de un espécimen de esputo obtenido de un sujeto comprende operar un clasificador de especímenes biológicos para identificar células del espécimen de esputo como normales o anormales. Si se detectan células anormales, éstas se clasifican además como precancerosas o cancerosas. Si se detectan células precancerosas, un clasificador de muestras biológicas clasifica las células del espécimen de esputo como: células precancerosas de origen glandular, displasia leve a moderada, displasia moderada a grave o displasia grave. Si las células se clasifican como cancerosas, entonces se realiza una biopsia para verificar lesiones sospechosas. Si se detecta cáncer, se realizan procedimientos quirúrgicos para eliminar la lesión cancerosa. Si las células se clasifican como precancerosas, entonces se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo contra el cáncer durante un período de tiempo predeterminado. Si las células se clasifican como displasia leve, moderada o grave, entonces se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo del cáncer durante un período de tiempo predeterminado. Si se descubren células precancerosas y cancerosas, se verifica el estado de cáncer de cualquier lesión sospechosa y, si se encuentra cáncer, se eliminan las lesiones cancerosas mediante procedimientos quirúrgicos y se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo contra el cáncer durante un período de tiempo predeterminado.

En otro ejemplo, el fármaco de quimiopreención del cáncer comprende un fármaco seleccionado del grupo que consiste en un análogo de prostaciclina, iloprost, un receptor de antígeno quimérico (CAR) para células T, vorinostat, inhibidores de HDAC, colecalciferol, calcitriol y combinaciones de los mismos.

En otro ejemplo, el tratamiento requiere administrar el fármaco quimiopreventivo contra el cáncer al sujeto durante un período de tiempo predeterminado, luego obtener un segundo espécimen de esputo del sujeto y repetir la operación del clasificador de muestras biológicas para clasificar las células como normales o anormales. Si se detectan células anormales, entonces las células anormales se clasifican además como cancerosas, células precancerosas de origen glandular, como displasia leve a moderada, displasia moderada a severa, displasia severa o cancerosas; y los resultados de la clasificación de la operación repetida se comparan con los resultados de la clasificación de la operación anterior para determinar la eficacia del fármaco de quimiopreención.

En otro ejemplo, un sistema de tomografía óptica para la detección y el seguimiento automatizados de displasia mediante el análisis de datos de característica de imágenes 3D de células obtenidas de un espécimen de esputo

obtenido de un sujeto incluye un clasificador de adecuación de muestra acoplado para recibir los datos de característica y generar un valor de adecuación de muestra. Se acopla un clasificador de células normales/anormales para recibir los datos de característica y detectar células normales y anormales. Un clasificador de células anormales está acoplado al clasificador de células normales/anormales para recibir datos de las células anormales y clasificarlas además en células cancerosas y precancerosas. Un clasificador de células precancerosas está acoplado al clasificador de células anormales para recibir datos de células precancerosas e identificar cada célula precancerosa como célula precancerosa de origen glandular o displásica. Un clasificador de células displásicas está acoplado a un clasificador de células precancerosas para recibir datos de células displásicas y clasificar además las células displásicas como displasia leve a moderada, displasia moderada a grave o displasia grave. Un generador de protocolo de tratamiento está adaptado para recibir datos de clasificación del clasificador de células anormales, el clasificador de células precancerosas y el clasificador de células displásicas y generar en respuesta un protocolo para administrar un fármaco de quimioprevención del cáncer al sujeto durante un período de tiempo predeterminado si así lo indica la detección de células cancerosas, precancerosas o displásicas.

En otro ejemplo, un procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de displasia mediante el análisis de imágenes 3D de una célula obtenida de un espécimen de esputo obtenido de un sujeto incluye proporcionar datos de imágenes en 3D para una célula contenida en el espécimen de esputo; proporcionar una determinación de adecuación de la muestra para el espécimen de esputo; si la determinación de adecuación de la muestra cumple con criterios predeterminados, entonces operar un clasificador normal/anormal para generar una determinación de normal/anormal; si la determinación es anormal, entonces identificar además la célula como cancerosa y luego se puede realizar una cirugía para extirpar el tumor, precancerosa de origen glandular o displásica; si la célula se clasifica como cancerosa, entonces determinar si la célula es cáncer escamoso o adenocarcinoma; y si la célula es displásica, entonces se puede administrar un fármaco de quimioprevención del cáncer al sujeto durante un período de tiempo predeterminado; Si la determinación es cancerosa y displásica, se puede realizar una cirugía para extirpar el tumor y además se puede administrar al sujeto un fármaco quimiopreventivo contra el cáncer durante un período de tiempo predeterminado.

En otro ejemplo, un procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de displasia mediante el análisis de imágenes de pseudoproyección de células obtenidas de un espécimen de esputo incluye proporcionar datos de imágenes en 3D para una célula contenida en el espécimen de esputo. Se realiza una determinación de adecuación de la muestra para el espécimen de esputo y, si la determinación de adecuación de la muestra cumple con los criterios predeterminados, entonces los datos celulares se identifican como condiciones normales y de metaplasia, displasia leve a moderada o displasia grave o CIS y/o cáncer. Se programa una prueba de esputo mediante tomografía óptica posterior dentro de los 12 a 24 meses posteriores si los datos celulares indican una condición normal y de metaplasia o dentro de los 6 meses posteriores si los datos celulares indican una displasia leve a moderada. Se programa una prueba de esputo mediante tomografía óptica posterior dentro de los 3 meses siguientes si los datos celulares indican displasia grave y se requiere confirmación de la displasia grave seguida de terapia de quimioprevención. Se programan pruebas diagnósticas de seguimiento, como tomografías computarizadas y broncoscopias, dentro de los 6 meses posteriores a que la displasia grave indique CIS y/o cáncer. Se administra al sujeto un fármaco quimiopreventivo del cáncer durante un período de tiempo predeterminado si la célula es displásica.

La invención se ha descrito aquí con considerable detalle para proporcionar a los expertos en la materia la información necesaria para aplicar los nuevos principios de la presente invención y para construir y utilizar componentes ejemplares y especializados que se requieran. Sin embargo, se debe entender que la invención puede llevarse a cabo mediante diferentes equipos y dispositivos, y que pueden realizarse diversas modificaciones, tanto en cuanto a los detalles del equipo como a los procedimientos operativos, sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de tomografía óptica configurado para la detección y el seguimiento automatizados de displasia mediante el análisis de datos de característica de imágenes 3D de células obtenidas de un espécimen de esputo obtenido de un sujeto, que comprende:
 - un clasificador de adecuación de muestra acoplado para recibir los datos de característica y generar un valor de adecuación de muestra;
 - un clasificador de células normales/anormales acoplado para recibir los datos de característica y detectar células normales y anormales; caracterizado por que comprende, además
 - un clasificador de células anormales acoplado al clasificador de células normales/anormales para recibir datos de las células anormales y clasificar adicionalmente las células anormales en células cancerosas y precancerosas;
 - un clasificador de células precancerosas acoplado al clasificador de células anormales para recibir datos de célula precancerosa e identificar cada célula precancerosa como célula precancerosa de origen glandular o displásica;
 - un clasificador de células displásicas acoplado al clasificador de células precancerosas para recibir datos de célula displásica y clasificar adicionalmente las células displásicas como displasia leve a moderada, displasia moderada a grave o displasia grave; y
 - un generador de protocolo de tratamiento está adaptado para recibir datos de clasificación del clasificador de células anormales, el clasificador de células precancerosas y el clasificador de células displásicas y generar en respuesta un protocolo para administrar un fármaco de quimioprevención de cáncer al sujeto durante un período de tiempo predeterminado si lo indica la detección de células cancerosas, precancerosas o displásicas.
2. El sistema de la reivindicación 1, donde el fármaco de quimioprevención del cáncer comprende un fármaco seleccionado del grupo que consiste en un análogo de prostaciclina, iloprost, un receptor de antígeno quimérico (CAR) para células T, Vorinostat, inhibidores de HDAC, colecalciferol, calcitriol y combinaciones de los mismos.
3. Un procedimiento para la detección y el seguimiento automatizados de displasia mediante el análisis de datos de característica de imágenes 3D de células obtenidas de un espécimen de esputo obtenido de un sujeto, que comprende:
 - proporcionar datos de imágenes 3D de una célula contenida en el espécimen de esputo;
 - operar un clasificador de adecuación de muestra acoplado para recibir los datos de característica y generar un valor de adecuación de muestra;
 - si una determinación de adecuación de muestra realizada por el clasificador de adecuación de muestra cumple criterios predeterminados, entonces operar un clasificador normal/anormal acoplado para recibir datos de característica y detectar células normales y anormales; caracterizado en
 - operar un clasificador anormal acoplado al clasificador normal/anormal para recibir datos de característica de las células anormales y clasificar adicionalmente las células anormales en células cancerosas y precancerosas;
 - operar un clasificador de células precancerosas acoplado al clasificador de células anormales para recibir datos de célula precancerosa e identificar cada célula precancerosa como célula precancerosa de origen glandular o displásica;
 - operar un clasificador de células displásicas acoplado al clasificador de células precancerosas para recibir datos de célula displásica y clasificar adicionalmente las células displásicas como displasia leve a moderada, displasia moderada a severa o displasia severa; y
 - operar un generador de protocolo de tratamiento para recibir datos de clasificación del clasificador de células anormales, el clasificador de células precancerosas y el clasificador de células displásicas y generar en respuesta un protocolo para administrar un fármaco de quimioprevención del cáncer al sujeto durante un período de tiempo predeterminado si lo indica la detección de células cancerosas, precancerosas o displásicas.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, donde el fármaco de quimioprevención del cáncer comprende un fármaco seleccionado del grupo que consiste en un análogo de prostaciclina, iloprost, un receptor de antígeno quimérico (CAR) para células T, Vorinostat, inhibidores de HDAC, colecalciferol, calcitriol y combinaciones de los mismos.

DIBUJOS

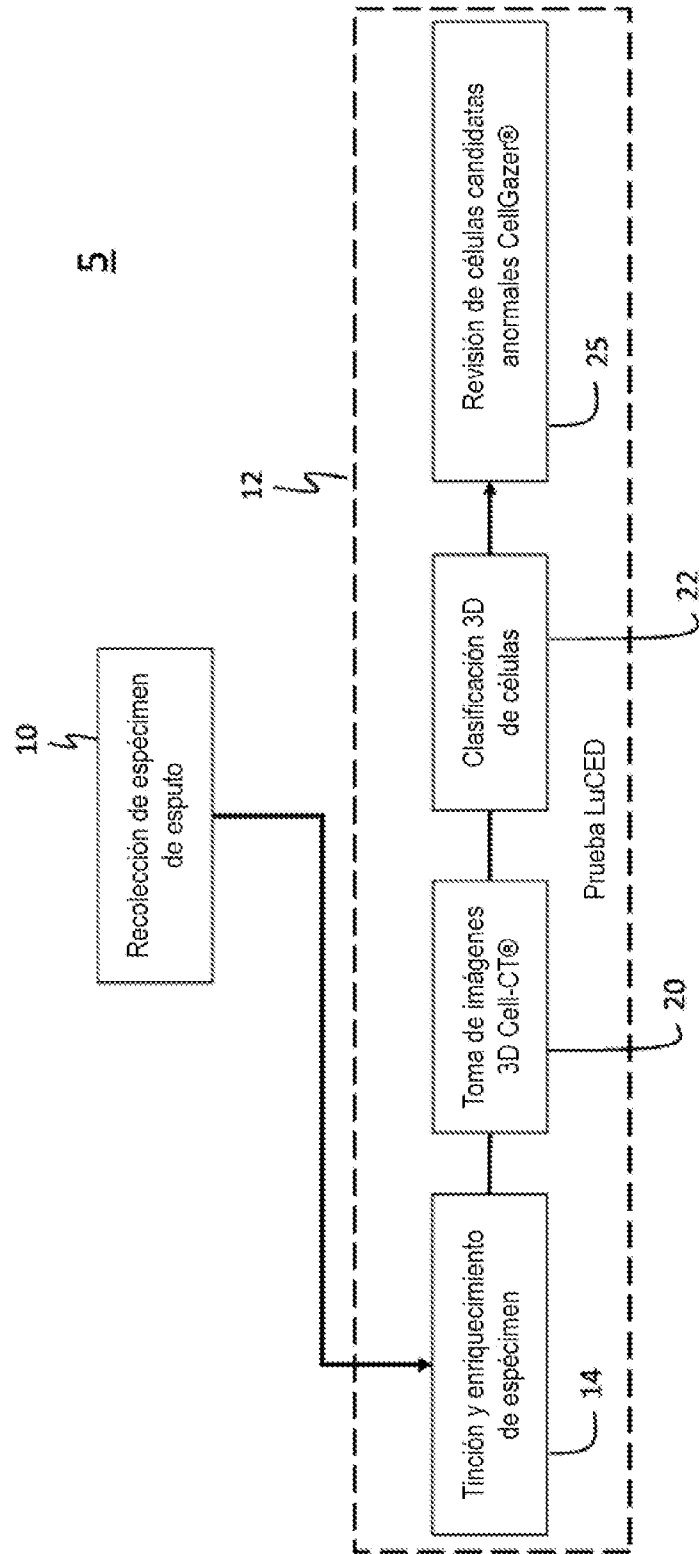
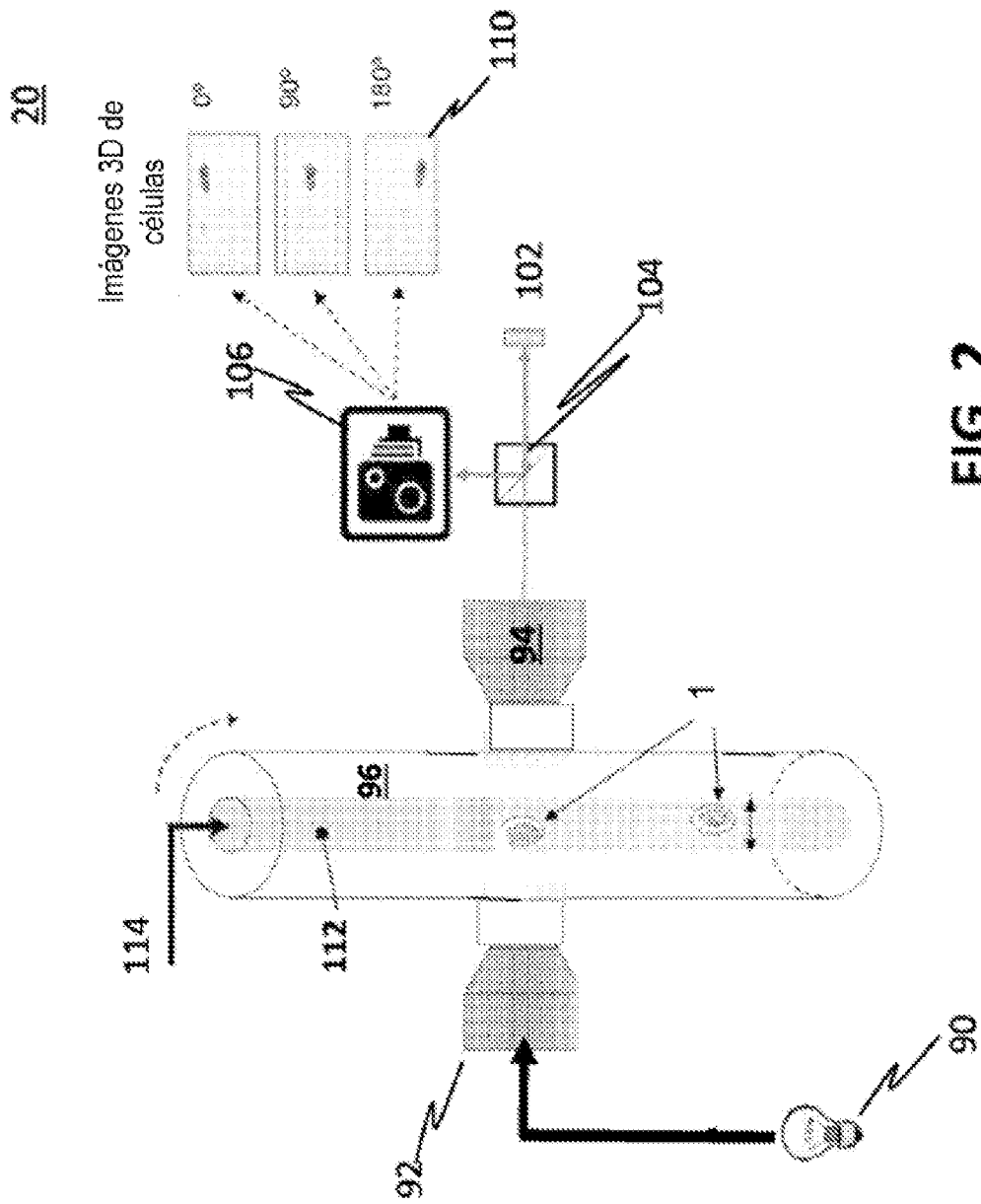


FIG. 1



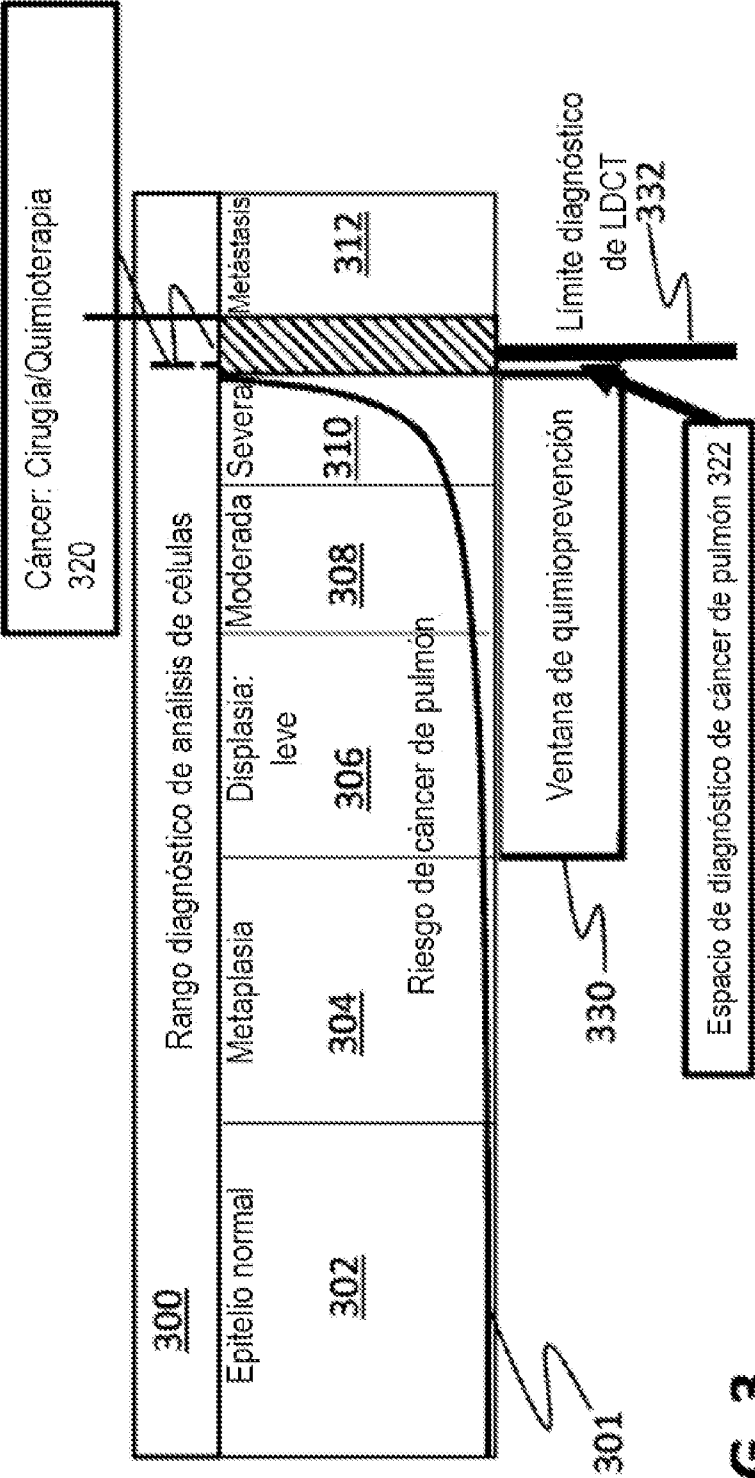


FIG. 3

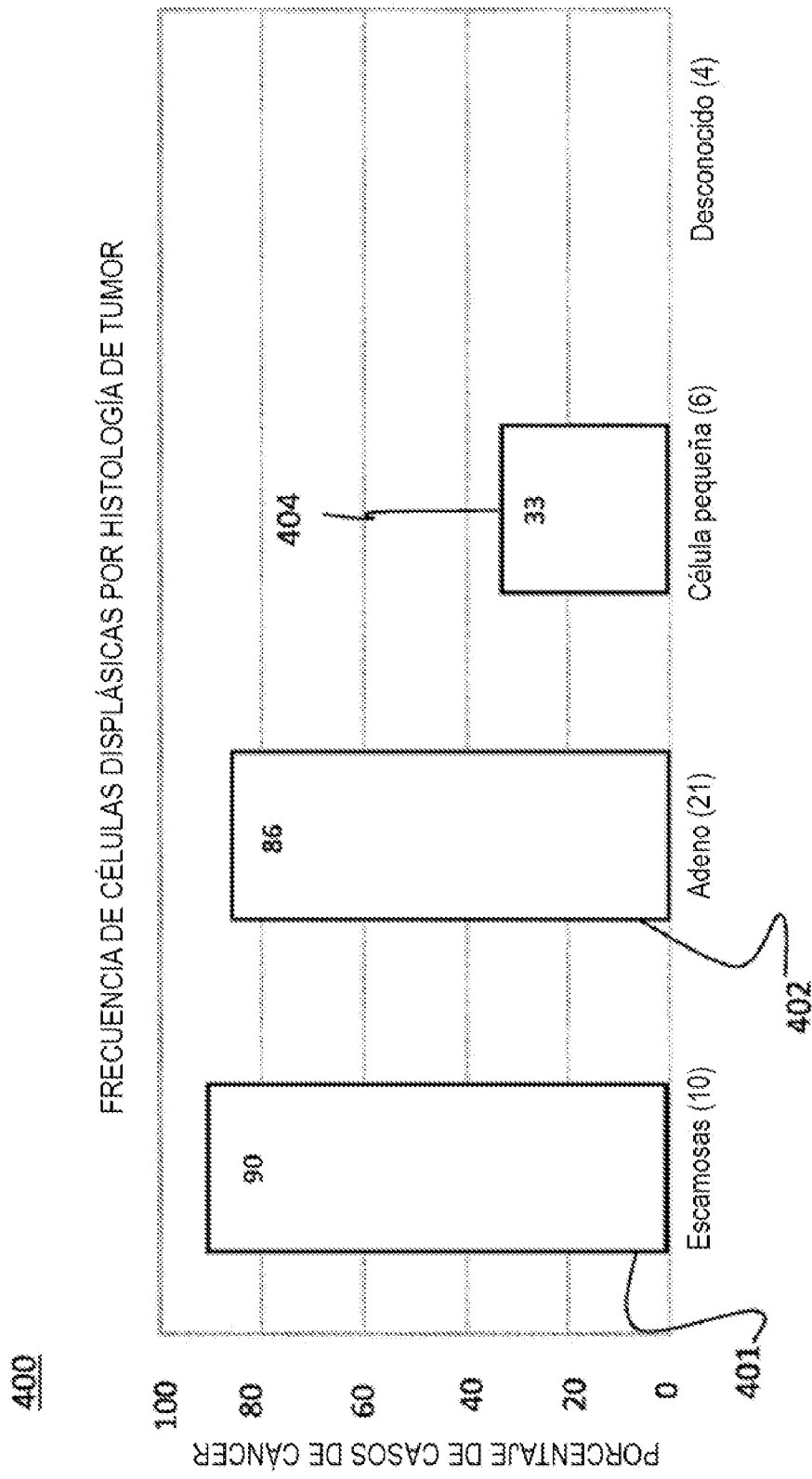


FIG. 4

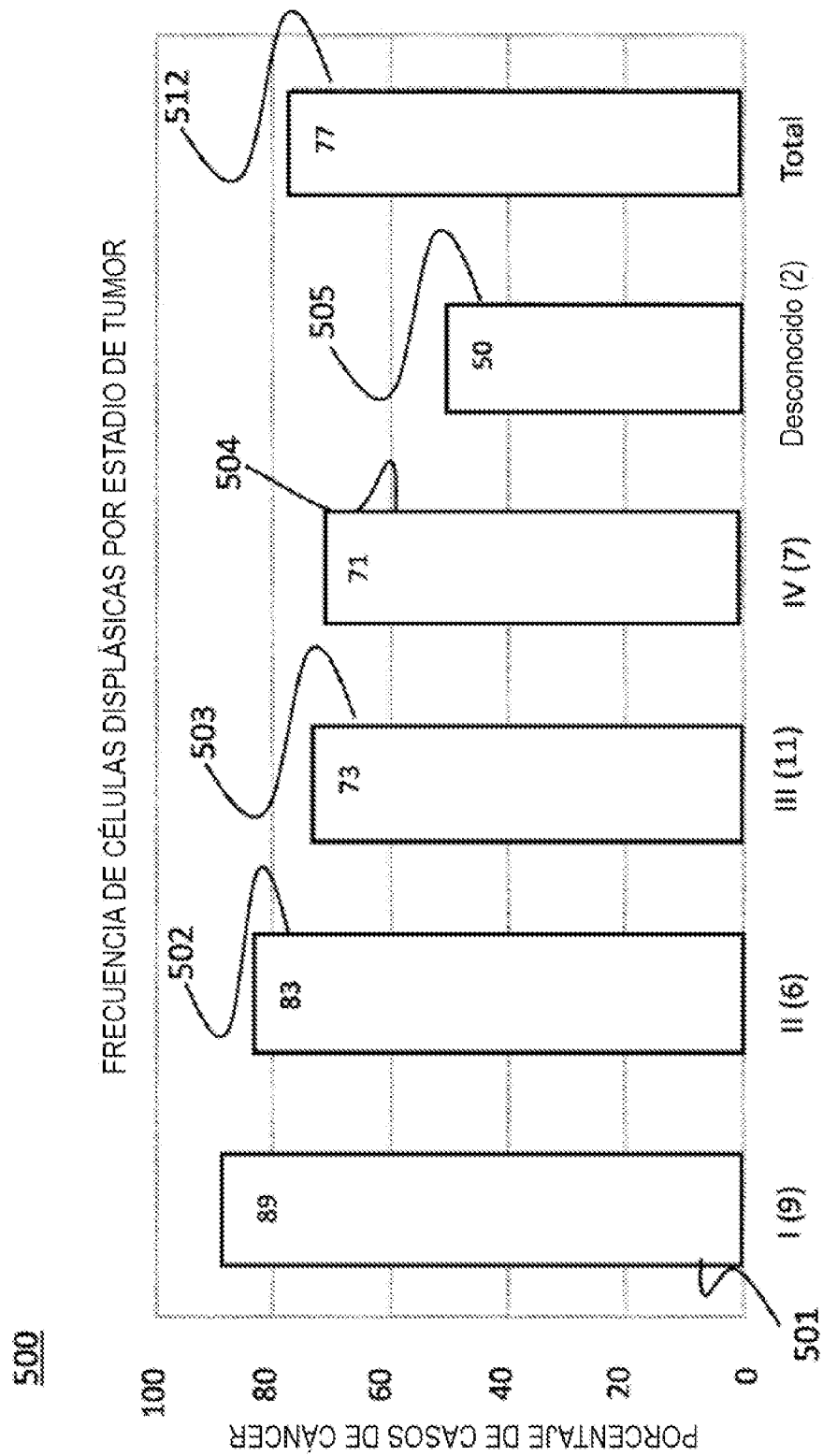


FIG. 5

FIG. 6D

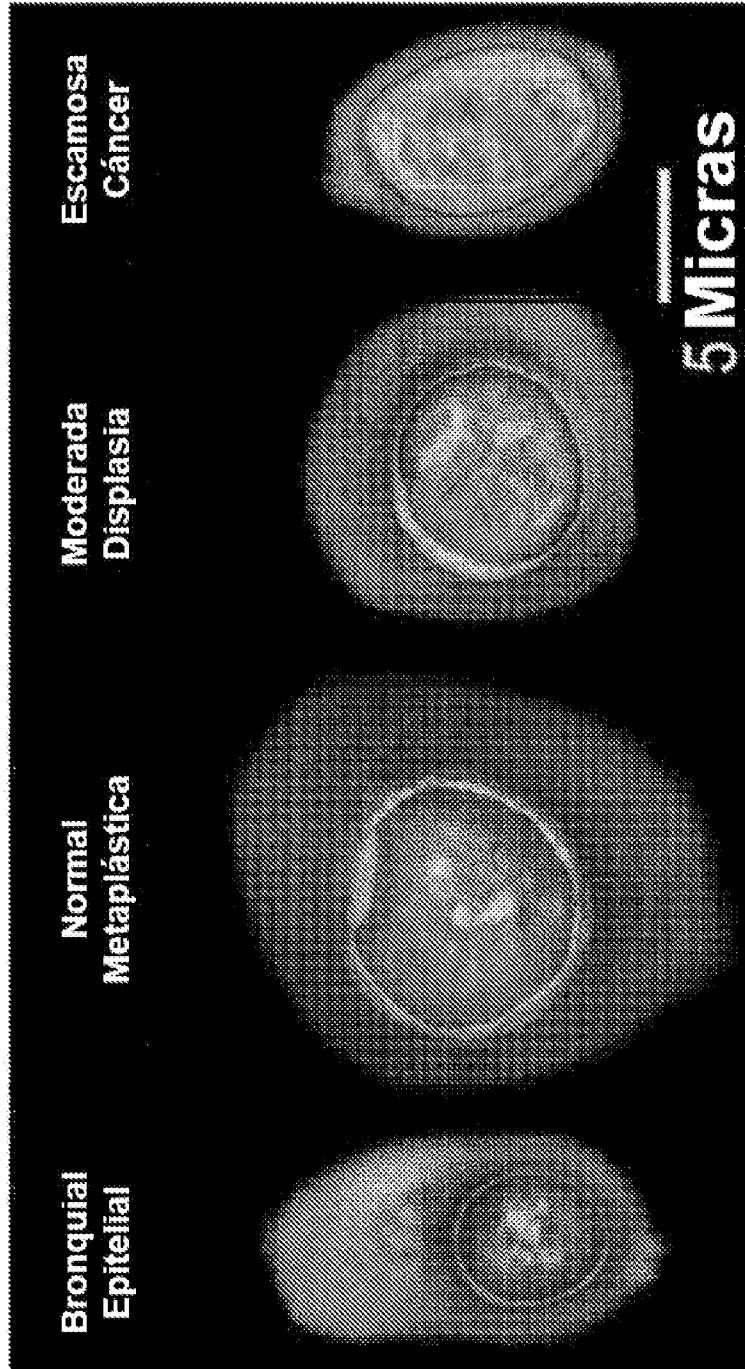


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

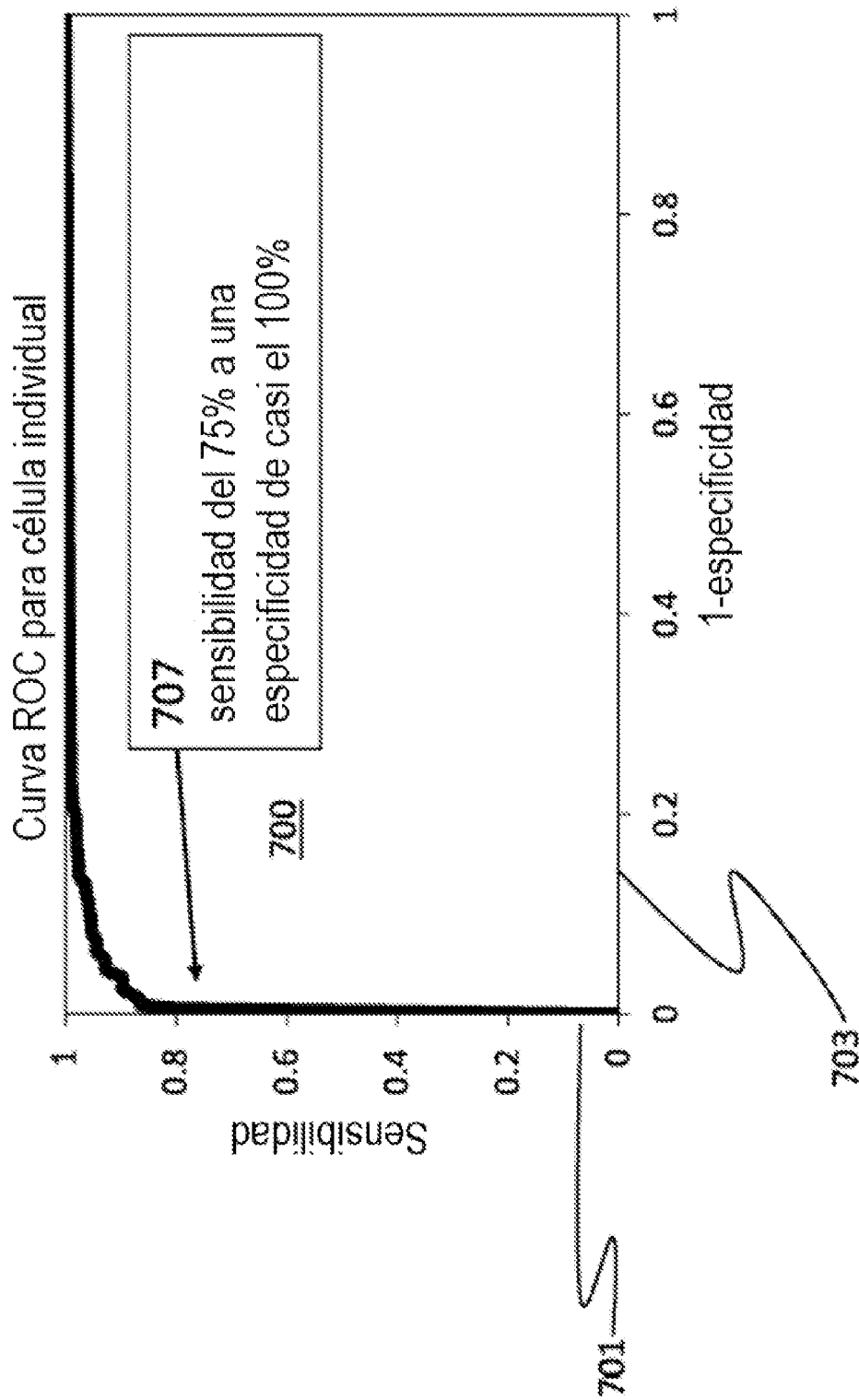


FIG. 7

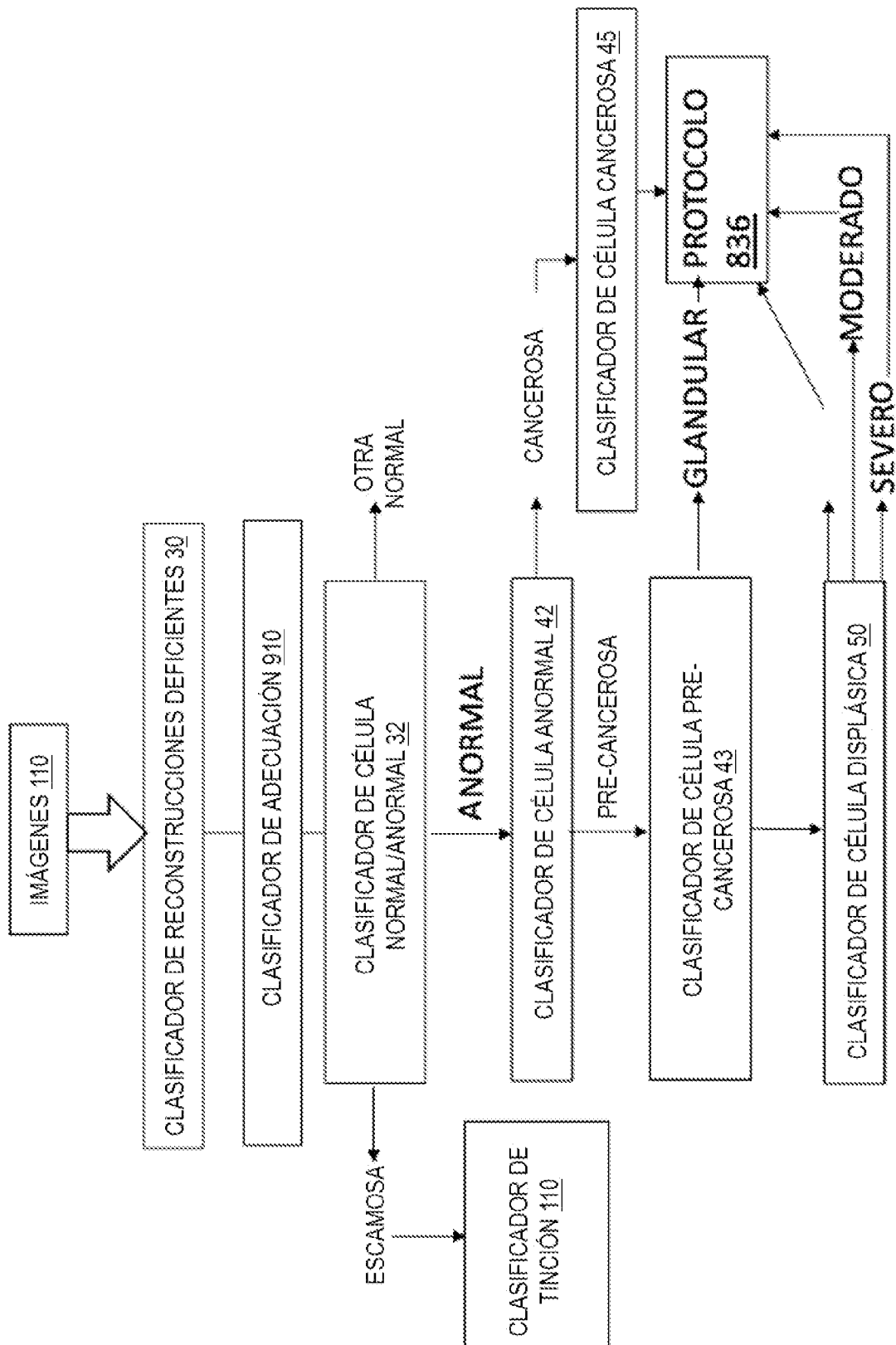


FIG. 8

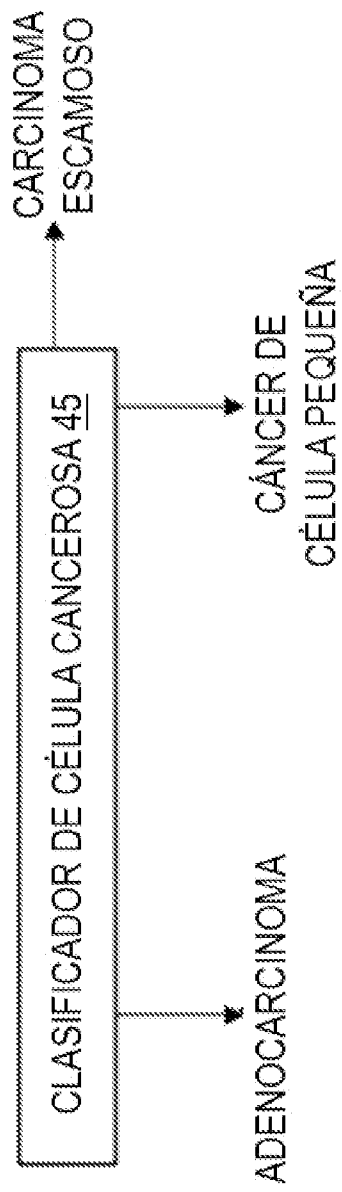


FIG. 9

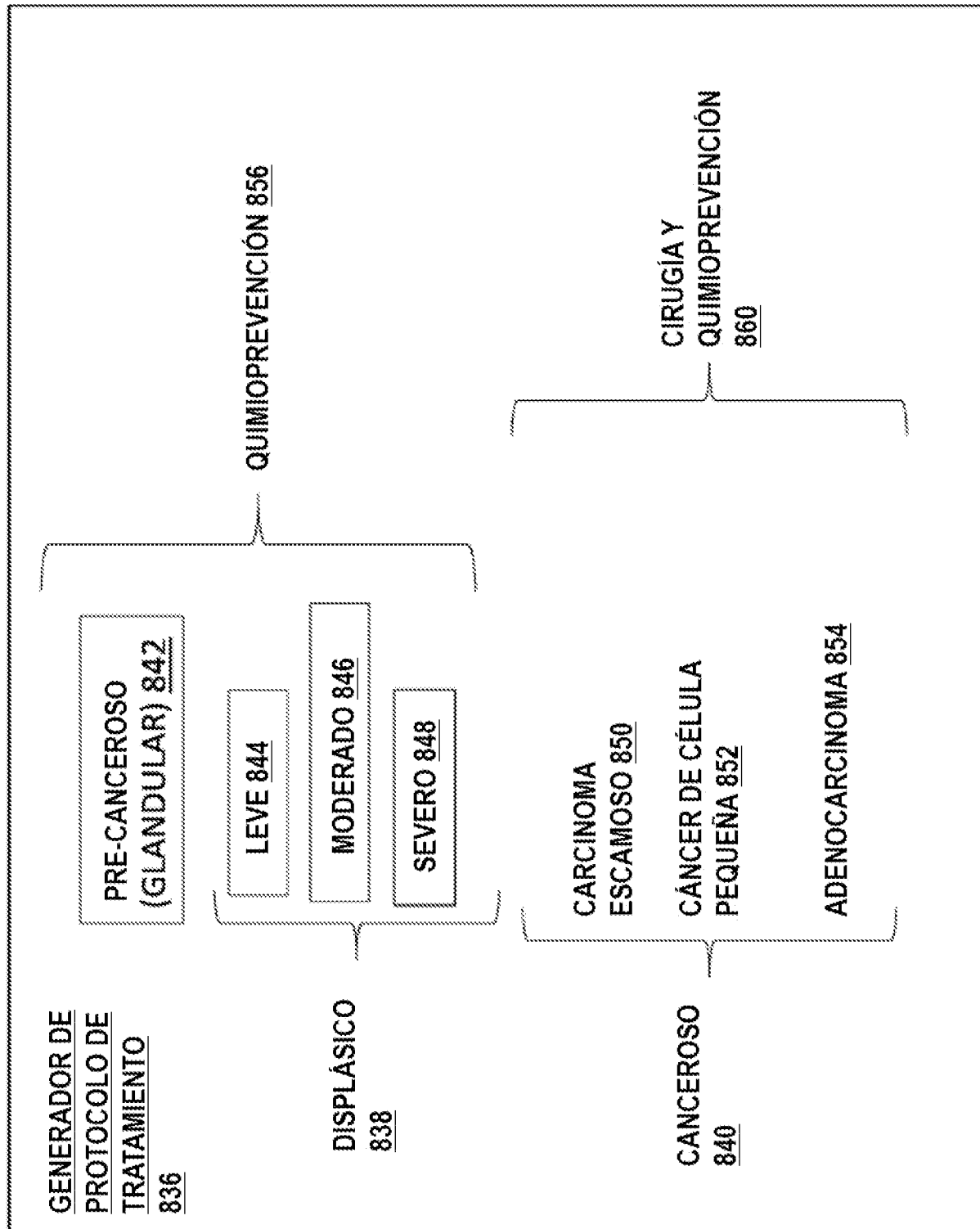


FIG. 10