

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 101**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2012** **PCT/US2012/071924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013** **WO13101989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012** **E 12816215 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018** **EP 2798355**

54 Título: **Análisis automatizado de células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

**30.12.2011 US 201161581825 P**

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

**02.01.2019**

73 Titular/es:

**VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)**  
**1910 E. Innovation Park Drive**  
**Tucson, Arizona 85755, US**

72 Inventor/es:

**PESTANO, GARY;**  
**DITTAMORE, RYAN;**  
**GARSHA, KARL;**  
**OTTER, MICHAEL;**  
**YUN, CHOL, S. y**  
**NAGY, ALEXANDRA DEA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 695 101 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Análisis automatizado de células tumorales circulantes

5 **Campo**

La divulgación proporciona procedimientos para la caracterización automatizada de células tumorales circulantes (CTC), por ejemplo, usando sistemas de tinción de tejidos automatizados.

10 **Antecedentes**

Las células tumorales circulantes (CTC) son células del tumor primario que se han propagado al sistema vascular y están potencialmente presentes en el cuerpo, en particular, en el torrente circulatorio. Las CTC pueden servir como moléculas de partida para las metástasis en localizaciones divergentes del tumor primario, lo que plantea un riesgo sustancial para la salud del enfermo de cáncer. La investigación indica que las CTC derivan de clones en el tumor primario y que desempeñan un papel importante en la diseminación metastásica de los carcinomas. Se ha demostrado que las CTC reflejan las características moleculares de las células en el tumor primario, posibilitando, por tanto, la caracterización del tumor sin una biopsia del tumor primario. Las CTC también representan metástasis en acción, y, por lo tanto, el seguimiento y el análisis de las CTC son indicativos del estado de la enfermedad del enfermo. Las CTC no se analizan fácilmente porque están presentes en números muy pequeños en la sangre. Por ejemplo, las CTC se pueden encontrar en frecuencias de aproximadamente 1-10 CTC por ml de sangre entera en enfermos con una enfermedad metastásica. Este pequeño número contrasta con los demás componentes celulares en un ml de sangre (por ejemplo, algunos millones de glóbulos blancos, mil millones de glóbulos rojos). Por tanto, usar CTC para propósitos de diagnóstico depende de la capacidad para aislar o identificar las CTC dentro en una amplia matriz de otras células. Además, la escasez de las células en una muestra potencia el valor de la muestra como dianas analíticas. En la actualidad, se sabe que las CTC están presentes en varios cánceres epiteliales (por ejemplo, de mama, próstata, pulmón y colon) y las pruebas clínicas indican que los enfermos con lesiones metastásicas tienen más probabilidad de tener CTC aislables.

30 Attard *et al.* (Cancer Research 2009, 69(7): 2912-2918) divulgan el aislamiento de las CTC con un procedimiento de selección inmunomagnética anti-EpCAM, que se analizan posteriormente en ensayos de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Para estos ensayos, las muestras se fijaron usando metanol/ácido acético 3:1.

35 Leversha *et al.* (Clinical Cancer Research 2009, 15(6): 2091-2097) divulgan la caracterización de la alteración del número de copias génicas mediante el ensayo de FISH con CTC. Sin proporcionar ningún dato adicional, Leversha *et al.* divulgan el uso de un "fijador para citología" en relación con la fijación de las CTC.

40 Xueying *et al.* (Asian Journal of Andrology 2008, 10(3): 467-473) abordan el análisis de la frecuencia de las fusiones génicas TMPRSS2:ERG y TMPRSS2:ETV en las CTC de enfermos de cáncer de próstata. La fijación de las CTC se realiza dejando caer las CTC sobre portaobjetos de vidrio y fijándolas *in situ* con etanol.

45 El documento WO 2009/051734 divulga dispositivos basados en microchips que pueden capturar CTC en una única etapa a partir de sangre entera. Esto se logra, entre otras cosas, sin fijación previa o cualquier otra etapa de procesamiento. Sin embargo, se describe un procedimiento de fijación de las CTC capturadas en el documento WO 2009/051734 que es, sin embargo, un tratamiento con PFA al 1 % en PBS seguido de una etapa de lavado con Triton X-100 al 0,2 % en PBS para inducir la permeabilidad celular. Aunque el documento WO 2009/051734 trata sobre la mejora de la captura de las células CTC, se centra en el uso de dispositivos con determinadas estructuras microfluídicas que proporcionan la captura de un gran número de CTC viables en una muestra.

50 **Sumario**

Se proporcionan procedimientos para analizar una muestra que se sabe o sospecha que contiene células tumorales circulantes (CTC) usando un instrumento automatizado. Además, en el presente documento se proporcionan procedimientos de caracterización del cáncer de próstata.

55 El procedimiento de análisis de una muestra que contiene células tumorales circulantes (CTC) usando un instrumento automatizado comprende: depositar una muestra de un sujeto con cáncer de próstata sobre un sustrato configurado para su uso con el instrumento automatizado, fijar la muestra con formol al 0,4 % durante 1 a 5 minutos seguido de formol tamponado neutro (FTN) al 10 % durante 5 a 15 minutos y metanol durante 1 a 5 minutos, permeabilizar la muestra con Tween 20 al 0,2 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS), retener al menos un 90 % de las CTC en la muestra sobre el sustrato tras la fijación y permeabilización, disponer el sustrato en el instrumento automatizado, recuperar las dianas de moléculas de proteína y ácido nucleico en la muestra usando el instrumento automatizado poniendo en contacto la muestra con reactivos de identificación de CTC usando el instrumento automatizado, y poniendo en contacto la muestra con sondas de ácido nucleico dirigidas al gen relacionado con ETS (ERG), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y centrómero 10 (CEN-10), en el que el contacto de la muestra con las sondas de ácido nucleico se hace mediante el instrumento automatizado, obtener

imágenes de la muestra, localizar las CTC en la muestra sobre el sustrato localizando los reactivos de identificación de CTC usando el instrumento automatizado, en el que los reactivos de identificación de CTC son reactivos inmunohistoquímicos dirigidos a una proteína CD45, una proteína citoqueratina (CQ), una proteína ERG, un receptor androgénico (RA), una proteína PSMA, o combinaciones de los mismos, obtener imágenes espectrales de las CTC por localización usando el instrumento automatizado para detectar las sondas de ácido nucleico y analizar la muestra analizando las imágenes espectrales y los reactivos de caracterización de CTC detectados. En un ejemplo, el procedimiento incluye enriquecer el contenido de CTC de la muestra usando un anticuerpo de captura específico para una proteína gen relacionado con ETS (ERG), una proteína antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o una proteína molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), en el que el enriquecimiento del contenido de CTC de la muestra se produce antes de depositar o disponer la muestra sobre el sustrato.

Además, en el presente documento se divulga que los reordenamientos del gen relacionado con ETS (ERG) y las deleciones del gen homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), junto con el centrómero 10 (CEN-10), se pueden detectar de manera simultánea o coincidente en las CTC, por ejemplo, usando sondas de ácido nucleico marcadas (tales como las marcadas con puntos cuánticos). Los procedimientos se pueden automatizar. Basándose en si se detectan reordenamientos de ERG y/o deleciones de PTEN, se puede caracterizar un cáncer de próstata.

Las sondas de ácido nucleico se marcan, por ejemplo, con uno o más puntos cuánticos. Por ejemplo, cada una de la(s) sonda(s) de ácido nucleico específica(s) para ERG, PTEN y CEN-10 se puede marcar con un punto cuántico diferente para permitir que las sondas se distingan entre sí. Después de permitir que las sondas de ácido nucleico se hibriden a ERG, PTEN y CEN-10, se detectan señales del uno o más puntos cuánticos en la una o más sondas de ácido nucleico, por ejemplo, usando imágenes espectrales. A continuación, se analizan las señales para determinar si en las CTC aisladas se reordenan uno o más ERG, si se delecionan uno o más genes PTEN y si se detecta CEN-10. Basándose en si se reordenan uno o más ERG, si se delecionan uno o más genes PTEN y si se detecta CEN-10, se caracteriza el cáncer de próstata.

La caracterización de un cáncer de próstata puede incluir predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento particular, tal como un inhibidor de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) (tal como olaparib o MK4827), abiraterona u otro inhibidor de la vía hormonal, o radioterapia, predecir la probabilidad de recidiva de la enfermedad después del tratamiento (tal como una prostatectomía), predecir la probabilidad de progresión del cáncer de próstata, predecir la probabilidad de metástasis del cáncer de próstata, predecir la probabilidad del tiempo de supervivencia o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la caracterización de un cáncer de próstata puede incluir predecir que el cáncer de próstata responderá a un inhibidor de PARP o abiraterona, pero no radioterapia, cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN, predecir que el cáncer de próstata tiene una probabilidad más alta de recidiva (por ejemplo, después de una prostatectomía) cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN, predecir que el cáncer de próstata tiene una probabilidad más alta de progresar cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN, predecir que es más probable que el cáncer de próstata metastatice cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN, predecir un tiempo de supervivencia de menos de 5 años cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN o combinaciones de los mismos.

Los anteriores y otros objetivos y características de la divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que prosigue con referencia a las figuras adjuntas.

#### Breve descripción de los dibujos

El documento de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujo(s) en color se proporcionarán por la Oficina bajo petición y pago de la tasa necesaria.

La **FIG. 1** es una imagen digital a 40 aumentos de células LNCaP aplicadas sobre un portaobjetos de vidrio usando una citocentrífugadora, fijadas y teñidas con anticuerpos específicos para pancitoqueratina (marcados con punto cuántico que emite a 605 nm) y CD45 (marcados con punto cuántico que emite a 705 nm). Las células también se tiñeron con DAPI para mostrar los núcleos. Las células LNCaP fueron positivas para CQ, pero negativas para CD45.

Las **FIGS. 2 y 3** son imágenes digitales de CTC aplicadas sobre un portaobjetos de vidrio usando una citocentrífugadora, fijadas y marcadas con sondas para ERG en extremo 5', ERG en extremo 3', PTEN y CEN 10. Las células también se tiñeron con DAPI para mostrar los núcleos.

La **FIG. 4** es un esquema que muestra un procedimiento que comienza con una muestra que muestra etapas ilustrativas para conseguir una evaluación de las CTC.

La **FIG. 5** es un esquema que muestra un procedimiento para el análisis automatizado de CTC.

#### Listado de secuencias

Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras estándar para las bases nucleotídicas y códigos de tres letras para los aminoácidos. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácidos nucleicos, pero se entiende que se incluye la cadena complementaria por cualquier referencia a la cadena presentada. Se entiende que todos los números de acceso a la base de datos de secuencias a los que se hace referencia en el presente documento se refieren a la versión de la secuencia identificada por ese número de acceso según estaba disponible en la fecha de presentación de esta solicitud. En la lista de secuencias adjunta:

Las **SEQ ID NOS: 1 y 2** son una secuencia codificante de ácido nucleico del gen relacionado con ETS (ERG) humano y la correspondiente secuencia de proteínas, respectivamente.

Las **SEQ ID NOS: 3 y 4** son una secuencia codificante de ácido nucleico del homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) en seres humanos y la correspondiente secuencia de proteínas, respectivamente.

La **SEQ ID NO: 5** es una sonda de ácido nucleico ejemplar específica para centrómero 10. Este clon es de la American Type Culture Collection (n.º de cat. de la ATCC 61397; pA10RP8). El tamaño de la inserción es de 1,36 kb. La secuencia mostrada en los nucleótidos 160 a 498 se repite en el clon.

## 20 Descripción detallada

### I. Términos

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece una invención divulgada. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicada por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Que comprende" significa "que incluye", de ahí que "que comprende A o B" signifique "que incluye A" o "que incluye B" o "que incluye A y B".

A continuación, se describen procedimientos y materiales adecuados para la práctica y/o las pruebas de modos de realización de los procedimientos divulgados. Dichos procedimientos y materiales solo son ilustrativos y no pretenden ser limitantes. También se pueden usar otros procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Por ejemplo, se describen procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica a la que pertenece una invención divulgada en diversas referencias generales y más específicas, que incluyen, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y suplementos hasta 2000); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4.<sup>a</sup> ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

A fin de facilitar la revisión de los diversos modos de realización divulgados, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

**Receptor androgénico (RA):** (OMIM 313700): Un tipo de receptor nuclear que se activa uniendo las hormonas androgénicas testosterona o bien dihidrotestosterona en el citoplasma y, a continuación, translocándose en el núcleo. La función principal del receptor androgénico es como un factor de transcripción de unión a ADN que regula la expresión génica. El gen RA se localiza en el cromosoma X. Las secuencias de RA están disponibles públicamente, por ejemplo, de GenBank® (por ejemplo, con los números de acceso NP\_000035, AAA51772.1 y P10275.2 (proteínas) y NM\_000044.3 y NM\_001011645.2 (ácidos nucleicos)).

Los anticuerpos específicos para proteínas RA están disponibles públicamente, por ejemplo, de Abcam (con los números de catálogo ab47569 y ab9474), Cell Signaling Technology (con los números de catálogo 7395 y 5153) y Santa Cruz Biotechnology, Inc. (con los números de catálogo sc-7305, sc-52309 y sc-52984).

**Anticuerpo:** Un ligando de polipéptido que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina de la cadena ligera o de la cadena pesada que específicamente reconoce y se une a un epítipo de un antígeno, tal como un marcador endotelial o fragmento del mismo. Los anticuerpos se componen de una cadena pesada y de una cadena ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada la región pesada variable (V<sub>H</sub>) y la región ligera variable (V<sub>L</sub>). En conjunto, la región V<sub>H</sub> y la región V<sub>L</sub> son responsables de la unión del antígeno reconocido por el

anticuerpo. En un ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a una proteína EpCAM, CQ o CD45, pero no a otras proteínas.

5 Esto incluye inmunoglobulinas inalteradas y las variantes y porciones de ellas bien conocidas en la técnica, tales como fragmentos Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, proteínas Fv monocatenarias ("scFv") y proteínas Fv estabilizadas con disulfuro ("dsFv"). Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina se unen mediante un conector, mientras que en las dsFv, las cadenas se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. El término también incluye formas genomanipuladas, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos

10 biospecíficos). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3.<sup>a</sup> Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

15 Típicamente, una inmunoglobulina natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

20 Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se conocen como "dominios"). En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y de la ligera se unen específicamente al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también llamadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR". Se ha definido la extensión de la región estructural y de las CDR (véase, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat ahora se encuentra actualizada en línea. Las secuencias de las regiones estructurales de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas en una especie. La región estructural de un anticuerpo, es decir,

25 las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

30 Las CDR son fundamentalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N, y también se identifican típicamente mediante la cadena en la que se localiza la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V<sub>H</sub> se localiza en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 de V<sub>L</sub> es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Por

35 ejemplo, un anticuerpo que se une a CR tendrá una región V<sub>H</sub> específica y la secuencia de la región V<sub>L</sub>, y, por tanto, secuencias de CDR específicas. Los anticuerpos con diferentes especificidades (es decir, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen diferentes CDR. Aunque son las CDR las que varían de anticuerpo a anticuerpo, solo se implica directamente un número limitado de posiciones de aminoácidos en las CDR en la unión a antígeno. Estas posiciones en las CDR se llaman residuos determinantes de la especificidad (SDR).

40 Las referencias a "V<sub>H</sub>" o "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "V<sub>L</sub>" o "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

45 Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido mediante un único clon de linfocitos B o mediante una célula en la que se han transfectado los genes de la cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, preparando células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias de bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

50 Un "anticuerpo policlonal" es un anticuerpo que deriva de diferentes líneas de linfocitos B. Los anticuerpos policlonales son una mezcla de moléculas de inmunoglobulina secretadas frente a un antígeno específico, reconociendo cada una un epítipo diferente. Estos anticuerpos se producen mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante inyección de un antígeno en un mamífero adecuado (tal como un

55 ratón, conejo o cabra) que induzca a los linfocitos B a producir inmunoglobulinas IgG específicas para el antígeno que, a continuación, se purifican del suero del mamífero.

Un "anticuerpo quimérico" tiene residuos estructurales de una especie, tal como el ser humano, y CDR (que, en general, confieren unión a antígeno) de otra especie, tal como un anticuerpo murino que se une específicamente a

60 un marcador endotelial.

Una inmunoglobulina "humanizada" es una inmunoglobulina que incluye una región estructural humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, una de ratón, rata o sintética). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la región estructural se denomina "aceptora". En un ejemplo, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una

65 inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes no necesitan estar presentes, pero si lo están, son

sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, por ejemplo, al menos aproximadamente un 85-90 %, tal como aproximadamente un 95 % idénticas o más. De ahí que todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, sean sustancialmente idénticas a las correspondientes partes de las secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales. Se pueden construir inmunoglobulinas humanizadas por medio de genomanipulación (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.585.089).

**Afinidad de unión:** La afinidad de una molécula por otra, tal como un anticuerpo por un antígeno (por ejemplo, una proteína EpCAM, CQ, ERG, PTEN, PSMA, RA o CD45). En un ejemplo, la afinidad se calcula mediante una modificación del procedimiento de Scatchard descrito por Frankel *et al.*, *Mol. Immunol.*, 16:101-106, 1979. En otro ejemplo, la afinidad de unión se mide mediante una velocidad de disociación antígeno/anticuerpo. En otro ejemplo más, una alta afinidad de unión se mide mediante un radioinmunoanálisis de competición. En varios ejemplos, una alta afinidad de unión es al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M. En otros ejemplos, una alta afinidad de unión es al menos aproximadamente  $1,5 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $2,0 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $3,0 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $3,5 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $4,0 \times 10^{-8}$ , al menos aproximadamente  $4,5 \times 10^{-8}$  o al menos aproximadamente  $5,0 \times 10^{-8}$  M.

**Cáncer:** Neoplasia maligna, por ejemplo, una que ha experimentado una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, velocidad de crecimiento incrementada, invasión del tejido circundante y que puede metastatizar.

**CD45:** (OMIM 151460): Un miembro de la familia de la proteína tirosina fosfatasa (PTP) que se expresa específicamente en células hematopoyéticas. El gen CD45 (también conocido como proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor C (PTPRC)) humano se localiza en el cromosoma 1 (1q31-q32). Las secuencias de CD45 están disponibles públicamente, por ejemplo, de GenBank® (por ejemplo, con los números de acceso NP\_002829.2 y NP\_035340 (proteínas) y NM\_002838.3 y NM\_011210 (ácidos nucleicos)).

Los anticuerpos específicos para proteínas CD45 están disponibles públicamente, por ejemplo, de Abcam (con el número de catálogo ab10558), Millipore (con los números de catálogo FCMB126F, 05-1410 y FCMB118P) y Santa Cruz Biotechnology, Inc. (con los números de catálogo sc-25590, sc-70686, sc-66201 y sc-20056).

**Centrómero 10 (CEN-10):** La región del cromosoma 10 (por ejemplo, 10p11.1-q11.1) en la que se localiza el centrómero. Su presencia se puede detectar usando sondas de ácido nucleico específicas para centrómero 10.

**Células tumorales circulantes (CTC):** Células tumorales producidas durante la carcinogénesis encontrada en la sangre periférica o médula ósea (en la médula ósea se denominan células tumorales diseminadas, CTD), que pueden dar como resultado una enfermedad metastásica. Las CTC se encuentran en frecuencias de aproximadamente de 1 a 10 CTC por ml de sangre entera en enfermos con una enfermedad metastásica. Las células CTC son positivas para EpCAM, negativas para CD45 y positivas para CQ (tal como positivas cuando se usa un anticuerpo panqueratina).

**Complementaria:** Se dice que una molécula de ácido nucleico es “complementaria” con otra molécula de ácido nucleico si las dos moléculas comparten un número suficiente de nucleótidos complementarios para formar una doble hélice o triple hélice estable cuando las cadenas se unen (se hibridan) entre sí, por ejemplo, formando pares de bases de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos. Se produce la unión estable cuando una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda o cebador de ácido nucleico) permanece unida de manera detectable a una secuencia de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos diana para ERG, PTEN o CEN-10) en las condiciones requeridas.

La complementariedad es el grado en que las bases en una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda o cebador de ácido nucleico) se aparean en cuanto a sus bases con las bases en una segunda molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos diana). La complementariedad se describe convenientemente mediante porcentajes, es decir, la proporción de nucleótidos que forman pares de bases entre dos moléculas o en una región o dominio específico de dos moléculas. Por ejemplo, si 10 nucleótidos de una región de nucleótidos contiguos de una sonda o cebador de ácido nucleico forman pares de bases con una molécula de ácido nucleico diana, se dice que esa región de la sonda o cebador tiene un 66,67 % de complementariedad con respecto a la molécula de ácido nucleico diana.

En la presente divulgación, “suficiente complementariedad” significa que existe un número suficiente de pares de bases entre una molécula de ácido nucleico o región del mismo (tal como una región de una sonda o cebador) y una secuencia de ácidos nucleicos diana (por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos de ERG o PTEN) para lograr una unión detectable. Se proporciona un tratamiento minucioso de las consideraciones cualitativas y cuantitativas implicadas en el establecimiento de las condiciones de unión por Beltz *et al.* *Methods Enzymol.* 100:266-285, 1983 y por Sambrook *et al.* (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

**Contacto:** Disposición en asociación física directa, que incluye tanto en forma sólida como líquida, en condiciones

que permitan interactuar a los agentes. Por ejemplo, se puede incubar una CTC (o población de CTC aisladas en un portaobjetos) con un agente de unión específica (por ejemplo, una sonda de ácido nucleico o anticuerpos), tal como una o más sondas para *ERG*, sondas para *PTEN* y sondas para *CEN-10*, permitiendo, de este modo, la detección de moléculas de ácido nucleico en las CTC que tengan suficiente complementariedad con respecto a la sonda.

**Control:** Una muestra o patrón usado para su comparación con una muestra de prueba, tal como una muestra biológica, por ejemplo, una muestra biológica obtenida de un enfermo (o una pluralidad de enfermos) o un cultivo de células. En algunos modos de realización, el control es una muestra obtenida de un paciente (o una pluralidad de pacientes) sano (también denominado en el presente documento control "normal"), tal como una muestra normal (por ejemplo, una que no tiene cáncer de próstata, tal como una muestra de próstata normal). En algunos ejemplos, el control es una CTC o una pluralidad de CTC obtenidas de un enfermo (o una pluralidad de enfermos) con *CPRC* o *CPRCm* que se sabe que tienen reordenamientos de *ERG* y/o deleciones de *PTEN*. En otros ejemplos, el control es una CTC o una pluralidad de CTC obtenidas de un enfermo (o una pluralidad de enfermos) con *CPRC* o *CPRCm* que se sabe que no tienen reordenamientos de *ERG* y/o deleciones de *PTEN*. En algunos ejemplos, el control es un valor de control o patrón histórico (es decir, una muestra o grupo de muestras de control sometido a prueba previamente que representa los valores de referencia o normales).

**Citoqueratinas (CQ):** Proteínas de filamentos intermedios que contienen queratina encontradas en el citoesqueleto intracitoplásmico del tejido epitelial. Hay aproximadamente 20 genes CQ epiteliales diferentes. Los subconjuntos de citoqueratinas expresadas por una célula epitelial particular dependen principalmente del tipo de epitelio, el momento en el transcurso de la diferenciación terminal y la fase de desarrollo. Los ejemplos de CQ incluyen las queratinas 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14 y 18. Los anticuerpos específicos para las proteínas CQ están disponibles públicamente. Por ejemplo, un anticuerpo panqueratina puede detectar múltiples CQ, tales como las CQ 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18 o las citoqueratinas de 56,5 kD, 50 kD, 50 kD, 48 kD y 40k D de la subfamilia ácida y las citoqueratinas de 65-67 kD, 64 kD, 59 kD, 58 kD, 56 kD y 52 kD de la subfamilia básica. Los anticuerpos para CQ ejemplares están disponibles de Ventana (con los números de catálogo 760-2595 y 760-2135), Cell Signaling Technology (con los números de catálogo 4528 y 4545), Abcam (con el número de catálogo ab8068) y Thermo Scientific (con el número de catálogo MS-744-A).

**Detectar:** Determinar si un agente (por ejemplo, una molécula de proteína o ácido nucleico) está presente o ausente. Por ejemplo, el uso de una sonda específica para un gen particular (por ejemplo, *ERG* o *PTEN*) permite la detección de la molécula de ácido nucleico deseada en una CTC, tal como un reordenamiento de *ERG* o deleción de *PTEN*. Por ejemplo, el uso de un anticuerpo específico para una proteína particular (por ejemplo, CQ o EpCAM) permite la detección de la proteína deseada en una CTC, tal como CQ o EpCAM. En algunos ejemplos, esto puede incluir además una cuantificación. En ejemplos particulares, se detecta una señal de emisión de un marcador (tal como un punto cuántico). La detección puede ser en masa, de modo que se pueda observar de manera simultánea un número macroscópico de moléculas. La detección también puede incluir la identificación de señales de moléculas únicas usando microscopía y técnicas tales como reflexión interna total para reducir el ruido de fondo.

**Diagnóstico:** El procedimiento de identificación de una afección médica o enfermedad, por ejemplo, a partir de los resultados de uno o más procedimientos de diagnóstico. En un ejemplo, los procedimientos divulgados permiten el diagnóstico de una forma de un cáncer de próstata de mayor malignidad si se detecta un reordenamiento de *ERG* y/o una deleción de *PTEN* en células CTC del enfermo con cáncer de próstata.

**Molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM)** (OMIM 185535): Un antígeno de diferenciación panepitelial expresado en la mayoría de las células cancerosas. El gen EpCAM humano (también conocido como transductor de señal de calcio asociado a tumor 1 (TACSTD1) y CD326) se localiza en el cromosoma 2 (2p21). Las secuencias de EpCAM están disponibles públicamente, por ejemplo, de GenBank® (por ejemplo, con los números de acceso NP\_002345.2, AAH14785.1 y NP\_032558.2 (proteínas) y NM\_002354 y NM\_008532.2 (ácidos nucleicos)) y de UniProt (por ejemplo, con los números de acceso P16422 (proteína)).

Los anticuerpos específicos para proteínas EpCAM están disponibles públicamente, por ejemplo, de Abcam (con el número de catálogo ab20160), Millipore (con los números de catálogo CP63-100UG, OP187-100UG, MAB4444 y CBL251) y de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (con los números de catálogo sc-71059, sc-73491, sc-23788 y sc-73942).

**Gen:** Una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN genómico, ADNc o ARN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNm). El polipéptido se puede codificar mediante una secuencia codificante de longitud completa o mediante cualquier porción de la secuencia codificante siempre que se retenga(n) la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, inmunogenia, etc.) de la longitud completa o fragmento. El término también engloba la región codificante de un gen estructural y las secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en tanto los extremos 5' como 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb o más en cada extremo de tal manera que el gen corresponde al ARNm de longitud completa. Las secuencias localizadas en 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas en 5'. Las secuencias localizadas en 3' o en dirección 3' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan

secuencias no traducidas en 3'. El gen como está presente en (o aislado de) un genoma contiene las regiones codificantes ("exones") interrumpidas con secuencias no codificantes denominadas "intrones". Los intrones están ausentes en el transcrito de ARN (por ejemplo, ARNm) procesado. En el presente documento se proporcionan procedimientos que permiten la detección de reordenamientos de *ERG* y deleciones de genes *PTEN*.

**Hibridación:** Los oligonucleótidos y sus análogos se hibridan mediante enlaces de hidrógeno, lo que incluye enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos, entre bases complementarias. En general, las moléculas de ácido nucleico se componen de bases nitrogenadas que son pirimidinas (citocina (C), uracilo (U) y timina (T)) o bien purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenadas forman enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y la unión de la pirimidina a la purina se denomina "apareamiento de bases". Más específicamente, A se unirá con enlaces de hidrógeno a T o U, y G se unirá a C. "Complementario" se refiere al apareamiento de bases que se produce entre dos secuencias de ácidos nucleicos distintas. Por ejemplo, una sonda de oligonucleótidos puede ser complementaria a una secuencia del gen *ERG* o *PTEN* (o a una porción de la misma) o a una secuencia de CEN-10 (o a una porción de la misma).

"Específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad, de tal manera que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de ácido nucleico. La sonda de oligonucleótidos no necesita ser un 100 % complementaria a su secuencia diana para ser específicamente hibridable.

Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del procedimiento de hibridación de elección y de la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (en especial, la concentración de Na<sup>+</sup>) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación, aunque los tiempos desaprovechados también influyen en la rigurosidad. La hibridación de una secuencia de oligonucleótidos se puede modificar incorporando bases no naturales en la secuencia, tal como incorporando ácidos nucleicos bloqueados o ácidos péptidonucleicos.

**Inmunohistoquímica (IHQ):** Un procedimiento de determinación de la presencia, cantidad o distribución de un antígeno (tal como una proteína) en una muestra (por ejemplo, una CTC) detectando la interacción del antígeno con un agente de unión específica, tal como un anticuerpo. Se incubaba una muestra que se sospecha que contiene CTC y, por tanto, un antígeno EpCAM, con un anticuerpo en condiciones que permitan la unión anticuerpo-antígeno. La unión anticuerpo-antígeno se puede detectar por medio de un marcador detectable conjugado al anticuerpo (detección directa) o por medio de un marcador detectable conjugado a un anticuerpo secundario, que se produce frente al anticuerpo primario (por ejemplo, detección indirecta). Los marcadores detectables ejemplares que se pueden usar para IHQ incluyen, pero no se limitan a, isótopos radioactivos, fluorocromos (tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína y rodamina) y enzimas (tales como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina).

**Aislado:** Un componente biológico "aislado" (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o proteína) o una célula (tal como una CTC) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos u otras células en las que el componente se produce de manera natural. Por ejemplo, un componente biológico se puede separar o purificar sustancialmente de otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y/u orgánulos. Para las CTC aisladas, dichas CTC se separan o purifican sustancialmente de otras células en la sangre o médula ósea, tales como linfocitos y los E. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también engloba ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula huésped, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente, tales como sondas para la detección de reordenamientos de *ERG*, deleciones de *PTEN* y CEN-10.

**Marcador:** Un agente que puede detectar, por ejemplo, mediante espectrofotometría, obtención de imágenes espectrales, citometría de flujo o microscopia. Por ejemplo, se pueden acoplar uno o más marcadores a un anticuerpo, permitiendo, de este modo, la detección de una proteína diana (tal como EpCAM, CD45 o CQ). Además, se puede acoplar uno o más marcadores a una molécula de ácido nucleico, permitiendo, de este modo, la detección de una molécula de ácido nucleico diana (tal como *ERG*, *PTEN* o CEN-10). Los marcadores ejemplares incluyen isótopos radioactivos, fluoróforos, puntos cuánticos, cromóforos, ligandos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y combinaciones de los mismos.

**Células o tejido normales:** Células y tejido no malignos, no tumorales.

**Sonda:** Un ácido nucleico aislado que se puede hibridar a un ácido nucleico diana (tal como una secuencia de ácidos nucleicos de *ERG*, *PTEN* o CEN-10), que puede incluir un marcador detectable o molécula indicadora. Los marcadores ejemplares incluyen puntos cuánticos, isótopos radioactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, haptenos y enzimas. En un ejemplo particular, una sonda incluye al menos un punto cuántico. Los procedimientos para el marcado y guía en la elección de los marcadores apropiados para diversos propósitos se analizan, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*,

Greene Publishing Associates y Wiley-Intersciences (1987).

Las sondas tienen, en general, al menos 50 nucleótidos de longitud, tal como al menos 51, al menos 52, al menos 53, al menos 54, al menos 55, al menos 56, al menos 57, al menos 58, al menos 59, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 120, al menos 140, al menos 160, al menos 180, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500 o más nucleótidos contiguos complementarios a la molécula de ácido nucleico diana (tal como ERG, PTEN o CEN-10), tal como 20-500 nucleótidos, 100-500 nucleótidos, 100-250 nucleótidos o 20-250 nucleótidos. En algunos ejemplos, una sonda comprende una pluralidad de diferentes secuencias de sonda que se pueden unir cada una a la molécula de ácido nucleico diana.

**Pronóstico:** El procedimiento de determinación del desenlace clínico probable de que un sujeto tenga una enfermedad (por ejemplo, cáncer de próstata) en ausencia de tratamiento adicional. En un ejemplo, los procedimientos divulgados permiten el pronóstico de una forma de un cáncer de próstata de mayor malignidad si se detectan reordenamientos de ERG y/o deleciones de PTEN en las CTC del enfermo. Por ejemplo, se puede relacionar el pronóstico con la predicción de acontecimientos futuros, tales como la esperanza de vida (por ejemplo, probabilidad de supervivencia en 1 año, 3 años o 5 años), predicción de la probable de recidiva del cáncer de próstata después de la prostatectomía y/o la predicción de la probable metástasis de un cáncer de próstata (por ejemplo, después de una prostatectomía).

**Antígeno prostático específico de membrana (PSMA):** (OMIM 600934): Una glucoproteína de membrana integral de tipo 2 encontrada en la próstata y otros tejidos. También conocida como folato hidrolasa 1. El PSMA tiene dos actividades enzimáticas, una como folato hidrolasa de membrana integral específico de próstata y la otra como carboxipeptidasa. El gen PSMA humano se localiza en el cromosoma 11 (11p11.12). Las secuencias de PSMA están disponibles públicamente, por ejemplo, de GenBank® (por ejemplo, con los números de acceso AAA60209.1, AAM34479.1 y AAC83972.1 (proteínas) y NM\_004476.1 y NG\_029170.1 (ácidos nucleicos)).

Los anticuerpos específicos para proteínas PSMA están disponibles públicamente, por ejemplo, de Abcam (con el número de catálogo ab403, ab53774, ab53690), Leica Microsystems (número de clon PSMA-L-A) y Santa Cruz Biotechnology, Inc. (con los números de catálogo sc-10269, sc-69665, sc-130546 y sc-59674).

**Determinación cuantitativa o cuantificación:** Determinar o medir una cantidad (tal como una cantidad absoluta o relativa) de una molécula, tal como la cantidad de un gen ERG o PTEN, tal como un número de reordenamientos de ERG, deleciones de PTEN o CEN-10 presentes en CTC aisladas.

**Puntos cuánticos:** Se pueden acoplar nanopartículas cristalinas semiconductoras inorgánicas que emiten fluorescencia de manera estable y poseen un área de superficie uniforme que se puede acoplar a una sonda de ácido nucleico o anticuerpo, permitiendo, de este modo, la detección de la diana de la sonda de ácido nucleico o anticuerpo. Aunque, en general, son esféricos, los puntos cuánticos acoplados a las sondas de ácidos nucleicos o anticuerpos pueden tener cualquier forma (tal como esférica, tubular, piramidal, cónica o cúbica), pero las nanopartículas particularmente adecuadas son esféricas.

En general, se pueden preparar puntos cuánticos con monodispersidad relativa (por ejemplo, variando el diámetro del núcleo aproximadamente menos de un 10 % entre puntos cuánticos en la preparación), como se ha descrito previamente (Bawendi *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 115:8706, 1993). Los puntos cuánticos conocidos en la técnica tienen, por ejemplo, un núcleo seleccionado del grupo que consiste en CdSe, CdS y CdTe (denominados colectivamente "CdX").

**Señal:** Un cambio o impulso detectable en una propiedad física que proporciona información. En el contexto de los procedimientos divulgados, los ejemplos incluyen señales electromagnéticas, tales como luz, por ejemplo, luz de una cantidad o longitud de onda particular. En determinados ejemplos, la señal es la desaparición de un acontecimiento físico, tal como la extinción de la luz. Una **señal característica** es la señal particular esperada cuando una sonda de ácido nucleico particular se hibrida específicamente a su secuencia de ácidos nucleicos complementaria en las CTC. Por ejemplo, una señal característica puede ser la señal resultante emitida a partir de un punto cuántico presente en la sonda de ácido nucleico, que se puede predecir mediante el punto cuántico particular acoplado a o asociado a la sonda de ácido nucleico.

**Unión específica (o derivaciones de dicha frase, tales como se une específicamente, específico para, etc.):** La interacción particular entre un ligando (tal como una sonda específica de gen o anticuerpo específico de proteína) y otro ligando (tal como una diana de una sonda específica de gen o anticuerpo específico de proteína). Dicha interacción se media mediante uno o, típicamente, más enlaces no covalentes entre los ligandos (o, a menudo, entre una región o porción específica de cada ligando). Por tanto, un oligonucleótido se une de manera estable a un ácido nucleico diana (por ejemplo, PTEN, ERG, CEN-10) si una cantidad suficiente del oligonucleótido forma pares de bases o se hibrida a su ácido nucleico diana.

A diferencia de los sitios de unión no específica, los sitios de unión específica son saturables. En consecuencia, una

manera ejemplar para caracterizar la unión específica es mediante una curva de unión específica. Una curva de unión específica muestra, por ejemplo, la cantidad de un ligando (el primer ligando) unido a una cantidad fijada del otro ligando como una función de la concentración del primer ligando. A medida que la concentración del primer ligando se incrementa en estas condiciones, la cantidad del primer ligando unido se saturará. En contraste con los sitios de unión no específica, se pueden eliminar (o desplazar) de manera competitiva los ligandos específicos implicados en una asociación directa entre sí (por ejemplo, una interacción sonda-ARNm o anticuerpo-proteína) de dicha asociación mediante cantidades en exceso de cualquier ligando específico. Dichos ensayos de competición (o ensayos de desplazamiento) se conocen bien en la técnica.

**Sujeto:** Incluye cualquier organismo vertebrado pluricelular, tal como mamíferos humanos y no humanos (por ejemplo, sujetos veterinarios, tales como gatos o perros). En algunos ejemplos, un sujeto o enfermo es alguien que tiene cáncer o se sospecha que tiene cáncer, tal como cáncer de próstata, tal como cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) o el cáncer de próstata metastásico, tal como cáncer de próstata resistente a la castración metastásico (CPRCm).

**Sustrato:** Un material o superficie a la que se pueden acoplar otras moléculas (tales como CTC aisladas). En ejemplos particulares, el sustrato se hace de material biocompatible que sea transparente a la luz, incluyendo vidrio y cuarzo. Por ejemplo, el sustrato puede ser un portaobjetos de vidrio (tal como uno que sea de 3 cm de largo por 1 cm de ancho por 0,25 cm de grosor). Los portaobjetos de vidrio están disponibles comercialmente y se venden pretratados, lo que da como resultado portaobjetos cargados de manera positiva. En un ejemplo, las superficies de vidrio cargadas de manera positiva se preparan mediante reacción química de los portaobjetos con 3-aminopropiltrietoxisilano (APES).

**En condiciones suficientes para:** Cualquier entorno que permita la actividad deseada, por ejemplo, que permita que un anticuerpo se una a un antígeno, tal como EpCAM, CD45, ERG, RA, PSMA o CQ, o que permita que una sonda de ácido nucleico se una a su secuencia diana complementaria, tal como como ERG, PTEN o CEN-10, y la interacción que se va a detectar.

Un ejemplo incluye poner en contacto una sonda de ácido nucleico con CTC en condiciones suficientes para permitir la hibridación de la sonda de ácido nucleico que es una molécula de ácido nucleico complementaria en las CTC (si están presentes), por ejemplo, para determinar si la molécula de ácido nucleico complementaria está presente en las CTC, tal como reordenamientos de ERG o deleciones de PTEN.

**Señal de emisión única:** Una señal de emisión que transmite información sobre un acontecimiento específico, tal como el espectro de emisión para un marcador determinado (tal como un punto cuántico), que se puede distinguir de otras señales (tales como señales del espectro de emisión de otros marcadores). Los ejemplos en asociación con los procedimientos divulgados incluyen asociar uno o más marcadores individuales (tales como un punto cuántico) con cada tipo diferente de sonda de ácido nucleico (tal como una sonda de ácido nucleico específica para PTEN frente a una sonda de ácido nucleico específica para ERG), de tal manera que la hibridación de la sonda de ácido nucleico con su secuencia complementaria en las CTC da como resultado una señal única o una combinación de señales (tales como puntos cuánticos que emiten a diferentes longitudes de onda únicas). Cada marcador tiene una señal de emisión única correspondiente a una sonda específica de ácido nucleico particular. Esta señal se puede usar para determinar qué sonda de ácido nucleico se ha hibridado con éxito a su secuencia complementaria en las CTC.

## II. Análisis automatizado de CTC

Un aspecto de los análisis de sangre es que se pueden realizar con seguridad en muchos puntos durante el tratamiento o diagnóstico del cáncer, mientras que las biopsias de tumores sólidos son, a menudo, invasivas y solo se pueden realizar de manera intermitente. La capacidad de realizar un seguimiento de la progresión de la enfermedad a lo largo del tiempo permite modificaciones apropiadas en el tratamiento, por ejemplo, para mejorar la calidad de vida de un enfermo. Con este fin, los procedimientos divulgados se desarrollaron para mejorar las vidas de las personas afectadas de cáncer. La automatización y las tecnologías implementadas a través de los procedimientos divulgados proporcionan la sensibilidad y reproducibilidad requeridas para detectar las CTC en enfermos con enfermedad metastásica. En particular, se han desarrollado procedimientos que permiten la detección simultánea o coincidente de múltiples marcadores genéticos y de proteínas en una única muestra. Por ejemplo, en el presente documento se demuestra la detección coincidente de *ERG*, *PTEN* y CEN-10 en la misma CTC.

Se puede automatizar una o más etapas del procedimiento. En ejemplos ilustrativos, los procedimientos incluyen etapas de tratamiento químico automatizadas para disminuir la variabilidad entre los ensayos, para lograr una consistencia en la detección, o ambas. Por ejemplo, se puede automatizar una o más de las etapas, tal como las etapas de hibridación y detección. Las hibridaciones manuales pueden tener una velocidad de separación variable de CTC del portaobjetos, mientras que la automatización es más fiable. La automatización proporciona resultados y tiempos de obtención de resultados más rápidos y reduce la variabilidad de sitio a sitio. En un ejemplo, la automatización permite que se sometán a prueba de manera simultánea o coincidente al menos 30 muestras (tal como al menos 50, al menos 100 o incluso al menos 500 muestras, tal como 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 250, 500 o

1000 muestras).

En el presente documento se proporcionan procedimientos de análisis de una muestra, tal como una que se sabe o se sospecha que contiene CTC, usando un instrumento automatizado. Dichos procedimientos pueden incluir depositar o aplicar la muestra sobre un sustrato configurado para su uso con el instrumento automatizado, disponer el sustrato en el instrumento automatizado, recuperar las dianas en la muestra usando el instrumento automatizado, poner en contacto la muestra con reactivos de identificación de CTC usando el instrumento automatizado, poner en contacto la muestra con reactivos de caracterización de CTC usando el instrumento automatizado, obtener imágenes de la muestra, localizar las CTC localizando los reactivos de identificación de CTC, obtener imágenes espectrales de las CTC por localización, analizar la muestra analizando las imágenes espectrales o combinaciones de los mismos.

En un ejemplo, el procedimiento incluye enriquecer el contenido de CTC de la muestra usando un anticuerpo de captura específico para una proteína ERG, una proteína antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o una proteína molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), en el que el enriquecimiento del contenido de CTC de la muestra se produce antes de depositar o disponer la muestra sobre el sustrato. En algunos ejemplos, la muestra se usa directamente, mientras que en otros ejemplos la muestra se manipula (por ejemplo, se concentra, se diluye, se trata para enriquecer o separar las células CTC, se trata para eliminar las células no deseadas (tales como L o E, por ejemplo, lisando E) o combinaciones de los mismos). En algunos ejemplos, una muestra de sangre se fracciona y la fracción de suero se usa para un análisis posterior.

En un ejemplo, los reactivos de identificación de CTC y los reactivos de caracterización de CTC se seleccionan de modo que el procedimiento proporcione un valor médico, por ejemplo, que el procedimiento proporcione información que sea médicamente aplicable.

En un modo de realización, los reactivos de identificación de CTC incluyen reactivos inmunohistoquímicos (IHQ) dirigidos a (o específicos para) marcadores de proteínas de CTC, tales como uno o más de proteína CD45, proteína citoqueratina (CQ), proteína ERG, receptor androgénico (RA) o proteína PSMA. Dichos reactivos de identificación de CTC permiten la determinación de que una célula particular sea una célula CTC. En un ejemplo, los reactivos de identificación de CTC pueden incluir anticuerpos u otros agentes de unión específica para marcadores de proteínas de CTC, tales como uno o más de CD45, CQ, ERG, RA o PSMA. Por ejemplo, los reactivos de identificación de CTC incluyen anticuerpos específicos para 1, 2, 3, 4 o todos de CD45, CQ, ERG, RA, PSMA o combinaciones de los mismos. Dichos reactivos de identificación pueden incluir un marcador detectable, tal como un punto cuántico. En algunos ejemplos, por ejemplo, si se usan varios anticuerpos en la misma muestra, cada anticuerpo específico para una proteína particular incluye un marcador detectable diferente. Por ejemplo, la FIG. 1 muestra una línea de células de cáncer de próstata (LNCaP) que presenta tinción CQ+, mientras que es negativa para CD45, como se detecta mediante reactivos de identificación de CTC (anticuerpos para CQ y CD45).

En un ejemplo, los reactivos de caracterización de CTC incluyen sondas de ácido nucleico dirigidas a marcadores genómicos, tales como 1, 2, 3, 4 o 5 marcadores genómicos diferentes, tales como marcadores genómicos para el diagnóstico o pronóstico del cáncer. Dichos reactivos de caracterización de CTC permiten la caracterización de la célula CTC, por ejemplo, para permitir el diagnóstico o pronóstico de un enfermo con cáncer. Dichas sondas pueden incluir un marcador detectable, tal como un punto cuántico. En algunos ejemplos, por ejemplo, si se usan varias sondas en la misma muestra, cada sonda específica para una diana particular incluye un marcador detectable diferente. En un modo de realización, los marcadores genómicos se analizan para determinar la expresión génica y/o reordenamientos/deleciones genéticas. Por ejemplo, los marcadores genómicos se pueden detectar usando una sonda de expresión génica y una combinación de sondas para reordenamientos/deleciones. En un ejemplo particular, los reactivos de caracterización de CTC incluyen sondas de ácido nucleico específicas para (por ejemplo, se pueden hibridar selectivamente al) gen relacionado con ETS (ERG), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y centrómero 10 (CEN-10). En algunos ejemplos, los reactivos de caracterización de CTC incluyen sondas de ácido nucleico específicas para diferentes regiones del mismo gen (tal como una sonda específica para el extremo 5' y una segunda sonda específica para el extremo 3' de un gen).

En un modo de realización particular, los reactivos de caracterización de CTC incluyen sondas de ácido nucleico dirigidas a marcadores genómicos (tales como al menos 2, al menos 3 o al menos 4 marcadores genómicos) y los reactivos de identificación de CTC incluyen reactivos IHQ dirigidos a marcadores de proteínas de CTC. En un modo de realización, los marcadores genómicos incluyen ERG, PTEN y CEN-10 y los marcadores de proteínas de CTC incluyen uno o más de proteína CD45, proteína CQ, proteína ERG, RA y proteína PSMA. En algunos ejemplos, las CTC también se tiñen con DAPI. Como se muestra en las FIGS. 2 y 3, se puede lograr un ensayo de FISH múltiple con puntos cuánticos usando sondas para ERG en extremo 5', para ERG en extremo 3', para PTEN y para CEN-10 (marcadas con puntos cuánticos que emiten a 655 nm, 565 nm, 605 nm y 585 nm, respectivamente) como se describe en el presente documento (ejemplo 1).

El procedimiento de análisis de una muestra que se sabe o se sospecha que contiene CTC circulantes puede incluir una etapa de obtención de imágenes. En un ejemplo, obtener imágenes incluye inmunofluorescencia para obtener imágenes de los reactivos de identificación de CTC (por ejemplo, detectando el marcador asociado con cada

anticuerpo usado). En otro ejemplo, obtener imágenes incluye usar filtros de paso de banda multispectrales. La inmunofluorescencia puede proceder de anticuerpos marcados directa o indirectamente con fluoróforos o la inmunofluorescencia puede resultar de la excitación de los fluoróforos con luz visible filtrada espectralmente. En un ejemplo, la luz visible filtrada espectralmente incluye un primer intervalo seleccionado para excitar un primer fluoróforo y un segundo intervalo seleccionado para excitar un segundo fluoróforo, en la que el primer intervalo seleccionado no excita significativamente el segundo fluoróforo y el segundo intervalo seleccionado no excita significativamente el primer fluoróforo. Obtener imágenes de la muestra puede incluir adquirir una primera imagen de inmunofluorescencia de la muestra excitada por el primer intervalo seleccionado y adquirir una segunda imagen de inmunofluorescencia de la muestra excitada por el segundo intervalo seleccionado (y adquirir imágenes de inmunofluorescencia adicionales para cada marcador si se usaron más de dos reactivos de identificación de CTC) y localizar o identificar las CTC localizando o visualizando los reactivos de identificación de CTC, lo que puede incluir la comparación o superposición de la primera imagen de inmunofluorescencia y la segunda imagen de inmunofluorescencia (e imágenes adicionales si se obtienen de esta manera). Por ejemplo, obtener imágenes de la primera imagen de inmunofluorescencia puede identificar células CQ+ y la segunda imagen de inmunofluorescencia puede identificar células CD45+, en las que la comparación o superposición incluye identificar células que sean CQ+ y CD45-. En otro ejemplo, localizar las CTC localizando los reactivos de identificación de CTC incluye analizar algorítmicamente la primera imagen de inmunofluorescencia y la segunda imagen de inmunofluorescencia (e imágenes de inmunofluorescencia adicionales si se obtienen) usando un ordenador. Analizar algorítmicamente puede incluir examinar digitalmente las imágenes para medir el tamaño de la célula, la localización del compartimento de la célula de los marcadores y/o la intensidad de la expresión del marcador.

En un ejemplo, la obtención de imágenes espectrales de las CTC incluye la luminiscencia de imágenes espectrales de los reactivos de caracterización de CTC, procediendo la luminiscencia de restos de unión específica marcados (tales como sondas de ácido nucleico), tales como sondas de ácido nucleico marcadas con puntos cuánticos. Los restos de unión específica se pueden marcar directamente (por ejemplo, con los puntos cuánticos) o se pueden marcar indirectamente (por ejemplo, con los puntos cuánticos) (procediendo la luminiscencia de los puntos cuánticos que marcan los anticuerpos secundarios antihapteno, siendo los anticuerpos secundarios antihapteno específicos para haptenos que marcan los restos de unión específica). Obtener imágenes espectrales de las CTC pueden incluir excitar el marcador (por ejemplo, puntos cuánticos) con radiación, tal como radiación UV o UV cercano. En un ejemplo, la radiación tiene un perfil de emisión espectral con un máximo entre 300 nm y 400 nm. Las imágenes espectrales de las CTC pueden incluir de forma alternativa imágenes multispectrales o imágenes hiperespectrales. La obtención de imágenes espectrales se puede guiar mediante la etapa de localizar las CTC en las regiones de interés con exclusión de las regiones que carecen de interés. Las regiones ejemplares de interés incluyen las CTC. En otro ejemplo, la luz visible filtrada espectralmente no da como resultado una luminiscencia de puntos cuánticos significativa.

En un ejemplo, la obtención de imágenes de la muestra incluye inmunofluorescencia para obtener imágenes multispectrales de los reactivos de identificación de CTC y la obtención de imágenes espectrales de las CTC incluye obtener imágenes hiperespectrales de los reactivos de caracterización de CTC. En un ejemplo, la obtención de imágenes multispectrales e hiperespectrales diferencia al menos cuatro reactivos de identificación de CTC y/o reactivos de caracterización de CTC, al menos cinco reactivos de identificación de CTC y/o reactivos de caracterización de CTC o al menos seis reactivos de identificación de CTC y/o reactivos de caracterización de CTC. En otro ejemplo, la obtención de imágenes multispectrales diferencia al menos dos reactivos de identificación de CTC (tal como 2, 3, 4 o 5 reactivos de identificación de CTC) y la obtención de imágenes hiperespectrales diferencia al menos cuatro reactivos de caracterización de CTC (tal como 4, 5, 6, 7 u 8 reactivos de caracterización de CTC).

La FIG. 4 es un esquema que muestra un procedimiento ilustrativo 100 de análisis de una muestra 101 que contiene células tumorales circulantes (CTC) usando un instrumento automatizado. En este modo de realización particular, una primera etapa opcional es enriquecer las CTC 102. Las CTC se depositan sobre un sustrato 103, lo que da como resultado que las CTC estén presentes sobre un sustrato 104. Posteriormente, las CTC se identifican 105 y se caracterizan 106.

La FIG. 5 muestra un modo de realización de un procedimiento de tratamiento de CTC 200 posterior a que las CTC se depositen sobre un sustrato 104. En este modo de realización, el procedimiento incluye permeabilizar las CTC 201, recuperar las dianas 202, poner en contacto la muestra con reactivos de identificación de CTC 203 (por ejemplo, los que se pueden usar para inmunofluorescencia, IF, o inmunohistoquímica, IHQ). El procedimiento puede incluir opcionalmente una segunda etapa de recuperación de dianas 204. El procedimiento prosigue poniendo en contacto la muestra con los reactivos de caracterización de CTC 205 (por ejemplo, los que se pueden usar para la hibridación *in situ*, FISH, CISH, SISH, IF o IHQ), localizando las CTC localizando los reactivos de identificación de CTC 206 (por ejemplo, guía de IF o IHQ) y obteniendo imágenes espectrales de las CTC por localización 207. Después de la obtención de imágenes, se pueden analizar los datos obtenidos a través del procedimiento de obtención de imágenes, informando, por tanto, al usuario o patólogo sobre la naturaleza de las CTC analizadas.

Se puede automatizar una o más etapas de los procedimientos descritos en el presente documento. Los sistemas automatizados ejemplares disponibles a través de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, incluyen el sistema de tinción SYMPHONY® (con n.º de catálogo: 900-SYM3), los sistemas automatizados de preparación de

portaobjetos BenchMark de VENTANA® (con n.º de catálogo: N750-BMKXT-FS, N750-BMKU-FS) y el sistema de tinción automatizado de portaobjetos para tinciones especiales BenchMark de VENTANA®. Estos sistemas emplean un sistema controlado por microprocesador que incluye una rueda giratoria que soporta portaobjetos posicionados radialmente. Un motor de velocidad gradual gira la rueda, disponiendo cada portaobjetos debajo de uno de una serie de distribuidores de reactivos posicionados por encima de los portaobjetos. Los códigos de barras en los portaobjetos y distribuidores de reactivos permiten el posicionamiento controlado por ordenador de los distribuidores y portaobjetos de modo que se puedan realizar diferentes tratamientos con reactivos para cada una de las diversas muestras de tejido mediante la programación apropiada del ordenador.

Los sistemas de instrumentación ilustrativos se diseñan para aplicar secuencialmente reactivos a secciones de tejido u otras muestras (tales como una muestra de sangre) montadas en portaobjetos de vidrio de una por tres pulgadas en condiciones ambientales controladas. El instrumento realiza varias funciones básicas, tales como la aplicación de reactivos, lavado (para eliminar un reactivo aplicado previamente), drenaje con chorro (para reducir el volumen de tampón residual en un portaobjetos después del lavado), la aplicación de un aceite fluido (para que contenga los reactivos y prevenga la evaporación) y otras funciones del instrumento. Los instrumentos de tinción ejemplares procesan los portaobjetos en una rueda giratoria. Los portaobjetos mantienen una posición estacionaria y una rueda de distribuidor gira los reactivos por encima de los portaobjetos fijos. Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar usando diversas configuraciones físicas. El procedimiento de clarificación y tinción de tejido u otra muestra biológica en un portaobjetos consiste en la repetición secuencial de las funciones básicas del instrumento descritas anteriormente. Esencialmente, se aplica un reactivo a la muestra y, a continuación, se incuba durante un tiempo especificado a una temperatura específica. Cuando se completa el tiempo de incubación, el reactivo se elimina por lavado del portaobjetos y se aplica el siguiente reactivo, se incuba, se elimina por lavado, etc., hasta que se hayan aplicado todos los reactivos y se haya completado el procedimiento de tinción.

Para la divulgación relacionada, se hace referencia a Richards *et al.*, pat. de EE. UU. n.º 6.296.809, que describe un aparato y procedimientos para teñir o tratar automáticamente múltiples muestras de tejidos montadas en portaobjetos de modo que cada muestra pueda recibir un protocolo de tinción o tratamiento individualizado incluso cuando dichos protocolos requieran diferentes parámetros de temperatura. Más específicamente, se describe un aparato que comprende un instrumento de tinción accionado por código de barras y controlado por ordenador que aplica automáticamente reactivos químicos y biológicos a tejido o células montadas o fijadas a portaobjetos de vidrio estándar. Una pluralidad de portaobjetos se monta en un conjunto circular sobre una rueda que gira, dirigida mediante el ordenador, a una localización de distribución, disponiendo cada portaobjetos debajo de una serie de distribuidores de reactivos sobre una segunda rueda giratoria posicionada por encima de los portaobjetos. Cada portaobjetos recibe los reactivos seleccionados (por ejemplo, sondas de ADN y/o anticuerpos) y se lava, mezcla y/o calienta en una secuencia óptima y durante el período de tiempo requerido. La muestra se puede montar en un portaobjetos de vidrio. El portaobjetos de vidrio se puede configurar para que sea compatible con un instrumento automatizado de tinción en portaobjetos.

#### A. Evaluación de CTC del cáncer de próstata

En 2008, se estimó que solo el cáncer de próstata representará un 25 % de todos los cánceres en hombres y representará un 10 % de todas las muertes por cáncer en hombres (Jemal *et al.*, *CA Cancer J. Clin.* 58:71-96, 2008). El cáncer de próstata, típicamente, se diagnostica con un tacto rectal ("DRE") y/o un cribado con respecto al antígeno prostático específico (PSA). Un hallazgo anómalo en el DRE y/o un nivel de PSA en suero elevado (por ejemplo, >4 ng/ml) pueden indicar la presencia de cáncer de próstata. Cuando una prueba de PSA o DRE es anómala, se puede usar ecografía transrectal para explorar la próstata y mostrar cualquier área sospechosa. Se usan biopsias de diversos sectores de la próstata para determinar si el cáncer de próstata está presente.

Los oncólogos tienen una serie de opciones de tratamiento disponibles, incluyendo diferentes combinaciones de antineoplásicos que se caracterizan como "tratamientos habituales" y una serie de fármacos que no llevan una información contenida en la ficha técnica para un cáncer particular, pero para los que hay pruebas de eficacia en ese cáncer. La mejor posibilidad de obtener un buen desenlace clínico con el tratamiento requiere que los enfermos reciban de inmediato (un) tratamiento(s) del cáncer óptimo(s) y disponible(s) y que dicho(s) tratamiento(s) se inicie(n) lo más rápido posible tras el diagnóstico. Por otro lado, algunos tratamientos del cáncer tienen efectos adversos significativos sobre la calidad de vida; por tanto, es igualmente importante que los enfermos de cáncer no reciban innecesariamente (un) tratamiento(s) potencialmente dañino(s) y/o ineficaz/ineficaces.

Actualmente, los siguientes productos terapéuticos están disponibles para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC): inmunoterapia con sipuleucel-T, quimioterapia con docetaxel, cabazitaxel, radioterapia ósea con radio 223, MDV-3100 antiandrogénico y tratamiento hormonal con abiraterona. Comprender el mejor tratamiento y la secuencia de tratamientos no se comprende bien, dado que cada tratamiento tiene tanto pacientes que no responden al tratamiento como pacientes que responden muy bien al tratamiento. Dado el entorno metastásico del CPRCm, se puede realizar un seguimiento de las CTC en estos enfermos usando un recuento. Además, los enfermos con una respuesta positiva a los tratamientos citotóxicos (docetaxel y cabitaxel) y de inmunoterapia (sipuleucel-T) tienen gammagrafías óseas y mediciones de PSA heterogéneas. Como tal, PSA y las gammagrafías óseas no siempre son un marcador indirecto fiable de la progresión en enfermos de CPRC. Muchos

enfermos también albergan resistencia *de novo* a los tratamientos citotóxicos o de inmunoterapia, sin ningún buen marcador de la progresión.

5 Dado que algunos cánceres de próstata no se necesitan tratar, mientras que otros casi siempre son mortales, y, además, dado que el tratamiento de la enfermedad puede ser desagradable en el mejor de los casos, hay una fuerte necesidad de obtener procedimientos que permitan a los cuidadores predecir la evolución esperada de la enfermedad, incluyendo la probabilidad de recidiva del cáncer, supervivencia a largo plazo del enfermo, respuesta esperada a un tratamiento particular, y similares, y seleccionar la opción de tratamiento más apropiada en consecuencia. Un procedimiento automatizado de análisis de CTC y kits para el mismo proporcionaría un valioso beneficio a los enfermos de cáncer. Puesto que la sangre es accesible y fácil de extraer, es de gran necesidad un análisis automatizado de CTC para la detección del cáncer en estadio temprano, así como para el seguimiento de la progresión neoplásica y de la recidiva.

15 Por tanto, se proporcionan procedimientos de caracterización de un cáncer de próstata, tal como cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) o CPRC metastásico (CPRCm). Dichos procedimientos pueden incluir obtener o aislar las CTC de un sujeto que tiene cáncer de próstata. El procedimiento puede incluir además detectar una o más moléculas relacionadas con el cáncer de próstata en las CTC (o en una muestra de cáncer de próstata separada), por ejemplo, usando sondas de ácido nucleico o anticuerpos marcados específicos para dichas moléculas relacionadas con el cáncer de próstata. En algunos ejemplos, la molécula relacionada con el cáncer de próstata detectada se compara con la expresión de la una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata en la muestra de cáncer de próstata con respecto a un control que representa la expresión de la una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata esperadas en una muestra de próstata normal. Las moléculas relacionadas con el cáncer de próstata incluyen aquellas cuya expresión se sabe que está alterada (tal como incrementada o disminuida) en una muestra de cáncer de próstata, en relación con una muestra de cáncer de próstata normal. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: proteína de arresto celular específico 1 (GAS1; OMIM 139185), miembro de la familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless 5 (WNT5A; OMIM 164975), timidina cinasa 1 (TK1; OMIM 188300), homólogo del oncogén vírico del sarcoma murino V-raf B1 (BRAF; OMIM 164757), variante de translocación de ETS 4 (ETV4; OMIM 600711), proteína tumoral p63 (OMIM 603273), BCL-2 (OMIM 151430), Ki67 (OMIM 176741), ERK5 (OMIM 602521), receptor androgénico (RA; OMIM 313700), antígeno prostático específico (PSA; OMIM 176820), variante de translocación de ETS 1 (ETV1; OMIM 600541), antígeno prostático específico de membrana (PSMA; OMIM 600934), inhibidor de serina proteasa 1, de tipo Kazal (SPINK1; OMIM 167790), medidas de morfología nuclear (incluyendo características de variación de tamaño y forma nucleares) o combinaciones de los mismos.

35 El uso de ambas sondas para PTEN y para CEN-10 incrementa la precisión de la determinación de que esté presente una delección de PTEN. Por ejemplo, en ensayos previos, solo se usaron sondas para PTEN. Si no había señal detectable de la sonda para PTEN, se deducía que la muestra tenía una delección de PTEN. Sin embargo, dichos procedimientos no explican otras razones por las que no se detectó ninguna señal, lo que incrementa, por tanto, el número de determinaciones de delecciones de PTEN falsas. Para incrementar la precisión, los procedimientos divulgados también usan una sonda específica para centrómero 10. La delección de PTEN no da como resultado la delección del centrómero 10. Por tanto, solo si se obtiene una señal positiva de la sonda para CEN-10, se considera la señal de la sonda para PTEN. Por ejemplo, si no se detecta ninguna señal en la muestra que contiene CTC para la sonda para CEN-10, el ensayo se descarta como defectuoso. Sin embargo, si se detecta una señal en la muestra que contiene CTC para la sonda para CEN-10 (que indica la presencia de CEN-10), a continuación, se considera la señal o la ausencia de señal de la sonda para PTEN, en la que una señal positiva para CEN-10 y negativa para PTEN indica una delección de PTEN, mientras que una señal positiva para CEN-10 y positiva para PTEN indica la ausencia de una delección de PTEN. En algunos ejemplos, el procedimiento incluye además comparar las señales detectadas de las sondas de ácido nucleico para ERG, PTEN y CEN-10 con una célula CTC que tenga (1) ningún reordenamiento de ERG, ninguna delección de PTEN y un CEN-10 detectable o (2) uno o más reordenamientos de ERG, una o más delecciones de PTEN y un CEN-10 detectable.

En modos de realización ilustrativos, se usa un procedimiento de análisis de una muestra que contiene CTC usando un instrumento automatizado que se refiere a un sujeto que tiene cáncer de próstata. En un modo de realización, el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). En otro modo de realización, el CPRC es un CPRC metastásico (CPRCm). En un modo de realización, se caracterizan cuatro marcadores genómicos, incluyendo los cuatro marcadores ERG, PTEN y CEN-10. En un modo de realización específico, las sondas de ácido nucleico son una sonda para ERG en 5', una sonda para ERG en 3', una sonda para PTEN y una sonda para CEN-10.

## 60 B. Aislamiento de las células tumorales circulantes

Se conocen procedimientos para aislar o enriquecer las CTC, por ejemplo, de sangre, fracciones de la misma (tal como suero) o médula ósea. Sin embargo, antes de la presente divulgación, esos procedimientos no han podido proporcionar una muestra que se pueda trasladar a un sistema de tinción de tejidos automatizado. En un ejemplo, las CTC se aíslan de una muestra usando anticuerpos u otros agentes de unión específica frente a uno o más antígenos de superficie celular presentes en las CTC (pero no presentes en los glóbulos sanguíneos, tales como

leucocitos). Un antígeno ejemplar es la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM). Por ejemplo, se puede usar el sistema CellSearch (Veridex) para aislar las CTC, que usa ferrofluidos cargados con un anticuerpo para EpCAM para capturar las CTC. En algunos ejemplos, las CTC se obtienen y aíslan de un enfermo después del diagnóstico de cáncer, y, en algunos ejemplos, después de la prostatectomía u otro tratamiento. En ejemplos ilustrativos, el aislamiento de las CTC genera aproximadamente 900 µl de una suspensión celular que contiene las CTC y otras células (por ejemplo, glóbulos blancos). En un ejemplo, las células enriquecidas se unen a microesferas magnéticas.

Los procedimientos de aislamiento de las CTC incluyen enfoques que se basan en las propiedades físicas, la expresión de biomarcadores o las características funcionales de las CTC. En un ejemplo, se obtiene una muestra de sangre o médula ósea del enfermo que se sospecha que tiene, se sabe que tiene o ha tenido cáncer (tal como cáncer de próstata, por ejemplo, un CPRC o CPRCm) y se usa para aislar las CTC. En algunos ejemplos, las CTC se obtienen y aíslan después del diagnóstico de cáncer, por ejemplo, después de la prostatectomía u otros tratamientos. En algunos ejemplos, el enfermo tiene cáncer de próstata confirmado bioquímica o histológicamente, PSA elevado o ambos. El sujeto puede ser un ser humano u otro mamífero (tal como un perro o un gato) con cáncer. Un sujeto típico con cáncer de próstata es un varón humano; sin embargo, cualquier mamífero que tenga un cáncer de próstata puede servir como fuente de CTC. En un ejemplo, se obtienen de 1 a 10 ml de sangre, tal como 7,5 ml. En algunos ejemplos, la sangre se fracciona y las CTC se aíslan de la fracción de suero. En algunos ejemplos, las CTC se aíslan sometiendo la muestra de sangre a lisis diferencial para eliminar los glóbulos rojos. En algunos ejemplos, las CTC se aíslan de la médula ósea.

En un ejemplo, las CTC se aíslan usando anticuerpos frente a uno o más antígenos de superficie celular presentes en las CTC (pero no presentes en los glóbulos sanguíneos, tales como leucocitos). Las CTC expresan marcadores de superficie de células epiteliales que están ausentes de los leucocitos normales. Por ejemplo, la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) se expresa en células de origen epitelial, pero está ausente en los glóbulos sanguíneos. Por lo tanto, se pueden usar anticuerpos específicos para EpCAM para aislar las CTC, tales como un anticuerpo policlonal o monoclonal, o fragmento del mismo. Dichos anticuerpos están disponibles comercialmente. En un ejemplo, los anticuerpos específicos para EpCAM se conjugan a un sustrato sólido, tal como una microesfera, un portaobjetos o una placa de microvaloración, por ejemplo, microesferas magnéticas. Esto posibilita una purificación fácil de las CTC unidas a los anticuerpos para EpCAM, de tal manera que las células no unidas a los anticuerpos para EpCAM se pueden separar fácilmente de las CTC. Las CTC unidas a los anticuerpos para EpCAM y, por tanto, el soporte sólido, se pueden purificar, por ejemplo, lavando las células no unidas o capturando las células unidas a través de un campo magnético. En un ejemplo específico, se usa el sistema CellSearch (Veridex) para aislar las CTC. Este procedimiento usa ferrofluidos cargados con un anticuerpo para EpCAM para capturar las CTC. En algunos ejemplos, las CTC aisladas también se tiñen con DAPI.

Las CTC aisladas se pueden analizar adicionalmente para garantizar que las células aisladas sean CTC. Por ejemplo, se pueden analizar las células aisladas usando reactivos de identificación de CTC, tal como determinar si las citoqueratinas (CQ) epiteliales citoplásmicas y CD45 están presentes o ausentes. Se usa el marcador específico de leucocitos CD45 como control para excluir leucocitos contaminantes. Las CTC son aquellas células capturadas por EpCAM que son tanto positivas para citoqueratinas como negativas para CD45. Por ejemplo, se pueden usar sondas de ácido nucleico, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales) u otros agentes de unión específica (tales como aptámeros) específicos para CQ o CD45. Los anticuerpos se pueden detectar mediante marcado directo de los propios anticuerpos, por ejemplo, con marcadores radioactivos, marcadores fluorescentes, marcadores de haptenos, tales como biotina, o una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. De forma alternativa, se usa un anticuerpo primario no marcado junto con un anticuerpo secundario marcado, que comprende antisueros, antisueros policlonales o un anticuerpo monoclonal específico para el anticuerpo primario.

En un ejemplo, las CTC se aíslan basándose en sus propiedades físicas. Varias propiedades físicas distinguen a las CTC de la mayoría de los glóbulos sanguíneos normales. Estas incluyen el tamaño más grande de la mayoría de las células epiteliales y las diferencias en densidad, carga, propiedades migratorias y algunas propiedades de tipos de células específicas (por ejemplo, gránulos melanocíticos en células de melanoma). Se pueden usar diferencias en la densidad de flotación para separar las células mononucleadas, incluyendo las CTC, de los glóbulos rojos a través de centrifugación con gradiente. El aislamiento de las CTC en virtud de su tamaño incrementado, en comparación con los leucocitos, se puede conseguir usando enfoques basados en filtración, tales como aislamiento por tamaño de células tumorales epiteliales y sistemas microelectromecánicos. Aunque la mayoría de las CTC derivadas de cánceres epiteliales son más grandes que los leucocitos, hay una variación significativa en su intervalo de tamaños. En un ejemplo, las CTC se aíslan usando procedimientos basados en filtros.

En un ejemplo, se usa una plataforma microfluídica para el aislamiento en una única etapa de CTC de muestras de sangre no procesadas (por ejemplo, véase Negrath *et al.*, *Nature*. 450:1235–1239, 2007; Stott *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 2:25ra23, 2010). Por ejemplo, el chip para CTC es una cámara de silicio trazada con 78.000 micropostes que están recubiertos con un anticuerpo anti-EpCAM. La sangre entera fluye a través del chip, permitiendo la captura de las CTC en los micropostes. En otro ejemplo, se usa un chip de espina de pescado, que hace uso de un microdispositivo de mezclado con agitadora vertical (Stott *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:18392–18397,

2010). En lugar de usar micropostes tridimensionales para romper las líneas de flujo y potenciar las colisiones celulares con los postes recubiertos de anticuerpo, el chip para HB usa patrones de flujo microfluídicos calibrados para hacer que las células entren en contacto con las paredes recubiertas de anticuerpo del dispositivo.

## 5 C. Aplicación de las CTC a sustratos sólidos

Las CTC, tales como las CTC aisladas o las presentes en una muestra (tal como sangre o una fracción de la misma, o médula ósea), se pueden aplicar sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). Por ejemplo, después de aislar las CTC, se pueden adherir a un sustrato. En otro ejemplo, después de obtener la muestra (y en algunos ejemplos, lisar los glóbulos rojos), se pueden adherir los glóbulos blancos restantes y las CTC a un sustrato.

En ejemplos ilustrativos, las CTC se pueden procesar por citoespín o frotis (es decir, el procedimiento de rodillo) o inmunorrecubrir (por ejemplo, adherir a un recubrimiento de anticuerpos para PSMA) sobre el sustrato. Los sustratos sólidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un sustrato de policarbonato, un sustrato de vidrio (tal como un portaobjetos de vidrio que esté cargado de manera positiva) u otro sustrato adecuado. La superficie del sustrato se puede recubrir o modificar mediante medios químicos o físicos, tales como un recubrimiento de proteínas o aminoácidos.

En un ejemplo, las CTC se pueden aplicar a un sustrato citocentrífugando las células sobre un portaobjetos de vidrio, en general, siguiendo los protocolos publicados. Por ejemplo, se pueden centrifugar las células sobre portaobjetos de vidrio recubiertos previamente disponibles comercialmente (por ejemplo, portaobjetos VWR, Superfrost Plus) a 400 rpm durante 4 minutos usando una citocentrífugadora (por ejemplo, Cytospin 4, Shandon Thermo Scientific). Debido a que la integridad de las células se puede perder debido a las fuerzas centrífugas, se puede usar un procedimiento de depósito de diseminación de las células como una citocentrifugación alternativa. El procedimiento de diseminación es más suave que el de citocentrifugación, preservando mejor, de este modo, la forma y el volumen celulares antes de la fijación. Este procedimiento también tiende a aplicar las CTC a un sustrato de una manera, en general, homogénea. En ejemplos ilustrativos, se usa un procedimiento de rodillo para depositar las CTC sobre el sustrato.

Los componentes de la célula suspendidos en un líquido sobre una superficie se pueden distribuir homogéneamente sobre un sustrato como sigue: posicionar un portador líquido que tenga una superficie superior sobre una mesa, posicionar una barra de distribución por encima de la superficie superior del portador líquido a una distancia desde aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$  (tal como de 350  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ ), aplicar un líquido que comprenda componentes de la célula suspendidos en el mismo sobre la superficie superior del portador líquido y mover una o más de las barras de distribución, la mesa y el portador líquido para distribuir uniformemente los componentes de la célula suspendidos en el líquido sobre la superficie superior del portador líquido. En un ejemplo, el líquido se adhiere lo suficiente a la barra de distribución para posibilitar el movimiento y la distribución del líquido uniformemente sobre la superficie superior del portador líquido. En otro ejemplo, se separan los componentes de la célula en el líquido. En otro ejemplo, los componentes de la célula en el líquido comprenden las CTC. La superficie superior del portador líquido puede incluir un recubrimiento u otra propiedad de retención de las células. En un ejemplo, la superficie del portador líquido posicionado sobre la mesa tiene una superficie cargada al menos parcialmente de manera electrostática o un recubrimiento de uno o más anticuerpos y/o moléculas lipófilas sobre la misma.

En otros ejemplos más, el procedimiento incluye además al menos una de estas etapas: a. eliminar el líquido después de que el líquido se haya distribuido homogéneamente sobre la superficie del portador líquido, en el que una capa uniforme de componentes de la célula se retiene sobre la superficie del portador; b. secar el portador líquido para retener los componentes de la célula posicionados uniformemente sobre la superficie del portador; y c. aplicar fluido o fluidos adicional(es) a la superficie superior del portador líquido después de secar el portador líquido, tal como con propósitos de fijación o tinción de los componentes de la célula retenidos en la misma. En un ejemplo, los componentes de la célula suspendidos en el líquido incluyen al menos un subgrupo que se va a detectar. En otro ejemplo, el portador líquido es un portaobjetos. Se hace referencia a la solicitud de EE. UU. en tramitación conjunta n.º de serie 61/621.107 para la divulgación relacionada con el procedimiento de rodillo.

## 55 D. Fijación y permeabilización

En algunos ejemplos, después de que las CTC se acoplan a un sustrato, se fijan, por ejemplo, con un agente de reticulación, tal como FTN. Por ejemplo, se pueden fijar las CTC después del acoplamiento en FTN al 10 % (por ejemplo, a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos, al menos 15 minutos o al menos 20 minutos, tal como de 5 a 30, de 10 a 30 o de 15 a 30 minutos, tal como 20 minutos), seguido de aclaramiento en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (tal como 3x 5 minutos a temperatura ambiente). A continuación, se pueden sumergir los portaobjetos en PBST (Tween 20 al 0,2 % en PBS) para su permeabilización (por ejemplo, a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos, al menos 15 minutos o al menos 20 minutos, tal como de 5 a 30, de 10 a 30 o de 15 a 30 minutos, tal como 20 minutos), aclarar en agua DI y deshidratar en series de contenido de alcohol ascendente (por ejemplo, EtOH al 80 %, al 90 % y absoluto, 1 minuto cada una), seguido de secado al aire. Las muestras se pueden almacenar a -20 °C hasta su uso en cajas herméticas.

Otros fijadores ejemplares para las preparaciones de células y tejido montados se conocen bien en la técnica e incluyen, sin limitación, fijador de Bouin alcohólico al 95 %; fijador de alcohol al 95 %; fijador B5, fijador de Bouin, fijador de formol, fijador de Kamovsky (glutaraldehído), fijador de Hartman, fijador de Hollande, solución de Orth (fijador de dicromato) y fijador de Zenker (véase, por ejemplo, Carson, *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, Chicago:ASCP Press, 1997). En algunos ejemplos, las células se tratan después de su fijación con enzimas, tales como proteasas, para abrir estructuras celulares y, de este modo, hacer que las dianas estén más disponibles para sus ligandos, tales como sondas de ácido nucleico o anticuerpos.

En algunos ejemplos, el procedimiento también incluye fijar las CTC sobre el portaobjetos, por ejemplo, usando una solución de formol tamponado neutro (FTN) al 10 %, que es aproximadamente formaldehído al 3,7 % en solución salina tamponada con fosfato, preservando, de este modo, las moléculas de ácido nucleico diana en las CTC.

Los inventores han identificado procedimientos de fijación y permeabilización que previenen la pérdida de números significativos de células. La pérdida de células es perjudicial para el análisis de CTC debido al muy bajo número de estas células disponibles para el análisis. Una pérdida sesgada de las CTC haría que un procedimiento, como se describe en el presente documento, fuera relativamente inadecuado para el propósito de la evaluación de CTC. Sin embargo, incluso una pérdida no sesgada de células en el portaobjetos disminuye la sensibilidad de la evaluación. En consecuencia, se dedicó una experimentación considerable a establecer las etapas de fijación y permeabilización que previnieran la pérdida significativa de células durante la evaluación posterior. La pérdida de células de interés es el número de células perdidas desde antes de la fijación hasta posteriormente a la obtención de imágenes. De acuerdo con una medida, la pérdida significativa de células se describe como la pérdida de células que es estadísticamente significativa en comparación con la desviación estándar en tres regiones contadas que tienen un número de células en exceso de 1000 células. De acuerdo con otra medida, la pérdida significativa de células es la pérdida de más de aproximadamente un 10 % de las células. Por tanto, en un ejemplo, los procedimientos divulgados retienen al menos un 90 % de las células CTC, al menos un 95 % de las células CTC o al menos un 98 % de las células CTC, tal como un 90-100 %, 90-98 % o 90-95 % de las CTC retenidas.

Los ejemplos de los efectos de diferentes condiciones de fijación y tratamiento se muestran en las tablas 1-3. La tabla 1 muestra los efectos de una fijación con FTN al 10 % de 10 minutos y una fijación con metanol de 3 minutos sobre la retención de las células posterior a cytochex (>30 minutos) y una fijación previa con formol al 0,4 % de 2 minutos. Los valores de retención de las células se determinaron identificando tres regiones de interés por portaobjetos, en los que una región de interés es una de 1 mm x 1 mm. Se contó el número de núcleos teñidos con DAPI y se evaluó para cada región de interés a 20 aumentos. Se calcula el promedio y la desviación estándar a partir de las tres regiones de interés.

La tabla 1 muestra dos de los procedimientos de fijación que dieron como resultado una pérdida no significativa de retención de las células. En este caso, la pérdida de células es menor que la desviación estándar del procedimiento de recuento de las células, por tanto, se considera insignificante.

**Tabla 1: Efecto de la fijación sobre la retención de las células.**

| FIJACIÓN PREVIA:<br>formol al 0,4 % de 2' | FIJACIÓN PREVIA: Cytochex >30 min + formol al<br>0,4 % de 2' |               | FIJACIÓN POSTERIOR:<br>metanol de 3' |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
|                                           | FIJACIÓN POSTERIOR:                                          |               |                                      |
|                                           | FTN al 10 % de 10'                                           | Metanol de 3' |                                      |
| Prom. = 5530                              | 5210                                                         | 4458          | 4702                                 |
| Des. est. = 967                           | 1114                                                         | 1763          | 997                                  |

La tabla 2 muestra dos de los procedimientos de fijación a medida que se realiza un seguimiento de la pérdida de células a través de un procedimiento de IF y FISH con etapas de recuperación de dianas ejemplares. En este caso, la pérdida de células es menor que la desviación estándar del procedimiento de recuento de las células, por tanto, se considera insignificante. La tercera y cuarta líneas indican que el experimento se realizó por duplicado en un segundo portaobjetos con los resultados que se muestran en las mismas.

**Tabla 2: Retención de las células a través de IF y FISH.**

| FIJACIÓN PREVIA:<br>formol al 0,4 % de 2' | FIJACIÓN PREVIA: Cytochex >30 min + formol al<br>0,4 % de 2' |               | FIJACIÓN POSTERIOR:<br>metanol de 3' |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
|                                           | FIJACIÓN POSTERIOR:                                          |               |                                      |
|                                           | FTN al 10 % de 10'                                           | Metanol de 3' |                                      |
| Prom. = 5530                              | 5210                                                         | 4458          | 4702                                 |
| Des. est. = 967                           | 1114                                                         | 1763          | 997                                  |
| Prom. = 5778                              | 7526                                                         | 8056          | 5483                                 |

|                  |      |      |      |
|------------------|------|------|------|
| Des. est. = 1300 | 1632 | 1685 | 1704 |
|------------------|------|------|------|

La tabla 3 muestra dos de los procedimientos de fijación a medida que se realiza un seguimiento de la pérdida de células a través de un procedimiento de IF y FISH con etapas de recuperación de dianas ejemplares para realizar un seguimiento del efecto de PBST (una solución salina tamponada con fosfato con tensioactivo TWEEN®-20 al 0,2 %). En este caso, la pérdida de células es menor que la desviación estándar del procedimiento de recuento de las células, por tanto, se considera insignificante.

**Tabla 3: Efecto de PBST sobre la retención de las células a través de IF y FISH.**

| FIJACIÓN PREVIA:<br>formol al 0,4 % de 2' |       | FIJACIÓN PREVIA: Cytochex >30 min + formol al 0,4 %<br>de 2' |       |               |       | FIJACIÓN POSTERIOR:<br>metanol de 3' |       |
|-------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------------|-------|---------------|-------|--------------------------------------|-------|
|                                           |       | FIJACIÓN POSTERIOR:                                          |       |               |       |                                      |       |
|                                           |       | FTN al 10 % de 10'                                           |       | Metanol de 3' |       |                                      |       |
| PBST+                                     | PBST- | PBST+                                                        | PBST- | PBST+         | PBST- | PBST+                                | PBST- |
| Prom.<br>5900                             | 4395  | 4169                                                         | 4342  | 5606          | 3167  | 3805                                 | 4044  |
| Des. est.<br>593                          | 1289  | 806                                                          | 1678  | 297           | 2056  | 1500                                 | 913   |
| Prom.<br>6325                             | 5520  | 7201                                                         | 7850  | 7858          | 8254  | 5555                                 | 5410  |
| Des. est.<br>1500                         | 633   | 661                                                          | 2033  | 477           | 773   | 1500                                 | 1400  |

Por tanto, en algunos ejemplos, las CTC se fijan usando una fijación previa con formol (tal como formol del 0,1 % al 1 %, por ejemplo, formol al 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1 %) de 1-5 minutos (tal como de 1, 2, 3, 4 o 5 minutos) seguido de una fijación con FTN (tal como FTN del 1 % al 20 %, por ejemplo, FTN al 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 20 %) de 5-15 minutos (tal como de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 minutos) y una fijación con metanol de 1-5 minutos (tal como de 1, 2, 3, 4 o 5 minutos), tal como usando una fijación previa con formol al 0,4 % de 2 minutos seguida de una fijación con FTN al 10 % de 10 minutos y una fijación con metanol de 3 minutos.

#### E. Recuperación de dianas

El procedimiento de análisis de una muestra que contiene CTC usando un instrumento automatizado puede incluir una etapa de recuperación de dianas en la muestra. La recuperación de dianas puede incluir poner en contacto la muestra con un reactivo de recuperación de dianas. Los reactivos de recuperación de dianas ejemplares para dianas de ácido nucleico (ISH) pueden incluir una solución que incluya ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). Los reactivos de recuperación de dianas ejemplares para dianas proteicas (IHQ) pueden incluir una solución de acondicionamiento de células, tal como un tampón de ácido bórico. En un ejemplo, la recuperación de dianas incluye poner en contacto la muestra con un tampón basado en tris que tenga un pH ligeramente básico y aplicar calor de modo que se rompan los enlaces covalentes resultantes de la fijación. En otro ejemplo, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con una proteasa. En otro ejemplo, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra con un tampón de citrato que tenga un pH ligeramente ácido y aplicar calor de modo que se rompan los enlaces covalentes resultantes de la fijación. En otro ejemplo más, la recuperación de dianas incluye poner en contacto la muestra con un tampón basado en tris que tenga un pH ligeramente básico y aplicar calor de modo que se rompan los enlaces covalentes resultantes de la fijación y poner en contacto la muestra con una proteasa antes de ponerla en contacto con reactivos de identificación de CTC y el procedimiento comprende además poner en contacto la muestra con un tampón de citrato que tenga un pH ligeramente ácido y aplicar calor de modo que se rompan los enlaces covalentes resultantes de la fijación y poner en contacto la muestra con una proteasa antes de poner en contacto la muestra con reactivos de caracterización de CTC. En un ejemplo (por ejemplo, si la diana es un ácido nucleico), el contacto se puede hacer a una temperatura de aproximadamente 95 °C durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 90 minutos. En un ejemplo (por ejemplo, si la diana es una proteína), el contacto se puede hacer a una temperatura de aproximadamente 100 °C durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 90 minutos. Una lista parcial de posibles reactivos aparece en Analytical Morphology, Gu, ed., Eaton Publishing Co. (1997) en las pp. 1-40. Se pueden incluir dodecilsulfato de sodio (SDS) y/o etilenglicol en la solución de acondicionamiento. Además, se pueden añadir iones de metal u otros materiales a estos reactivos para incrementar la eficacia del acondicionamiento de células. Las soluciones de acondicionamiento de células ejemplares están disponibles de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ (acondicionamiento de células 1 (CC1), con n.º de catálogo: 950-124; acondicionamiento de células 2 (CC2), con n.º de catálogo: 950-123; SSC (10X), con n.º de catálogo: 950-110; acondicionamiento de células ULTRA (ULTRA CC1), con n.º de catálogo: 950-224; acondicionamiento de células ULTRA (ULTRA CC2), con n.º de catálogo: 950-223, proteasa 1, con n.º de catálogo: 760-2018; proteasa 2, con n.º de catálogo: 760-2019; proteasa 3, con n.º de catálogo: 760-2020). En un ejemplo, la aplicación del reactivo de unión IHQ o el reactivo de unión de hibridación *in situ* se produce posteriormente a la aplicación del reactivo de acondicionamiento de células y antes de la aplicación del reactivo cromogénico.

Como se describe en el presente documento en asociación con las etapas de fijación y permeabilización, la selección de los reactivos de recuperación de dianas influye en la retención de las células y en la expresión de las dianas. Tras tratar una muestra con un procedimiento de recuperación de dianas que sea demasiado intensivo, se puede producir una pérdida significativa de células del sustrato, se pueden desnaturalizar las dianas de modo que sean indetectables o combinaciones de los mismos. Por el contrario, tras tratar una muestra con un procedimiento de recuperación de dianas que no sea adecuado, las señales asociadas con las dianas no serán evidentes durante la obtención de imágenes. Confundir la identificación de las etapas de recuperación de dianas apropiadas es que el procedimiento se relaciona inversamente con la fijación en tanto que una mayor fijación requiere una mayor recuperación y, por tanto, los cambios en la fijación necesitan el nuevo desarrollo de procedimientos de recuperación apropiados. Además, confundir la identificación de las etapas de recuperación de dianas apropiadas es que se descubrió que las dianas proteicas y las dianas génicas requieren habitualmente diferentes condiciones de recuperación para la detección adecuada. Puesto que el presente procedimiento incluye la detección de tanto dianas proteicas como génicas, se desarrolló un enfoque de recuperación que posibilitaba este doble análisis génico-proteico y se divulga en el presente documento. De acuerdo con un enfoque, las proteínas se recuperan en primer lugar. A continuación, las proteínas se marcan con un resto de unión específica (por ejemplo, un anticuerpo) antes de recuperar las dianas génicas. Este enfoque posibilita el uso de reactivos de recuperación de dianas génicas que, sin la interacción con unión específica, desnaturalizarían la diana al grado que no se podría detectar posteriormente. Por el contrario, preservar la diana proteica daría como resultado el uso de reactivos de recuperación de genes que expresan de manera inadecuada las dianas génicas.

Un procedimiento de análisis de una muestra que contiene CTC usando un instrumento automatizado puede incluir aplicar un reactivo de aclaramiento. Entre las diversas etapas descritas en el presente documento y como parte del sistema descrito en el presente documento, se pueden añadir etapas de aclaramiento para eliminar reactivos residuales que no han reaccionado de la etapa anterior. Las etapas de aclaramiento pueden incluir además incubaciones que incluyan mantener un reactivo de aclaramiento en la muestra durante un tiempo determinado previamente a una temperatura determinada previamente con o sin mezclado. Las condiciones apropiadas para las etapas de aclaramiento pueden ser distintas entre las diversas etapas. Los reactivos de aclaramiento ejemplares están disponibles de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ (tampón de reacción (10x), con n.º de catálogo: 950-300; lavado de tinciones especiales (10x), con n.º de catálogo 860-015).

#### F. Identificación de las CTC

En algunos ejemplos, el procedimiento de análisis de una muestra que contiene CTC usando un instrumento automatizado incluye poner en contacto la muestra con reactivos de identificación de CTC usando el instrumento automatizado. Los reactivos de identificación de CTC permiten la determinación de que una célula sea una célula CTC. Los marcadores de proteínas de CTC ejemplares incluyen CD45, citoqueratina, ERG, receptor androgénico y PSMA. En un modo de realización, el procedimiento incluye inmunofluorescencia para obtener imágenes de los reactivos de identificación de CTC (tales como anticuerpos marcados para obtener imágenes específicos para los marcadores de proteínas de CTC). La obtención de imágenes de la muestra puede incluir usar filtros de paso de banda multiespectrales. En algunos modos de realización, la inmunofluorescencia procede de anticuerpos marcados directamente con fluoróforos o la inmunofluorescencia resulta de la excitación de los fluoróforos con luz visible filtrada espectralmente. La luz visible filtrada espectralmente puede incluir un primer intervalo seleccionado para excitar un primer fluoróforo y un segundo intervalo seleccionado para excitar un segundo fluoróforo, en la que el primer intervalo seleccionado no excita significativamente el segundo fluoróforo y el segundo intervalo seleccionado no excita significativamente el primer fluoróforo. Un experto en la técnica apreciará que se pueden excitar fluoróforos adicionales en el intervalo apropiado, por ejemplo, si se van a detectar más de dos proteínas. En otro ejemplo, obtener imágenes de la muestra incluye adquirir una primera imagen de inmunofluorescencia de la muestra excitada por el primer intervalo seleccionado y adquirir una segunda imagen de inmunofluorescencia de la muestra excitada por el segundo intervalo seleccionado y localizar las CTC localizando los reactivos de identificación de CTC incluye comparar o superponer la primera imagen de inmunofluorescencia y la segunda imagen de inmunofluorescencia. Un experto en la técnica apreciará que se pueden obtener y superponer imágenes adicionales, por ejemplo, si se van a detectar más de dos proteínas. Por ejemplo, la obtención de imágenes de la primera imagen de inmunofluorescencia identifica células CQ+ y la segunda imagen de inmunofluorescencia identifica células CD45+, en la que la comparación o superposición incluye identificar células que sean CQ+ y CD45-. En otro ejemplo, localizar las CTC localizando los reactivos de identificación de CTC incluye analizar algorítmicamente la primera imagen de inmunofluorescencia y la segunda imagen de inmunofluorescencia (o incluso más imágenes) usando un ordenador. En otro ejemplo, analizar algorítmicamente incluye examinar digitalmente las imágenes para medir el tamaño de la célula, la localización del compartimento de la célula de los marcadores y/o la intensidad de la expresión del marcador. En un ejemplo, la obtención de imágenes espectrales de las CTC incluye la obtención de imágenes multiespectrales.

El procedimiento puede incluir aplicar un reactivo cromogénico de modo que la muestra se tiña específicamente. En un ejemplo, teñir específicamente incluye la aplicación de una tinción primaria que tiñe selectivamente porciones de la muestra a través de la adhesión asociada con hidrofobia, intercalación u otras asociaciones sin reconocimiento. En otros ejemplos ilustrativos, el procedimiento incluye aplicar un reactivo de unión inmunohistoquímico (IHQ) o de inmunofluorescencia (IF). Como los términos se usan en el presente documento, IF e IHQ difieren solo en la manera

en la que se detectan. En particular, IF implica que la interacción específica se detecta usando fluorescencia (por ejemplo, usando microscopia de campo oscuro) e IHQ implica que la interacción específica se detecta usando cromógenos (por ejemplo, usando microscopia de campo claro). Como se usa en el presente documento de diversas maneras, el término "IF" implica que se podría usar "IHQ" y viceversa. IHQ incluye el uso de anticuerpos que se unen específicamente a los epítomos de interés. Los epítomos, también denominados antígenos o secuencias antigénicas, son porciones de proteínas que se han establecido como un marcador de interés clínico. Por ejemplo, el epítopo puede ser una forma mutada de una proteína, un sitio de unión proteína-proteína o una proteína normal que se expresa a una concentración más alta o bien más baja que la normal, tal como en una muestra de control. La detección y/o cuantificación de epítomos en diversas muestras biológicas se han usado para muchos propósitos clínicos.

Tanto IHQ como ISH implican un acontecimiento de reconocimiento específico entre una sonda de ácido nucleico (ISH) o un anticuerpo (IHQ) y una diana en la muestra. Esta interacción específica marca la diana. El marcador se puede visualizar directamente (marcador directo) u observar indirectamente usando procedimientos químicos de detección adicionales. La detección cromogénica, que implica el depósito de una sustancia cromogénica en las proximidades del marcador, implica etapas de detección adicionales para amplificar la intensidad de la señal para facilitar la visualización. La visualización de la señal amplificada (por ejemplo, el uso de moléculas indicadoras) permite que un observador localice dianas en la muestra.

La detección cromogénica ofrece un procedimiento de detección simple y rentable. Los sustratos cromogénicos han funcionado tradicionalmente mediante precipitación cuando actúan mediante la enzima apropiada. Es decir, la sustancia cromogénica tradicional se convierte de un reactivo soluble en un precipitado coloreado insoluble tras ponerse en contacto con la enzima. El precipitado coloreado resultante no requiere ningún equipo especial para su procesamiento o visualización. La tabla 4 es una lista no exhaustiva de sistemas de cromógenos útiles dentro del alcance de la presente divulgación:

**Tabla 4: Reactivos de detección cromogénica.**

| Abr.      | Nombre                                                                                     | Color             | Enzima             |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|
| DAB       | 3,3'-diamino-bencidina + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                     | marrón - negro    | peroxidasa         |
| AEC       | 3-amino-9-etil-carbazol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                    | rojo              | peroxidasa         |
| CN        | 4-cloro-1-naftol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                           | azul              | peroxidasa         |
| BCIP/NBT  | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato + nitroazul de tetrazolio                                | añil - negro      | fosfatasa alcalina |
| FAST RED  | 4-cloro-2-metilbencenodiazonio + 2,4-dimetilanilida-fosfato del ácido 3-hidroxi-2-naftoico | rojo              | fosfatasa alcalina |
| FAST BLUE | Sal disódica de fosfato de AS-MX naftol + sal hemi(cloruro de zinc) sal de Fast Blue BB    | azul              | fosfatasa alcalina |
| FUCSINA   | Naftol AS-BI + New Fuchsin                                                                 | rojo              | fosfatasa alcalina |
| NBT       | nitroazul de tetrazolio + metosulfato de fenacina                                          | azul - violeta    | deshidrogenasa     |
| ALK GOLD† | dihidrogenofosfato de 3-metil-1-fenil-1H-pirazol-5-ilo + Fast Blue BB                      | amarillo - dorado | fosfatasa alcalina |

La tabla 4, aunque no es exhaustiva, proporciona una visión de las variedades de sustancias cromogénicas disponibles en la actualidad (véase también el documento WO2012/024185, Kelly *et al.* "Substrates for Chromogenic detection and methods of use in detection assays and kits").

Las CTC en el portaobjetos se pueden identificar como aquellas células que son CQ+ y CD45- (por ejemplo, usando anticuerpos para pan-CQ y CD45 como se describe a continuación). En algunos ejemplos, las CTC también se tiñen con DAPI.

#### G. Caracterización de las CTC

En algunos ejemplos, el procedimiento de análisis de una muestra que contiene CTC incluye poner en contacto la muestra con reactivos de caracterización de CTC usando el instrumento automatizado. Los reactivos de caracterización de CTC son reactivos que permiten el análisis de un trastorno, tal como el pronóstico o diagnóstico de cáncer, tal como cáncer de próstata. En un modo de realización, los reactivos de caracterización de CTC incluyen sondas de ácido nucleico dirigidas a marcadores genómicos (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 marcadores genómicos). Los marcadores genómicos se pueden analizar para determinar la expresión génica y/o reordenamientos/deleciones genéticas. Por ejemplo, los marcadores genómicos pueden incluir una sonda de expresión génica y una combinación de sondas para reordenamientos/deleciones. En un modo de realización específico, los marcadores genómicos incluyen ERG, PTEN y CEN-10. Por ejemplo, las sondas de ácido nucleico pueden ser una sonda para ERG en 5', una sonda para ERG en 3', una sonda para PTEN y una sonda para CEN-10. En un modo de realización, los reactivos de caracterización de CTC incluyen sondas de ácido nucleico dirigidas

a marcadores genómicos y los reactivos de identificación de CTC incluyen reactivos IHQ dirigidos a marcadores de proteínas de CTC. En un modo de realización específico, los marcadores genómicos incluyen ERG, PTEN y CEN-10 y los marcadores de proteínas de CTC incluyen uno o más de CD45, CQ, ERG, RA y PSMA (tales como 2, 3, 4 o 5 de estas proteínas).

5 En algunos modos de realización, los procedimientos para analizar una muestra que contiene CTC usando un instrumento automatizado incluyen obtener imágenes de la muestra. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir la obtención de imágenes espectrales de las CTC por localización o la luminiscencia de imágenes espectrales de los reactivos de caracterización de CTC (por ejemplo, procediendo la luminiscencia de restos de unión específica marcados con puntos cuánticos). Los restos de unión específica se pueden marcar directamente (por ejemplo, con puntos cuánticos) o se marcan indirectamente (por ejemplo, con los puntos cuánticos, procediendo la luminiscencia de los puntos cuánticos que marcan los anticuerpos secundarios antihapteno, siendo los anticuerpos secundarios antihapteno específicos para haptenos que marcan los restos de unión específica). En un modo de realización, los restos de unión específica son sondas de ácido nucleico y/o anticuerpos. En un modo de realización, la obtención de imágenes espectrales de las CTC incluye excitar los puntos cuánticos con radiación, tal como radiación UV o UV cercano. En un ejemplo, la radiación tiene un perfil de emisión espectral con un máximo entre 300 y 400 nm. En otro ejemplo, la obtención de imágenes espectrales de las CTC incluye la obtención de imágenes hiperespectrales. La obtención de imágenes espectrales se puede guiar mediante la etapa de localizar las CTC en las regiones de interés con exclusión de las regiones que carecen de interés. En otro ejemplo, las regiones de interés incluyen las CTC. En otro ejemplo, la luz visible filtrada espectralmente no da como resultado una luminiscencia de puntos cuánticos significativa. En otro ejemplo más, la obtención de imágenes de la muestra incluye inmunofluorescencia para obtener imágenes multispectrales de los reactivos de identificación de CTC y la obtención de imágenes espectrales de las CTC incluye obtener imágenes hiperespectrales de los reactivos de caracterización de CTC. En un ejemplo, la obtención de imágenes multispectrales e hiperespectrales diferencia al menos aproximadamente cuatro reactivos de identificación de CTC y/o reactivos de caracterización de CTC, al menos aproximadamente cinco reactivos de identificación de CTC y/o reactivos de caracterización de CTC o al menos aproximadamente seis reactivos de identificación de CTC y/o reactivos de caracterización de CTC. En otro ejemplo, la obtención de imágenes multispectrales diferencia al menos aproximadamente dos reactivos de identificación de CTC y la obtención de imágenes hiperespectrales diferencia al menos aproximadamente cuatro reactivos de caracterización de CTC.

30 Por ejemplo, el procedimiento puede incluir poner en contacto las CTC presentes sobre el portaobjetos de vidrio (u otro sustrato) con una o más sondas de ácido nucleico específicas para ERG, PTEN y CEN-10 (tal como 3, 4 o 5 sondas diferentes), en condiciones suficientes para que las sondas se hibriden a su secuencia diana complementaria en las CTC (si están presentes), y poner en contacto las células presentes sobre el portaobjetos de vidrio (u otro sustrato) con uno o más anticuerpos específicos para al menos dos de CD45, CQ, ERG, RA y PSMA (para confirmar que la célula es una célula CTC, como se describe en el presente documento). Las sondas pueden ser una única sonda de ácido nucleico o una población de varias sondas de ácido nucleico diferentes. El uso de una sonda específica para ERG, PTEN o CEN-10 permite la detección de alternancias en la secuencia genómica de una célula CTC, tal como reordenamiento de al menos un alelo de ERG, amplificación de al menos un alelo de ERG, fusión de al menos un alelo de ERG, delección de al menos un alelo de PTEN o combinaciones de los mismos. Se pueden detectar ERG y PTEN a nivel genómico, por ejemplo, detectando (una) alteración/alteraciones en la(s) secuencia(s) genómica(s) de ERG o PTEN, tal como detectar un reordenamiento de TMPRSS-ERG o delección de PTEN. El uso de anticuerpos específicos para dos o más de CD45, CQ, ERG, RA y PSMA permite la identificación de células CTC.

45 Las sondas de ácido nucleico pueden incluir puntos cuánticos para permitir la detección de la hibridación. Por ejemplo, cada una de las sondas de ácido nucleico específicas para ERG, PTEN y CEN-10 se puede marcar con un punto cuántico diferente (u otro marcador detectable), de tal manera que la señal de cada punto cuántico (o marcador) sea distinguible. Por ejemplo, se puede marcar una sonda para ERG en extremo 5' con un primer punto cuántico (tal como un punto cuántico que emita a 565 nm), se puede marcar una sonda para ERG en extremo 3' con un segundo punto cuántico (tal como un punto cuántico que emita a 655 nm), se puede marcar una sonda para PTEN con un tercer punto cuántico (tal como un punto cuántico que emita a 605 nm) y se puede marcar una sonda para CEN-10 con un cuarto punto cuántico (tal como un punto cuántico que emita a 585 nm). Por tanto, cuando una sonda de ácido nucleico se hibrida a su correspondiente secuencia complementaria en las CTC, su presencia se indica mediante la emisión de una señal característica que indica la hibridación de una sonda de ácido nucleico particular con una diana particular (por ejemplo, ERG, PTEN o CEN-10).

De forma similar, como se advierte en el presente documento, los anticuerpos pueden incluir puntos cuánticos u otros marcadores para permitir la detección de la unión específica. Por ejemplo, cada uno de los anticuerpos específicos para CD45, CQ, ERG, RA y PSMA se pueden marcar con un punto cuántico diferente (u otro marcador detectable), de tal manera que la señal de cada punto cuántico (o marcador) sea distinguible. Por ejemplo, un anticuerpo específico para CD45 se puede marcar con un primer punto cuántico, un anticuerpo específico para CQ se puede marcar con un segundo punto cuántico y así sucesivamente. Por tanto, cuando un anticuerpo se une a su proteína diana en las CTC, su presencia se indica mediante la emisión de una señal característica que indica la unión específica de un anticuerpo particular con una diana particular (por ejemplo, CD45, CQ, ERG, RA o PSMA).

- En un ejemplo, la una o más sondas de ácido nucleico específicas para *ERG* incluye dos sondas o población de sondas: una específica para el extremo 5' de *ERG* y una específica para el extremo 3' de *ERG*. Dicha sonda se puede denominar sonda de separación. Por ejemplo, si está ausente un reordenamiento de *ERG*, las señales de la sonda para *ERG* en extremo 5' y de la sonda para *ERG* en extremo 3' se solaparán sustancialmente. Por ejemplo, si la sonda para *ERG* en extremo 5' incluye un punto cuántico que emite una señal verde (por ejemplo, 565 nm) y la sonda para *ERG* en extremo 3' incluye un punto cuántico que emite una señal roja (por ejemplo, 655 nm), si está ausente un reordenamiento de *ERG*, las señales roja y verde, en general, se solaparán, mientras que si está presente un reordenamiento de *ERG* las señales roja y verde se separarán sustancialmente. Por tanto, para *ERG* hay cuatro acontecimientos mensurables, (1) dos señales roja y verde colocalizadas es un *ERG* normal, (2) una colocación más una división de rojo y verde es un reordenamiento de *ERG* a través de inserción, (3) una colocación más una señal roja (sin verde) es un reordenamiento de *ERG* a través de delección en 5' y (4) una colocación y múltiples señales rojas es una delección y amplificación de *ERG*). En un ejemplo, cada una de la sonda para *ERG* en extremo 5' y la sonda para *ERG* en extremo 3' incluye una población de una pluralidad de sondas de ácido nucleico, cada una de las cuales es de al menos 50 kb, tal como de al menos 100 kb o al menos 150 kb, tal como de al menos 170 kb. En un ejemplo, la sonda para *ERG* en extremo 5' abarca aproximadamente 370 kb en el extremo 5' del gen *ERG*, y la sonda para *ERG* en extremo 3' abarca aproximadamente 317 kb en el extremo 3' del gen *ERG*.
- En un ejemplo, la una o más sondas de ácido nucleico específicas para *PTEN* incluyen una población de una pluralidad de sondas de ácido nucleico, cada una de las cuales es de al menos 50 kb, tal como de al menos 100 kb, al menos 150 kb, al menos 200 kb o al menos 240 kb, tal como de aproximadamente 200 a 300 kb. En ejemplos particulares, la sonda para *PTEN* no se hibrida específicamente a una región codificante de *PTEN*.
- En un ejemplo, la una o más sondas de ácido nucleico específicas para CEN-10 es una sonda plasmídica, tal como pA10RP8 (disponible de American Type Culture Collection).
- En algunos ejemplos, el procedimiento también incluye exponer las CTC a la luz ultravioleta, en condiciones suficientes para excitar los puntos cuánticos en las sondas de ácido nucleico que se han hibridado a las dianas de ácido nucleico en las CTC, dando como resultado la emisión de una señal única para cada tipo de punto cuántico.
- El procedimiento también incluye detectar señales del uno o más puntos cuánticos en la una o más sondas de ácido nucleico o anticuerpos, por ejemplo, usando obtención de imágenes espectrales o microscopia de fluorescencia o ambas. En un ejemplo, se adquieren señales de 400 – 700 nm en incrementos de 5 nm. En algunos ejemplos, las señales del uno o más puntos cuánticos se detectan de manera simultánea o coincidente. Basándose en las señales detectadas, se realiza una determinación sobre si las CTC obtenidas del sujeto tienen un reordenamiento de *ERG*, delección del gen *PTEN* y si se detecta CEN-10. Si no se detecta la sonda para CEN-10, se descartan los resultados. Si se detecta la sonda para CEN-10, se determinan los resultados. Además, basándose en las señales detectadas, se realiza una determinación sobre si la proteína CD45, CQ, *ERG*, RA y/o PSMA está presente en las células.
- Por ejemplo, si se detecta la sonda para CEN-10, pero no se detecta ninguna señal de sonda para *PTEN*, esto indica que se delecionan ambos genes *PTEN*. Si se detecta la sonda para CEN-10, pero solo se detecta una señal de sonda para *PTEN*, esto indica que se deleciona un gen *PTEN*. Si se detecta la sonda para CEN-10 y se detectan ambas señales de sonda para *PTEN*, esto indica que ambos de los genes *PTEN* están inalterados. Si se detecta la sonda para CEN-10, y la sonda para *ERG* en extremo 5' y la sonda para *ERG* en extremo 3' producen dos señales colocalizadas, esto indica dos genes *ERG* normales. Si se detecta la sonda para CEN-10, y la sonda para *ERG* en extremo 5' y la sonda para *ERG* en extremo 3' producen una señal colocalizada y una división de cada señal (división de la señal de la sonda para *ERG* en extremo 5' y la señal de la sonda para *ERG* en extremo 3'), esto es un reordenamiento de *ERG* a través de inserción. Si se detecta la sonda para CEN-10, y la sonda para *ERG* en extremo 5' y la sonda para *ERG* en extremo 3' producen una señal colocalizada, ninguna señal de la sonda para *ERG* en extremo 5', sino una señal de la sonda para *ERG* en extremo 3', esto es un reordenamiento de *ERG* a través de una delección en 5' de *ERG*. Si se detecta la sonda para CEN-10, y la sonda para *ERG* en extremo 5' y la sonda para *ERG* en extremo 3' producen una señal colocalizada y múltiples señales de la sonda para *ERG* en extremo 3', esto es una delección y amplificación de *ERG*.
- Basándose en la determinación sobre si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o si se delecionan uno o más genes *PTEN*, se caracteriza el cáncer de próstata. Por ejemplo, la caracterización un cáncer de próstata puede incluir predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento particular, tal como el tratamiento con un inhibidor de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) (por ejemplo, olaparib, MK4827 e iniparib), el tratamiento con un agente que bloquea la vía hormonal (por ejemplo, abiraterona) o el tratamiento con radioterapia; predecir la probabilidad de recidiva de la enfermedad después de la prostatectomía; predecir la probabilidad de progresión del cáncer de próstata; predecir la probabilidad de metástasis del cáncer de próstata; predecir la probabilidad del tiempo de supervivencia; o combinaciones de los mismos. Por tanto, en algunos ejemplos, el procedimiento es de pronóstico, en tanto que predice la probabilidad de que el cáncer de próstata sea de mayor o menor malignidad, por ejemplo, la probabilidad de que el cáncer progrese, metastatice o recidive (por ejemplo, después de una prostatectomía) o la probabilidad de supervivencia. En otros ejemplos, el procedimiento es de diagnóstico, en tanto que determina que el cáncer de próstata sea de mayor o menor malignidad, por ejemplo, la probabilidad de que el

cáncer progrese, metastatice o recidive (por ejemplo, después de una prostatectomía) o la probabilidad de supervivencia (tal como la probabilidad de sobrevivir al menos 1 año, al menos 3 años o al menos 5 años).

5 Por ejemplo, se puede usar el procedimiento para predecir que el cáncer de próstata responderá a un inhibidor de PARP cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; predecir que el cáncer de próstata responderá a un inhibidor de AKT o PI3K cuando las CTC tengan una delección de PTEN; predecir que el cáncer de próstata no responderá a la radioterapia cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; predecir que el cáncer de próstata responderá a un inhibidor de vía hormonal (tal como la abiraterona) cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; predecir que el cáncer de próstata tiene una probabilidad más alta de recidiva después de un tratamiento (tal como la recidiva en los 5 años tras la prostatectomía u otro tratamiento) cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; predecir que el cáncer de próstata tiene una probabilidad más alta de progresar cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; predecir que es más probable que el cáncer de próstata metastatice cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; predecir un tiempo de supervivencia de menos de 5 años cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; o combinaciones de los mismos.

20 En algunos ejemplos, el procedimiento puede incluir además la detección de una o más moléculas constitutivas en las CTC (o en una muestra de cáncer de próstata separada), por ejemplo, usando sondas de ácido nucleico o anticuerpos marcados específicos para dichas moléculas constitutivas. En algunos ejemplos, la molécula constitutiva detectada se compara con la expresión de la una o más moléculas constitutivas en la CTC o muestra de cáncer de próstata con un control que representa la expresión de la una o más moléculas constitutivas esperadas en una muestra de próstata normal. Las moléculas constitutivas se conocen en la técnica e incluyen aquellas cuya expresión es similar (por ejemplo, varía en menos de un 10 %, menos de un 5 % o menos de un 1 %) en una muestra de cáncer de próstata en relación con una muestra de cáncer de próstata normal. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: GAPDH (gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa), SDHA (succinato deshidrogenasa), HPRT1 (hipoxantina fosforribosil transferasa 1), HBS1L (proteína similar a HBS1),  $\beta$ -actina y AHSP (proteína de estabilización de hemoglobina alfa).

30 En un ejemplo ilustrativo, el procedimiento de análisis de una muestra que contiene CTC puede incluir poner en contacto la muestra con reactivos de caracterización de CTC que incluye un reactivo dirigido hacia una o más moléculas constitutivas en las CTC, en el que el análisis de la muestra incluye comparar la expresión de la una o más moléculas constitutivas en las CTC con respecto a un control que representa la una o más moléculas constitutivas esperadas en una muestra de próstata normal. En otro modo de realización, el análisis de la muestra incluye detectar una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata en las CTC y comparar la expresión de la una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata en las CTC con un control de la una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata esperadas en una muestra de próstata normal.

#### 40 H. Sondas para el cáncer de próstata

Se pueden usar sondas de ácido nucleico específicas para ERG, PTEN y CEN-10 en los procedimientos divulgados. Dichas sondas permiten determinar si se reordenan (por ejemplo, mediante inserción o delección en 5') o amplifican uno o más alelos de *ERG*, si se delecionan uno o más genes *PTEN*, si se detecta el centrómero 10 (CEN-10) o combinaciones de los mismos. La divulgación no se limita al uso de secuencias de sonda específicas. En un ejemplo, el ensayo es múltiple, de modo que se detecta más de un ácido nucleico en la misma muestra, tal como en la misma CTC o poblaciones de CTC (tal como las presentes en un portaobjetos de vidrio u otro sustrato). Por ejemplo, se pueden detectar ERG, PTEN y CEN-10 en la misma CTC (o población de CTC en un portaobjetos), tal como la detección de un reordenamiento o amplificación de *ERG*, delección del gen *PTEN*, CEN-10 o combinaciones de los mismos, en la misma CTC.

Por tanto, después de aislar las CTC de un enfermo, tal como uno con CPRC o CPRCm, las CTC se fijan y, a continuación, se ponen en contacto o incuban con una o más sondas específicas para ERG, PTEN y CEN-10, y se dejan hibridar a la temperatura pertinente, y la sonda en exceso se elimina por lavado. En algunos ejemplos, las sondas se marcan directamente, por ejemplo, con un punto cuántico, de modo que se puede determinar la localización y cantidad de la sonda en las células (por ejemplo, usando obtención de imágenes espectrales). En algunos ejemplos, por ejemplo, si no se marca la sonda, el procedimiento incluye además su incubación con una sonda complementaria marcada (tal como marcada con una marca radioactiva, fluorescente o antigénica), de modo que se puedan determinar la localización y cantidad de la sonda en las CTC.

Las alteraciones del gen en el genoma (por ejemplo, amplificación génica, delección génica, fusión génica u otros reordenamientos cromosómicos o duplicaciones cromosómicas (por ejemplo, polisomía) o pérdida de uno o más cromosomas) se pueden determinar usando cualquier técnica conocida en la técnica. Las técnicas ejemplares incluyen, por ejemplo, procedimientos basados en el análisis de hibridación de polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos genómicos), así como procedimientos basados en la secuenciación de polinucleótidos.

- En consecuencia, en algunos modos de realización, se detectan alteraciones genómicas, por ejemplo, usando hibridación *in situ* de sondas genómicas específicas de gen. La preparación de sondas genómicas específicas de gen se conoce bien en la técnica (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 5447841, 5756696, 6872817, 6596479, 6500612, 6607877, 6344315, 6475720, 6132961, 7115709, 6280929, 5491224, 5663319, 5776688, 5663319, 5776688, 6277569, 6569626, 7.763.421, la sol. de pat. de EE. UU. n.º 11/849,060 y las sol. de PCT n.ºs PCT/US07/77444 y PCT/US2010/062485). En algunos procedimientos ejemplares, la detección de alteraciones genómicas se facilita comparando el número de sitios de unión para una sonda genómica específica de gen con una sonda genómica de control (por ejemplo, una sonda genómica específica para el centrómero del cromosoma sobre el que se localiza el gen de interés, tal como centrómero 10). En algunos ejemplos, la delección del gen se puede determinar mediante la proporción de la sonda genómica específica de gen con respecto a una sonda de control (por ejemplo, centromérica). Por ejemplo, una proporción menor de uno indica la delección del gen (o la región cromosómica) a la que se une la sonda específica de gen.
- En algunos ejemplos, las alteraciones genómicas o regiones de un genoma se detectan usando técnicas de hibridación *in situ*, tal como hibridación *in situ* con fluorescencia. En estos procedimientos, se ponen en contacto ligandos específicos, tales como sondas marcadas con un punto cuántico o fluoróforo específicas para un gen diana (por ejemplo, un gen *ERG* o *PTEN*) o región de un cromosoma (por ejemplo, un CEN-10) con una muestra, tal como las CTC montadas sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). Los ligandos específicos forman interacciones detectables específicas (por ejemplo, se hibridan a) sus dianas afines en la muestra. Por ejemplo, la hibridación entre las sondas y el ácido nucleico diana se puede detectar, por ejemplo, detectando un marcador asociado con la sonda. En algunos ejemplos, se usa obtención de imágenes espectrales o microscopía de fluorescencia.
- En algunos ejemplos, el medio usado para detectar alternancias genómicas de *PTEN* y *ERG*, y la presencia de CEN-10, es una molécula de ácido nucleico, tal como una sonda o cebador. Por ejemplo, las sondas de ácido nucleico específicas para *PTEN*, para *ERG* y para CEN-10 se pueden obtener de una fuente disponible comercialmente (tal como Ventana Medical Systems (Tucson, AZ) y Vysis (IL)) o preparar usando técnicas comunes en la técnica (tales como las descritas en los documentos PCT/US2010/062485 o US 7.763.421). Las sondas y cebadores de ácido nucleico son moléculas de ácido nucleico que se pueden hibridar con una molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico diana genómico o centrómero). Por ejemplo, las sondas específicas para *PTEN* o para *ERG*, cuando se hibridan con la diana, se pueden detectar directa o bien indirectamente, por ejemplo, mediante un marcador (tal como un punto cuántico) presente en la sonda. Por tanto, las sondas y los cebadores permiten la detección, y, en algunos ejemplos, la cuantificación, de una molécula de ácido nucleico diana, tal como *PTEN*, *ERG* y CEN-10.
- Las sondas y los cebadores se pueden "hibridar" a una secuencia de ácidos nucleicos diana formando pares de bases con regiones complementarias de la molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, ADN o ARN, tal como ADN genómico, ADNc o ARNm), formando, de este modo, una molécula con doble hélice. Las condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza del procedimiento de hibridación y de la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan. En general, la temperatura de hibridación y la fuerza iónica (tal como la concentración de Na<sup>+</sup>) del tampón de hibridación determinarán la rigurosidad de la hibridación. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación para conseguir determinados grados de rigurosidad se analizan en Sambrook *et al.*, (1989) Molecular Cloning, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY (capítulos 9 y 11). Lo que sigue es un conjunto ejemplar de condiciones de hibridación y no es limitante:

Rigurosidad muy alta (detecta secuencias que comparten al menos un 90 % de identidad)

|                  |                                                                |
|------------------|----------------------------------------------------------------|
| Hibridación:     | 5x SSC a 65 °C durante 16 horas                                |
| Lavar dos veces: | 2x SSC a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos cada uno |
| Lavar dos veces: | 0,5x SSC a 65 °C durante 20 minutos cada uno                   |

Rigurosidad alta (detecta secuencias que comparten al menos un 80 % de identidad)

|                  |                                                  |
|------------------|--------------------------------------------------|
| Hibridación:     | 5x-6x SSC a 65 °C-70 °C durante 16-20 horas      |
| Lavar dos veces: | 2x SSC a TA durante 5-20 minutos cada uno        |
| Lavar dos veces: | 1x SSC a 55 °C-70 °C durante 30 minutos cada uno |

Rigurosidad baja (detecta secuencias que comparten al menos un 50 % de identidad)

Hibridación: 6x SSC a TA a 55 °C durante 16-20 horas

Lavar al menos dos veces: 2x-3x SSC a TA a 55 °C durante 20-30 minutos cada uno.

Un experto en la técnica puede identificar las condiciones suficientes para que una sonda se hibride específicamente a un gen diana, tal como un gen *ERG*, un gen *PTEN* o CEN-10 presentes en una muestra de CTC. Por ejemplo, un experto en la técnica puede determinar experimentalmente las características (tales como la longitud, la composición de bases y el grado de complementariedad) que posibilitarán que una sonda de ácido nucleico se hibride con su ácido nucleico diana (por ejemplo, un gen *ERG*, gen *PTEN* o CEN-10) en condiciones de rigurosidad seleccionada, mientras se minimiza la hibridación no específica a otras sustancias o moléculas. Típicamente, la secuencia de ácidos nucleicos de una sonda tendrá suficiente complementariedad con respecto al correspondiente gen para posibilitar que se hibride en condiciones de hibridación rigurosas seleccionadas, por ejemplo, hibridación a aproximadamente 37 °C o más alta (tal como aproximadamente 37 °C, 42 °C, 44 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C o más alta, por ejemplo, a aproximadamente de 37 °C a 70 °C, de 37 °C a 50 °C, tal como a 44 °C).

Los procedimientos de generación de una sonda o cebador específico para un ácido nucleico diana (por ejemplo, *PTEN*, *ERG* o CEN-10) son habituales en la técnica. En un ejemplo, la sonda de ácido nucleico es una población de sondas de ácido nucleico, tal como una población que incluye fragmentos de la secuencia diana (tal como fragmentos de al menos 50 nucleótidos (nt), al menos 75 nt, al menos 100 nt, al menos 200 nt, al menos 500 nt, tal como de 50 a 1000 nt o de 100 a 500 nt), en la que los fragmentos se amplifican y, a continuación, se ligan al azar entre sí. Por ejemplo, la población de sondas resultante puede incluir sondas individuales que son de al menos 10 kb, tal como de al menos 20 kb, de al menos 50 kb o de al menos 100 kb, tal como de 10 a 1000 kb, de 10 a 500 kb o de 20 a 200 kb. Por tanto, por ejemplo, una sonda para *ERG*, *PTEN* o CEN-10 puede incluir una población de sondas de ácido nucleico que incluya fragmentos de un gen *ERG*, gen *PTEN* o CEN-10 (tal como fragmentos de al menos 50 nt, al menos 75 nt, al menos 100 nt, al menos 200 nt, al menos 500 nt, tal como de 50 a 1000 nt o de 100 a 500 nt de un gen *ERG*, gen *PTEN* o CEN-10, respectivamente), y la población de sondas resultante puede incluir sondas individuales que son de al menos 10 kb, tal como de al menos 20 kb, de al menos 50 kb o de al menos 100 kb, tal como de 10 a 1000 kb, de 10 a 500 kb o de 20 a 200 kb. En un ejemplo, las sondas de ácido nucleico específicas para las SEQ ID NO: 1 o 3 pueden ser específicas para al menos 12, al menos 50, al menos 100 o al menos 1000 nucleótidos contiguos de dicha secuencia (o su cadena complementaria). En algunos ejemplos, los fragmentos se delecionan lo suficiente de las secuencias repetidas. La sonda se puede acoplar directa o indirectamente a un "marcador", lo que hace que la sonda sea detectable. Por ejemplo, se pueden incorporar nucleótidos marcados en una sonda mediante una variedad de procedimientos que incluyen transcripción *in vitro* con las ARN polimerasas SP6, T3 o T7, marcado en el extremo 3' con desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), ADN polimerasa T4 o ADN polimerasa T7, marcado de ADN con cebador al azar con el fragmento de Klenow, marcado de ADNc con transcriptasa inversa AMV o M-MuLV, marcado por desplazamiento de mella con ADNasa 1 y ADN polimerasa 1 y marcado por PCR con ADN polimerasas termófilas como Taq o Pfu. En algunos ejemplos, se marcan las sondas usando desplazamiento de mella (usando nucleótidos marcados con hapteno, por ejemplo), seguido de un anticuerpo antihapteno marcado, tal como los marcados con un punto cuántico. Los nucleótidos marcados con hapteno ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los que incluyen nitropirazol (NP) o tirosulfonamida (TS).

En un ejemplo, la sonda es una sonda ISH de al menos 1000 pb, tal como de al menos 2000, al menos 3000, al menos 4000, al menos 5000 o al menos 6000, tal como de 1000 a 6000 pb, que abarca desde aproximadamente 300 kb a 800 kb.

En un ejemplo, la una o más sondas de ácido nucleico específicas para *ERG* incluye dos sondas o población de sondas: una específica para el extremo 5' de *ERG* y una específica para el extremo 3' de *ERG*. Dicha sonda se puede denominar sonda de separación. En un ejemplo, cada una de la sonda para *ERG* en extremo 5' y la sonda para *ERG* en extremo 3' incluyen una población de una pluralidad de sondas de ácido nucleico. En un ejemplo, cada una de la población de sondas para la sonda para *ERG* en extremo 5' es de al menos 50 kb, tal como de al menos 100 kb, al menos 150 kb, tal como de al menos 188 kb. En un ejemplo, la sonda para *ERG* en extremo 5' abarca aproximadamente 370,38 kb en el extremo 5' del gen *ERG*. En un ejemplo, se marca la sonda para *ERG* en extremo 5' usando nucleótidos con digoxigenina específicamente unidos a anticuerpos antihapteno marcados (marcados con el punto cuántico 565). En un ejemplo, cada una de la población de sondas para la sonda para *ERG* en extremo 3' es de al menos 50 kb, tal como de al menos 100 kb, al menos 150 kb, tal como de al menos 177 kb. En un ejemplo, la sonda para *ERG* en extremo 3' abarca aproximadamente 317,176 kb en el extremo 3' del gen *ERG*. En un ejemplo, se marca la sonda para *ERG* en extremo 3' usando nucleótidos con 2,4-dinitrofenilo (DNP) unidos específicamente a anticuerpos antihapteno marcados (marcados con el punto cuántico 655).

En un ejemplo, una sonda de ácido nucleico específica para *PTEN* incluye una población de fragmentos genómicos de *PTEN* que abarcan aproximadamente 765 kb en el área de la región cromosómica 10q23.31. En un ejemplo, la una o más sondas de ácido nucleico específicas para *PTEN* incluyen una población de una pluralidad de sondas de ácido nucleico, cada una de las cuales es de al menos 50 kb, tal como de al menos 100 kb, al menos 150 kb, al

menos 200 kb o al menos 240 kb, tal como de aproximadamente 200 a 300 kb. En ejemplos particulares, la sonda para PTEN no se hibrida específicamente a una región codificante de PTEN (y, por tanto, la sonda no es complementaria a una secuencia codificante de PTEN). En un ejemplo, se marca la sonda para PTEN usando nucleótidos con hapteno tirosulfonimida unidos específicamente a anticuerpos antihapteno marcados (marcados con el punto cuántico 605).

En un ejemplo, una sonda de ácido nucleico específica para CEN-10 incluye una población de fragmentos genómicos de CEN-10 que abarcan aproximadamente 1,36 kb en el área de la región cromosómica 10q11.1-q.11.1. En un ejemplo, la sonda de ácido nucleico específica para CEN-10 es una sonda plasmídica, tal como pA10RP8 (disponible de American Type Culture Collection). En un ejemplo, se marca la sonda para CEN-10 usando nucleótidos marcados con hapteno nitropirazol unidos específicamente a anticuerpos antihapteno marcados (marcados con el punto cuántico 585). La SEQ ID NO: 5 muestra una sonda para CEN-10 ejemplar que se puede usar para confirmar una delección de PTEN (si PTEN está inalterado, se esperan 2 pares de CEN-10 y PTEN en el cromosoma 10; si PTEN es heterocigótico, se espera 1 par de PTEN/CEN-10 y un único CEN-10 en la otra copia del cromosoma 10; si PTEN es homocigótico solo 2 únicas señales para CEN-10 – una en cada brazo del cromosoma 10).

#### I. Marcadores detectables

Los marcadores detectables adecuados para los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen aquellos detectables mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen biotina para tinción con conjugado de estreptavidina marcada, microesferas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADS™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), puntos cuánticos, radiomarcadores (por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{32}\text{P}$ ), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos, tales como microesferas de oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, de poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Los medios de detección de dichos marcadores también se conocen bien. Por tanto, por ejemplo, se pueden detectar radiomarcadores usando contadores de centelleo o película fotográfica, se pueden detectar marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la luz emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan típicamente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido mediante la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado.

En un ejemplo específico, el marcador es una nanopartícula, tal como una partícula de oro o un nanocrystal semiconductor). Se pueden usar nanocrystal semiconductores cromogénicos y/o fluorescentes, a menudo también denominados puntos cuánticos, como marcadores detectables. Los puntos cuánticos nanocrystalinos son partículas nanocrystalinas semiconductoras y sin limitar la presente divulgación, para su uso con emisores de luz de partículas de un tamaño particular, típicamente varían desde 2-10 nm de tamaño. Los puntos cuánticos son típicamente fluoróforos estables, a menudo son resistentes al fotoblanqueamiento y tienen un amplio intervalo de longitudes de onda de excitación con un espectro de emisión estrecho. Se pueden seleccionar puntos cuánticos que tengan características de emisión particulares, tales como emisiones a longitudes de onda particulares, de tal manera que se puedan usar diferentes puntos cuánticos plurales que tengan diferentes características de emisión plurales para identificar diferentes dianas plurales. Los bioconjugados de puntos cuánticos se caracterizan por rendimientos cuánticos comparables a los colorantes fluorescentes tradicionales más brillantes disponibles. Además, estos fluoróforos basados en puntos cuánticos absorben de 10-1000 veces más luz que los colorantes fluorescentes tradicionales. La emisión de los puntos cuánticos es estrecha y simétrica, lo que significa que se minimiza el solapamiento con otros colores, dando como resultado una mínima contaminación de la señal en canales de detección adyacentes y la filtración atenuada en otro canal, lo que puede dar lugar a la multiplexación simultánea de puntos cuánticos que emiten de manera diferencial para propósitos de detección. Los espectros de emisión simétricos y ajustables se pueden variar de acuerdo con el tamaño y la composición del material de las partículas, lo que permite un espaciado flexible y cercano de diferentes puntos cuánticos sin un solapamiento espectral sustancial. Además, sus espectros de absorción son amplios, lo que hace posible excitar todas las variantes de color de los puntos cuánticos de manera simultánea usando una única longitud de onda de excitación, minimizando, de este modo, la autofluorescencia de la muestra. Además, se ha descubierto que la pegilación, la introducción de grupos de polietilenglicol en los conductos de puntos cuánticos, puede disminuir sustancialmente la interacción no específica proteína:punto cuántico. Determinados puntos cuánticos están disponibles comercialmente, tal como los productos Qdot™ de Life Technologies, Inc.

Los modos de realización de trabajo ejemplares utilizan nanopartículas de puntos cuánticos, tales como los nanocrystal Qdot™565 y Qdot™655, donde el número usado en dicha nomenclatura se refiere a la longitud de onda aproximada del máximo de emisión de la nanopartícula. Por ejemplo, un nanocrystal Qdot™565 emite luz que tiene una longitud de onda de 565 nm y produce un color verde claro. Por tanto, se pueden seleccionar puntos cuánticos para proporcionar una señal detectable a una longitud de onda particular. La detección se realiza a través de una variedad de medios, por ejemplo, un microscopio de fluorescencia, fluorómetro, escáner fluorescente, etc., dependiendo de una aplicación dada.

Por ejemplo, se puede realizar el análisis inmunohistoquímico fluorescente con puntos cuánticos con sondas de ácido nucleico. El análisis de imágenes se puede realizar capturando inicialmente cubos de imagen en una cámara de obtención de imágenes espectrales. La excitación se puede efectuar con una fuente de luz UV (mercurio). A continuación, se pueden analizar los cubos de imagen. En resumen, se pueden recuperar cubos de imagen en la aplicación y los datos se pueden extraer e informar basándose en las intensidades de los píxeles de los puntos cuánticos esperados que emitan a la longitud de onda específica para los puntos cuánticos usados en las sondas (tales como 585 nm, 565 nm, 605 nm y 655 nm).

Como ejemplo, se puede medir la fluorescencia con el sistema de obtención de imágenes multiespectrales (tal como los disponibles de Ventana, Tucson, AZ; Nuance™, Cambridge Research & Instrumentation, Woburn, MA; o SpectrView™, Applied Spectral Imaging, Vista, CA). La obtención de imágenes multiespectrales es una técnica en la que se recopila información espectroscópica en cada píxel de una imagen y los datos resultantes se analizan con un programa informático de procesamiento de imágenes espectrales. Por ejemplo, se puede obtener una serie de imágenes a diferentes longitudes de onda (tal como segmentos a 5 nm desde 400 a 700 nm) que sean seleccionables electrónicamente y continuamente y, a continuación, utilizar con un programa de análisis diseñado para manipular dichos datos. Se puede obtener de manera simultánea información cuantitativa de múltiples marcadores, incluso cuando los espectros de los colorantes se solapan mucho o cuando se colocan, o se producen en el mismo punto en la muestra, siempre que las curvas espectrales sean diferentes. Muchos materiales biológicos presentan autofluorescencia o emiten luz de menor energía cuando se excitan con luz de energía más alta. Esta señal puede dar como resultado imágenes con menor contraste y datos. Las cámaras de alta sensibilidad sin capacidad de obtención de imágenes multiespectrales solo incrementan la señal de autofluorescencia junto con la señal de fluorescencia. La obtención de imágenes multiespectrales puede separar o filtrar por separación la autofluorescencia de tejidos y, de este modo, incrementar la proporción señal-ruido que se puede lograr.

Está disponible una variedad de programas informáticos y equipos periféricos disponibles comercialmente para digitalizar, almacenar y analizar un vídeo digitalizado o imagen óptica digitalizada, por ejemplo, usando ordenadores PC (ordenadores basados en DOS™, OS2™, WINDOWS™, WINDOWS NT™ o WINDOWS7™ con chips compatibles con Intelx86 o Pentium) o basados en MACINTOSH™ o UNIX (por ejemplo, SUN™, SGI™ u otra estación de trabajo).

## J. Resultados de detección

Tras la detección de las sondas para ERG, para PTEN y para CEN-10, si están presentes alteraciones genómicas de ERG y de PTEN y si se detectó CEN-10, así como los resultados del ensayo, se pueden registrar hallazgos, diagnósticos, predicciones y/o recomendaciones de tratamiento y comunicar a los técnicos, médicos y/o enfermos, por ejemplo. Por ejemplo, se pueden usar ordenadores para comunicar dicha información a las partes interesadas, tales como a los enfermos y/o a los médicos adjuntos. Por ejemplo, los resultados se pueden visualizar en un monitor, imprimir o almacenar en la memoria. Basándose en la medición, se puede modificar el tratamiento administrado a un sujeto.

Por ejemplo, se puede comunicar un diagnóstico, predicción y/o recomendación de tratamiento basándose en si se reordena ERG o se deleciona PTEN (o en combinación con otros diagnósticos, tales como los de un nomograma para el cáncer de próstata, tales como el valor de PSA y grado de Gleason) a las partes interesadas tan pronto como sea posible después de que se complete el ensayo y se genere el diagnóstico y/o la predicción. Los resultados y/o información relacionada se pueden comunicar al sujeto por el médico responsable del sujeto. De forma alternativa, los resultados se pueden comunicar directamente a las partes interesadas mediante cualquier medio de comunicación, incluyendo por escrito, tal como, proporcionando un informe escrito, formas de comunicación electrónicas, tales como correo electrónico, o por teléfono. La comunicación se puede facilitar mediante el uso de un ordenador, tal como en el caso de las comunicaciones por correo electrónico. Por ejemplo, la comunicación que contiene los resultados de una prueba de diagnóstico y/o las conclusiones extraídas de y/o recomendaciones de tratamiento basadas en la prueba, se pueden generar y entregar automáticamente a las partes interesadas usando una combinación de equipos informáticos y programas informáticos que serán familiares para los expertos en las telecomunicaciones. Un ejemplo de un sistema de comunicaciones orientado a la asistencia sanitaria se describe en la pat. de EE. UU. n.º 6.283.761; sin embargo, la presente divulgación no se limita a los procedimientos que utilizan este sistema de comunicaciones particular. En determinados modos de realización de los procedimientos de la divulgación, todas o algunas de las etapas del procedimiento, incluyendo el ensayo de las CTC, diagnóstico o pronóstico del cáncer de próstata y la comunicación de los resultados del ensayo o diagnósticos o pronósticos, se pueden llevar a cabo en diversas jurisdicciones (por ejemplo, extranjeras).

### 1. Detección

Se puede usar cualquier procedimiento adecuado para detectar las sondas que se han hibridado con su diana genómica. En algunos ejemplos, las sondas incluyen un marcador detectable y la detección de la presencia de la(s) sonda(s) incluye detectar el marcador detectable. En algunos ejemplos, las sondas se marcan con diferentes marcadores detectables. Por ejemplo, una sonda para ERG en 5' puede incluir un primer marcador, una sonda para ERG en 3' puede incluir un segundo marcador, una sonda para PTEN puede incluir un tercer marcador y una sonda

para CEN-10 puede incluir un cuarto marcador. En un ejemplo específico, una sonda para ERG en 5' puede incluir un primer punto cuántico (tal como uno que emita a 565 nm), una sonda para ERG en 3' puede incluir un segundo punto cuántico (tal como uno que emita a 655 nm), una sonda para PTEN puede incluir un tercer punto cuántico (tal como uno que emita a 605 nm) y una sonda para CEN-10 puede incluir un cuarto punto cuántico (tal como uno que emita a 585 nm). En otros ejemplos, las sondas se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante hibridación con un ácido nucleico marcado. Por tanto, por ejemplo, examinando las imágenes de las CTC incubadas con dichas sondas, se puede determinar qué puntos coloreados están presentes (en los que cada color es específico para una sonda particular) y determinar el ordenamiento de dichos puntos, permitiendo, de este modo, una determinación sobre si se reordenan o amplifican uno o más *ERG*, si se deleciona uno o más genes *PTEN*, o combinaciones de los mismos.

## K. Biomarcadores del cáncer de próstata

### 1. Gen relacionado con ETS (ERG) (OMIM: 165080)

El gen relacionado con ETS (ERG) humano (también conocido como *erg-3* y *p55*) se localiza en el cromosoma 21 (21q22.3) y es un miembro de la familia de factores de transcripción ETS. Las secuencias de ERG están disponibles públicamente, por ejemplo, de GenBank® (por ejemplo, con los números de acceso NP\_001129626 y NP\_598420.1 (proteínas) y NM\_133659.2, NM\_001136154.1 y NM\_001838708.2 (ácidos nucleicos)).

La proteína ERG (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2) es un regulador transcripcional que se une a las secuencias ricas en purina. Se ha demostrado que la fusión del gen ERG con otros genes se asocia con diferentes cánceres. Por ejemplo, la translocación t(16;21)(p11;q22) del gen ERG fusionado con el gen fusionado en sarcoma (FUS) se asocia con leucemia mieloide humana. Las fusiones EWS-ERG se asocian a la familia de tumores de Ewing. La fusión ERG con la región 5' no traducida de la proteasa transmembranaria, la serina 2 (TMPRSS2) (localizada en el cromosoma 21 humano) se asocia con el cáncer de próstata. Los genes TMPRSS2 y ERG están dispuestos en tándem en el cromosoma 21q22. La fusión TMPRSS2/ERG liga normalmente los exones 1 o 2 de TMPRSS2 a los exones 2, 3 o 4 de ERG, lo que da como resultado la activación del factor de transcripción ERG. Los reordenamientos de TMPRSS/ERG se producen en aproximadamente un 50 % de los cánceres de próstata y un 20 % de las lesiones de neoplasias intraepiteliales prostáticas anaplásicas (HGPIIN), dando como resultado una regulación por incremento de ERG. El reordenamiento de TMPRSS/ERG da como resultado una lesión similar a PIN que puede pasar a un estado invasor mediante regulación por incremento de la vía PI3K.

Los anticuerpos ERG están disponibles públicamente, por ejemplo, de Ventana (Epitomics EPR 3864) y Biocare (clon 9F4).

### 2. Homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (OMIM 601728)

El gen PTEN humano se localiza en el cromosoma 10 (10q23.31) y el gen PTEN de ratón se localiza en el cromosoma 19. Las secuencias de PTEN (tanto naturales como mutantes) están disponibles públicamente, por ejemplo, de GenBank® (por ejemplo, con los números de acceso NP\_000305.3, AAD13528.1, EAW50174.1, EAW50173.1, EAW50172.1, AAH05821.1 y NP\_032986.1 (proteínas) y NM\_000314.4 y NM\_008960.2 (ácidos nucleicos)).

PTEN, también conocido como fosfatasa MMAC (mutada en múltiples cánceres avanzados), es un gen supresor tumoral implicado en una amplia variedad de cánceres humanos. La proteína PTEN (por ejemplo, SEQ ID NO: 4) es una fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa, que incluye un dominio similar a tensina, así como un dominio catalítico. A diferencia de la mayoría de las proteínas tirosina fosfatasas, PTEN desfosforila preferentemente los sustratos de fosfoinosítidos. PTEN regula de manera negativa los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato en las células y funciona como un supresor tumoral regulando de manera negativa la vía de señalización Akt/PKB. Se ha demostrado que las mutaciones y delecciones de PTEN se asocian a cánceres.

Los anticuerpos para PTEN están disponibles públicamente, por ejemplo, de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (con los números de catálogo sc-7974; sc-133197; sc-133242) y Cell Signaling Technology (clon 138G6).

### 3. Secuencias variantes

Además de las secuencias específicas proporcionadas en el presente documento (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-4) y las secuencias que actualmente están disponibles públicamente para ERG, PTEN, CEN-10, EpCAM, CD45 y CQ, un experto en la técnica apreciará que las variantes de dichas secuencias pueden estar presentes en un sujeto particular. Por ejemplo, pueden estar presentes polimorfismos para un gen o proteína particular. Además, una secuencia puede variar entre diferentes organismos. En ejemplos particulares, una secuencia variante retiene la actividad biológica de su correspondiente secuencia natural. Por ejemplo, una secuencia del gen ERG, PTEN, EpCAM, CD45 o CQ presente en un sujeto particular puede codificar cambios conservadores de aminoácidos (tales como sustituciones muy altamente conservadas, sustituciones altamente conservadas o sustituciones conservadas), tales como de 1 a 5 o de 1 a 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras de

aminoácidos ejemplares se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5: Sustituciones conservadoras de aminoácidos ejemplares.**

| Residuo original | Sustituciones muy altamente conservadas | Sustituciones altamente conservadas (de la matriz Blosum90) | Sustituciones conservadas (de la matriz Blosum65) |
|------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Ala              | Ser                                     | Gly, Ser, Thr                                               | Cys, Gly, Ser, Thr, Val                           |
| Arg              | Lys                                     | Gln, His, Lys                                               | Asn, Gln, Glu, His, Lys                           |
| Asn              | Gln; His                                | Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr                                | Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr            |
| Asp              | Glu                                     | Asn, Glu                                                    | Asn, Gln, Glu, Ser                                |
| Cys              | Ser                                     | Ninguna                                                     | Ala                                               |
| Gln              | Asn                                     | Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met                                | Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser            |
| Glu              | Asp                                     | Asp, Gln, Lys                                               | Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser                 |
| Gly              | Pro                                     | Ala                                                         | Ala, Ser                                          |
| His              | Asn; Gln                                | Arg, Asn, Gln, Tyr                                          | Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr                           |
| Ile              | Leu; Val                                | Leu, Met, Val                                               | Leu, Met, Phe, Val                                |
| Leu              | Ile; Val                                | Ile, Met, Phe, Val                                          | Ile, Met, Phe, Val                                |
| Lys              | Arg; Gln; Glu                           | Arg, Asn, Gln, Glu                                          | Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,                          |
| Met              | Leu; Ile                                | Gln, Ile, Leu, Val                                          | Gln, Ile, Leu, Phe, Val                           |
| Phe              | Met; Leu; Tyr                           | Leu, Trp, Tyr                                               | Ile, Leu, Met, Trp, Tyr                           |
| Ser              | Thr                                     | Ala, Asn, Thr                                               | Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr            |
| Thr              | Ser                                     | Ala, Asn, Ser                                               | Ala, Asn, Ser, Val                                |
| Trp              | Tyr                                     | Phe, Tyr                                                    | Phe, Tyr                                          |
| Tyr              | Trp; Phe                                | His, Phe, Trp                                               | His, Phe, Trp                                     |
| Val              | Ile; Leu                                | Ile, Leu, Met                                               | Ala, Ile, Leu, Met, Thr                           |

5

Una secuencia de ERG, PTEN, EpCAM, CD45 o CQ puede ser una variante de secuencia de una secuencia de ERG, PTEN, EpCAM, CD45, o CQ natural, respectivamente, tal como una secuencia de ácidos nucleicos o proteínas que tenga al menos un 99 %, al menos un 98 %, al menos un 95 %, al menos un 92 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 % o al menos un 60 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 1-4 (o dicha cantidad de identidad de secuencia con respecto al número de acceso a GenBank® al que se hace referencia en el presente documento), en la que la variante resultante retenga la actividad biológica de ERG, PTEN, EpCAM, CD45 o CQ. "Identidad de secuencia" es una expresión usada comúnmente para describir la similitud entre dos secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos). La identidad de secuencia se expresa típicamente en términos de identidad en porcentaje; cuanto más alto sea el porcentaje, más similares serán las dos secuencias.

15

Los procedimientos para alinear secuencias para su comparación y determinación de la identidad de secuencia se conocen bien en la técnica. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene*, 73:237-244, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS*, 5:151-153, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 16:10881-10890, 1988; Huang, *et al.*, *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-165, 1992; Pearson *et al.*, *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331, 1994; Tatiana *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 174:247-250, 1999. Altschul *et al.* presentan una consideración detallada de procedimientos de alineación de secuencias y cálculos de homología (*J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990).

25

La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) está disponible públicamente de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en internet para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en Internet en la sección de ayuda para BLAST™.

30

Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 15 aminoácidos se emplea la función "2 secuencias de Blast" del programa BLAST™ (Blastp), que usa la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada con respecto a parámetros por defecto (coste por apertura de hueco [por defecto = 5]; coste por extensión de hueco [por defecto = 2]; penalización por emparejamiento erróneo [por defecto = 3]; recompensa por emparejamiento [por defecto = 1]; valor esperado (E) [por defecto = 10,0]; medida de los fragmentos [por defecto = 3]; y número de descripciones en una línea (V) [por defecto = 100]. Al alinear péptidos cortos (de menos de alrededor de 15 aminoácidos), la alineación se debe realizar usando la función 2 secuencias de Blast "Buscar emparejamientos cortos prácticamente exactos", que emplea la matriz PAM30 ajustada con respecto a los parámetros por defecto (umbral esperado = 20000, medida de los fragmentos = 2, costes por hueco: existencia = 9 y extensión = 1), que usa estadísticas basadas en la composición.

35

40

## L. Caracterización de un cáncer de próstata

Esta divulgación demuestra que se pueden detectar, por ejemplo, de manera simultánea reordenamientos de *ERG* (tales como por medio de 30 inserciones o deleciones y/o amplificaciones), deleciones de *PTEN*, o combinaciones de los mismos, en la misma CTC. Basándose en estos resultados, se pueden usar los procedimientos divulgados para pronosticar y diagnosticar el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) basándose en si las CTC aisladas de dichos enfermos tienen uno o más reordenamientos de *ERG* y deleciones de *PTEN*. Basándose en la determinación sobre si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o si se delecionan uno o más genes *PTEN*, se caracteriza el cáncer de próstata. En un ejemplo, un diagnóstico o pronóstico de que el cáncer es de mayor malignidad indica que se predice que el cáncer de próstata recidivará en 1 año, en 3 años o en 5 años, por ejemplo, en dicho plazo tras una prostatectomía. En un ejemplo, un diagnóstico o pronóstico de que el cáncer es de mayor malignidad indica que se predice que el cáncer de próstata metastatizará en 1 año, en 3 años o en 5 años, por ejemplo, en dicho plazo tras una prostatectomía. En un ejemplo, un diagnóstico o pronóstico de que el cáncer es de mayor malignidad indica que se espera que el enfermo fallezca de cáncer de próstata en 1 año, en 3 años o en 5 años, por ejemplo, en dicho plazo tras una prostatectomía.

En un ejemplo, un diagnóstico o pronóstico de que el cáncer es de menor malignidad (por ejemplo, no se reordena *ERG*, no se delecciona *PTEN*) indica que se predice que el cáncer de próstata no recidivará en 1 año, en 3 años o en 5 años, por ejemplo, en dicho plazo tras una prostatectomía. En un ejemplo, un diagnóstico o pronóstico de que el cáncer es de menor malignidad indica que no se predice que el cáncer de próstata metastatizará en 1 año, en 3 años o en 5 años, por ejemplo, en dicho plazo tras una prostatectomía. En un ejemplo, un diagnóstico o pronóstico de que el cáncer es de menor malignidad indica que no se espera que el enfermo fallezca de cáncer de próstata en un año, en 3 años o en 5 años, por ejemplo, en dicho plazo tras una prostatectomía.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento particular, tal como el tratamiento con inhibidores de la enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP). Los inhibidores de PARP ejemplares incluyen, pero no se limitan a, olaparib, rucaparib, veliparib, CEP 9722, BMN-673, 3-aminobenzamida, MK4827 e iniparib. Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, (tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y deleción de *PTEN*) se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) responderá a los inhibidores de PARP. Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no deleccionados) (tal como una ausencia de reordenamientos del gen *ERG* y deleciones de *PTEN*), se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) no responderá a los inhibidores de PARP.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento con inhibidores de la vía hormonal, tales como inhibidores del receptor androgénico (o inhibidores de la vía RA, tal como un inhibidor de CYP17A1). Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen, pero no se limitan a: MDV3100 (4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-oxo-2-tioxoimidazolidin-1-il)-2-fluoro-N-metilbenzamida), abiraterona (inhibidor de CYP17A1), TAK-700 (orteronel, 6-(7-hidroxi-6,7-dihidro-5H-pirrolol[1,2-c]imidazol-7-il)-N-metilnaftaleno-2-carboxamida; inhibidor de CYP17A1) y TOK-001 (galeterona, inhibidor de CYP17A1). Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y deleción de *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) responderá a dichos inhibidores. Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no deleccionados), tal como una ausencia de reordenamientos del gen *ERG* y deleciones de *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) no responderá a los inhibidores de PARP.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento con radioterapia. Los ejemplos de radioterapia incluyen, pero no se limitan a: tratamiento con radiación con haz de electrones (EBRT), tratamiento con radiación conformal tridimensional (3D-CRT), radiación de intensidad modulada (IMRT), radioterapia con haz de protones y radioterapia ósea con radio 223. Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y deleción de *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) no responderá a la radioterapia. Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no deleccionados), tal como la presencia de genes *ERG* y *PTEN* normales, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) responderá a la radioterapia.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento con inmunoterapia. Los ejemplos de inmunoterapia incluyen, pero no se limitan a: ipilimumab (un anticuerpo CTLA-4) y sipuleucel-T. Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) no responderá a la inmunoterapia, tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y deleción de *PTEN*. Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no deleccionados), tal como la presencia de genes *ERG* y *PTEN* normales, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) responderá a la inmunoterapia.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento con quimioterapia. Los ejemplos de quimioterapia incluyen, pero no se limitan a: docetaxel y cabazitaxel. Si se delecionan uno o más genes *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) no responderá a la quimioterapia. Por el contrario, si los genes *ERG* se reordenan o son normales y/o los genes *PTEN* están inalterados (no delecionados), tal como la presencia de genes *ERG* y *PTEN* normales, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) responderá a la quimioterapia.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de que el cáncer de próstata responda a un tratamiento con un inhibidor de la vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/AKT. Los ejemplos de inhibidores de la vía PI3K/AKT incluyen, pero no se limitan a: XL147 (Exelixis), BEZ235 (Novartis), GDG0941 (Genentech), inhibidores del dominio catalítico de AKT selectivos a isoformas, inhibidores del dominio de PH, perifosina, G5K690693 (GlaxoSmithKline), MK2206 (Merck, Inc), PI-103, XL765 y BEZ-235. Si se delecionan uno o más genes *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) responderá a los inhibidores de la vía PI3K/AKT. Por el contrario, si los genes *PTEN* están inalterados (no delecionados), se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) no responderá a los inhibidores de la vía PI3K/AKT.

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de recidiva de la enfermedad. Recidiva significa que el cáncer de próstata ha regresado después de un tratamiento(s) inicial(es) (o posterior(es)), por ejemplo, recidiva en 1, 2, 3, 4 o 5 años tras el tratamiento). Los tratamientos iniciales representativos incluyen tratamiento con radiación, quimioterapia, tratamiento antihormonal, cirugía (por ejemplo, una prostatectomía), inmunoterapia, tratamiento focal, crioterapia y/o radioterapia. Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y delección de *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) probablemente recidivará después del tratamiento. Por tanto, por ejemplo, los procedimientos se pueden usar para predecir una probabilidad más alta de que fracase un tratamiento intensivo (por ejemplo, una prostatectomía) y una necesidad incrementada de un tratamiento no quirúrgico o alternativo para el cáncer de próstata. Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no delecionados), tal como la presencia de genes *ERG* y *PTEN* normales, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) probablemente no recidivará después del tratamiento. Típicamente, después de un tratamiento inicial del cáncer de próstata, los niveles de PSA en la sangre disminuyen a un nivel estable y bajo y, en algunos casos, con el tiempo se vuelven casi indetectables. En algunos ejemplos, la recidiva del cáncer de próstata se marca mediante niveles de PSA crecientes (por ejemplo, más de 2,0-2,5 ng/ml) y/o mediante la identificación de células de cáncer de próstata en la sangre, en una biopsia o aspirado de próstata, en los ganglios linfáticos (por ejemplo, en la pelvis o en otro lugar) o en un sitio metastásico (por ejemplo, los músculos que ayudan a controlar la micción, el recto, la pared pélvica, en los huesos u otros órganos). Los niveles de PSA en suero se pueden caracterizar como sigue (aunque algunas variaciones de los siguientes intervalos son comunes en la técnica):

|                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| Intervalo normal               | de 0 a 2,5 ng/ml   |
| Ligera a moderadamente elevado | de 2,6 a 10 ng/ml  |
| Moderadamente elevado          | de 10 a 19,9 ng/ml |
| Significativamente elevado     | 20 ng/ml o más     |

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad de progresión del cáncer de próstata, tal como metástasis. La progresión del cáncer de próstata significa que uno o más indicadores de cáncer de próstata (por ejemplo, niveles de PSA en suero) muestran que la enfermedad avanza independientemente del tratamiento. En algunos ejemplos, la progresión del cáncer de próstata se marca mediante niveles de PSA crecientes (por ejemplo, más de 2,0-2,5 ng/ml) y/o mediante la identificación de (o números en incremento de) células de cáncer de próstata en la sangre, en una biopsia o aspirado de próstata, en los ganglios linfáticos (por ejemplo, en la pelvis o en otro lugar) o en un sitio metastásico (por ejemplo, los músculos que ayudan a controlar la micción, el recto, la pared pélvica, en los huesos u otros órganos). Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y delección de *PTEN*, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) probablemente progresará o metastatizará. Se puede cuantificar una probabilidad incrementada de progresión del cáncer de próstata o recidiva del cáncer de próstata mediante cualquier parámetro conocido. Por ejemplo, una probabilidad incrementada puede significar al menos un 10 % de posibilidad de que se produzca (tal como al menos un 25 % de posibilidad, al menos un 50 % de posibilidad, al menos un 60 % de posibilidad, al menos un 75 % de posibilidad o incluso más de un 80 % de posibilidad de que se produzca). Una probabilidad incrementada de progresión del cáncer de próstata o recidiva del cáncer de próstata puede indicar la presencia de un cáncer de próstata de mayor malignidad, lo que puede indicar un peor pronóstico para el enfermo (por ejemplo, tiempo de supervivencia disminuido), una probabilidad incrementada de progresión de la enfermedad (por ejemplo, metástasis), fracaso (o inadecuación) del tratamiento y/o la necesidad de tratamientos alternativos (o adicionales). Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no delecionados), tal como la presencia de genes *ERG* y *PTEN* normales, se predice que el cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) probablemente no progresará o metastatizará. Se puede cuantificar una probabilidad disminuida de progresión del cáncer de próstata o recidiva del cáncer de próstata mediante cualquier parámetro conocido. Por ejemplo, una probabilidad disminuida puede significar menos de un 50 % de

posibilidad de que recidive (tal como menos de un 25 % de posibilidad, menos de un 20 % de posibilidad, menos de un 10 % de posibilidad, menos de un 5 % de posibilidad o incluso menos de un 1 % de posibilidad de que recidive). Esto puede indicar la presencia de un cáncer de próstata de menor malignidad o sin malignidad, lo que puede indicar un mejor pronóstico para el enfermo (por ejemplo, tiempo de supervivencia incrementado), una probabilidad disminuida de progresión de la enfermedad (por ejemplo, metástasis), éxito del tratamiento y/o la necesidad de tratamientos menos intensivos (o incluso inexistentes).

En un ejemplo, el procedimiento incluye predecir la probabilidad del tiempo de supervivencia. Si se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*, tal como la presencia de reordenamiento del gen *ERG* y delección de *PTEN*, se predice que el enfermo con cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) tendrá un tiempo de supervivencia más corto (tal como menos de 5 años, menos de 4 años, menos de 3 años, menos de 2 años o menos de 1 año) y, por tanto, un mal pronóstico. Un mal (o peor) pronóstico es probable para un sujeto con un cáncer de mayor malignidad. En algunos modos de realización del procedimiento, un mal pronóstico es una supervivencia menor a 5 años (tal como una supervivencia menor a 1 año o una supervivencia menor a 2 años) del enfermo después del diagnóstico inicial de cáncer de próstata. Por el contrario, si los genes *ERG* son normales (por ejemplo, no reordenados) y/o los genes *PTEN* están inalterados (no delecionados) (tal como que ambos genes *ERG* son normales y ambos genes *PTEN* están inalterados), se predice que el enfermo con cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm) tendrá un tiempo de supervivencia más largo (tal como al menos 5 años, al menos 6 años, al menos 7 años, al menos 8 años, al menos 9 años o al menos 10 años), y, por tanto, un buen pronóstico. En algunos modos de realización del procedimiento, un buen pronóstico es una supervivencia mayor a 2 años (tal como una supervivencia mayor a 3 años, una supervivencia mayor a 5 años o una supervivencia mayor a 7 años) del enfermo después del diagnóstico inicial de cáncer de próstata.

En algunos ejemplos, los procedimientos divulgados se pueden usar para identificar aquellos sujetos que se beneficiarán de un tratamiento más o menos intensivo. Por ejemplo, si a un enfermo se le diagnostica o pronostica una forma de cáncer de próstata de gran malignidad (se reordenan uno o más genes *ERG* y/o se delecionan uno o más genes *PTEN*), se puede seleccionar al enfermo para un tratamiento más intensivo y un seguimiento frecuente. Por el contrario, si a un enfermo se le diagnostica o pronostica una forma de cáncer de próstata de menor malignidad (los genes *ERG* y *PTEN* son normales), se puede seleccionar al enfermo para un tratamiento menos intensivo y/o un seguimiento menos frecuente. Por ejemplo, dichos procedimientos de diagnóstico o pronóstico se pueden realizar antes de que el sujeto se someta al tratamiento. En otros ejemplos, se utilizan estos procedimientos para predecir la supervivencia del sujeto o la eficacia de un tratamiento dado, o combinaciones de los mismos. Por tanto, los procedimientos de la presente divulgación son herramientas valiosas para los médicos en ejercicio para tomar decisiones sobre el tratamiento rápidas relativas a cómo tratar el cáncer de próstata, tal como CPRC o CPRCm. Estas decisiones sobre el tratamiento pueden incluir la administración de un agente para tratar el cáncer de próstata y las decisiones para realizar un seguimiento de un sujeto para detectar la recidiva o metástasis de un cáncer de próstata.

#### **M. Uso en combinación con otros ensayos de diagnóstico y pronóstico**

Los procedimientos divulgados se pueden usar en combinación con uno o más de otros ensayos que se usan para diagnosticar o pronosticar los desenlaces clínicos para el cáncer de próstata. Por ejemplo, se pueden usar las puntuaciones de Gleason de un enfermo de cáncer de próstata basadas en una revisión histopatológica, puntuaciones según PSA y nomogramas (tales como las tablas de coeficientes de Partin) en combinación con los procedimientos divulgados para permitir capacidades potenciadas de diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata, tales como los que han metastatizado.

Por ejemplo, se pueden usar nomogramas para el cáncer de próstata para predecir la probabilidad de que el cáncer de un enfermo recidive (por ejemplo, después de una prostatectomía radical), es decir, la probabilidad de que en dos, cinco, siete y 10 años el nivel de PSA en suero del enfermo se vuelva detectable y comience a elevarse constantemente. Los nomogramas incluyen información sobre uno o más de los PSA previos al tratamiento del enfermo, edad, grado de Gleason (primario, secundario y total), año de la prostatectomía, meses sin cáncer, si los márgenes quirúrgicos fueron o no positivos, si hubo o no extensión capsular adicional (penetración); si hubo o no afectación de la vesícula seminal, si hubo o no afectación de los ganglios linfáticos, si el enfermo recibe o no hormonas prequirúrgicas y si el enfermo recibe o no tratamiento con radiación antes de la prostatectomía radical. Por tanto, se pueden incorporar el estado de reordenamiento de *ERG* y delección de *PTEN* del enfermo a los nomogramas disponibles actualmente para incrementar aún más la precisión de dichas predicciones.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas características y/o modos de realización particulares. Estos ejemplos no se deben interpretar como que limitan una invención divulgada a las características o modos de realización particulares descritos.

#### **Ejemplos**

##### **Ejemplo 1: Detección de *ERG* y *PTEN* en líneas de células de cáncer de próstata**

Este ejemplo describe procedimientos usados para mostrar que se pueden detectar el reordenamiento del gen *ERG* y las deleciones del gen *PTEN* en líneas de células de cáncer de próstata cuando las células se aplican a un portaobjetos de vidrio y se marcan con anticuerpos y sondas para imitar cómo se procesarían las células tumorales circulantes.

5 Se aplicaron líneas de células de cáncer de próstata (LNCaP y VCaP) sobre un portaobjetos de vidrio usando citocentrifugación. En resumen, se usó una Shandon Cytospin 4 (Shandon Thermo Scientific) con ajuste a 400 rpm/4 min. Se ensambló un megaembudo EZ (Shandon Thermo Scientific) o bien un embudo biselado de Shandon (individual) con portaobjetos de vidrio cargados de manera positiva y se pipetearon 1 ml o 200 µl de  
10 suspensión de células en los embudos, respectivamente. Después de que se completara el ciclo de citoespín establecido, se retiraron los portaobjetos y se secaron al aire durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se fijaron en FTN al 10 % a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido de aclaramiento en solución salina tamponada con fosfato (PBS). A continuación, se sumergieron los portaobjetos en PBST (Tween 20 al 0,2 % en PBS) para su permeabilización, se aclararon en agua desionizada y se deshidrataron  
15 en series de contenido de alcohol ascendente (EtOH al 80 %, 90 % y abs.), seguido de secado al aire. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso en cajas herméticas.

A continuación, se tiñeron las CTC montadas y fijadas utilizando la plataforma de tinción automatizada BenchMark (Ventana) con pancitoqueratina (CQ) (anti-AE1 y AE3, marcados con un punto cuántico que emite a 605 nm), CD45  
20 (marcado con un punto cuántico que emite a 705 nm) y anticuerpos para el receptor androgénico (RA) a través de IHQ fluorescente o con puntos cuánticos. Estas tinciones IHQ se usan para identificar las células tumorales circulantes (CTC). Las células CTC tienen tinción positiva para CQ, tinción negativa para CD45, localización de RA (en células CTC de cánceres de próstata sensibles a andrógenos el RA está en el núcleo; en las células CTC de cánceres de próstata no sensibles a andrógenos el RA está en el citoplasma) y sobreexpresión de proteínas RA.  
25 Usando estas tinciones IHQ, se puede registrar y utilizar una identificación manual o por programas informáticos de las CTC para las tinciones posteriores. Como se muestra en la FIG. 1, las células LNCaP fueron positivas para CQ, pero negativas para CD45.

Después de que se identificara esta localización, se realizó una FISH múltiple con puntos cuánticos mediante  
30 hibridación de las sondas para *ERG* en extremo 5', para *ERG* en extremo 3', para *PTEN* y para CEN-10 con respecto a las líneas de células de cáncer de próstata, con la detección asociada a puntos cuánticos. El ensayo de FISH múltiple incluye la hibridación de las sondas al ADN diana y la detección de los híbridos. Estas etapas también se realizaron en la plataforma de tinción automatizada (serie BenchMark). Las muestras se desnaturalizaron junto con las sondas a 80 °C y se hibridaron a 44 °C durante 6-8 horas. Los lavados posteriores a la hibridación se  
35 completaron a 68-74 °C. La detección de los híbridos se realizó con puntos cuánticos. Las señales de IHQ y FISH se visualizaron utilizando imágenes espectrales (Ventana).

Se demostró que en estas líneas de células se observó un reordenamiento del gen *ERG* con un estado de *PTEN* normal (VCaP) o bien un estado del gen *ERG* normal con una deleción de *PTEN* (LNCaP).

#### 40 **Ejemplo 2: Detección de reordenamiento de *ERG* y deleción de *PTEN* en células tumorales circulantes (CTC)**

Este ejemplo describe los procedimientos usados para demostrar que los reordenamientos del gen *ERG* y deleciones del gen *PTEN* se pudieron detectar en las CTC de enfermos de CPRCm.

45 Se aislaron las CTC de muestras de sangre entera de enfermos de CPRCm usando el kit Profile del sistema CellSearch™ (Veridex). Las CTC aisladas se transfirieron a portaobjetos de vidrio, se fijaron en FTN, se trataron con proteasa, esencialmente como se describe en el ejemplo 1. Las CTC se hibridaron a sondas que utilizaban la plataforma de tinción automatizada BenchMark (Ventana) con FISH múltiple con puntos cuánticos, incluidas sondas  
50 para *ERG* en extremo 5', para *ERG* en extremo 3', para *PTEN* y para CEN-10 (marcadas con puntos cuánticos que emiten a 655 nm, 565 nm, 605 nm y 585 nm, respectivamente) como se describe en el ejemplo 1. Las células también se tiñeron con DAPI. Las señales de FISH se visualizaron utilizando imágenes espectrales (Ventana) como se describe en el ejemplo 1, por ejemplo, como se muestra en las FIGS. 2 y 3.

55 A medida que se aprueban más productos terapéuticos para su uso en enfermos de CPRCm, la capacidad para caracterizar molecularmente el tipo de CTC que accionan la masa tumoral desempeñará un papel significativo en la optimización del abordaje del enfermo determinando el tipo y la secuencia de futuros tratamientos dirigidos. En el presente documento se muestra por primera vez un procedimiento para caracterizar molecularmente las CTC de enfermos en una plataforma automatizada que es tributaria de uso clínico estándar.

#### 60 **Ejemplo 3: Hibridación *in situ* para detectar el estado de los genes *ERG* y *PTEN***

Este ejemplo proporciona procedimientos ejemplares que se pueden usar para detectar reordenamientos del gen *ERG* y deleciones del gen *PTEN* usando hibridación *in situ*, tal como FISH. Aunque se proporcionan materiales y  
65 procedimientos particulares, un experto en la técnica apreciará que se pueden hacer variaciones.

Las CTC (por ejemplo, aisladas de la sangre de enfermos con cáncer de próstata (tal como CPRC o CPRCm), se aíslan y montan sobre un portaobjetos, en condiciones que permiten la detección de moléculas de ácido nucleico presentes en la muestra. En algunos ejemplos, las células se fijan. En un ejemplo, se puede detectar ADN genómico en la muestra.

- 5 El portaobjetos se incuba con sondas de ácido nucleico que tienen suficiente complementariedad para hibridarse con ADN genómico en las CTC en condiciones de rigurosidad alta o muy alta. Las sondas pueden ser ARN o ADN. Las sondas separadas que son específicas para ADN genómico de *ERG* y *PTEN* (por ejemplo, secuencias humanas), así como para CEN-10, se incuban con la muestra de manera simultánea o secuencial. Por ejemplo, cada sonda puede incluir un punto cuántico diferente para permitir la diferenciación entre las sondas. Después de  
10 poner en contacto las sondas con las CTC en condiciones que permitan la hibridación de la sonda a su diana génica, se elimina la sonda no hibridada (por ejemplo, se elimina por lavado) y se detecta la señal restante, por ejemplo, usando adquisición espectral. En algunos ejemplos, la señal se cuantifica.
- 15 En algunos ejemplos, antes de la incubación con las sondas para *ERG*, *PTEN* y CEN-10, las CTC se incuban con anticuerpos específicos para CQ y CD45, para garantizar que las CTC analizadas sean CQ+ y CD45-. Solo se analizan las CTC que son CQ+ y CD45-.
- 20 Se detectan las señales de hibridación resultantes para CEN-10, *ERG* y *PTEN*. Si se detecta CEN-10, el análisis prosigue. Si no se detecta ninguna señal para CEN-10, se descarta la muestra. Si se detecta CEN-10, se realiza una determinación sobre si se reordena *ERG* y/o se deleciona *PTEN*. La delección de *PTEN* se confirma si no se detecta la señal de la sonda para *PTEN*. Es posible que una única CTC pueda tener un gen *PTEN* inalterado (señal detectada) y otro gen *PTEN* delecionado (señal ausente). Para *ERG*, hay cuatro acontecimientos posibles, suponiendo que se usen una sonda en extremo 5' (por ejemplo, en verde) y una sonda en extremo 3' (por ejemplo, en rojo): 1) dos señales roja y verde colocalizadas es un *ERG* normal, (2) una colocalización más una división de  
25 rojo y verde es un reordenamiento de *ERG* a través de inserción, (3) una colocalización más una señal roja (sin verde) es un reordenamiento de *ERG* a través de delección en 5' y (4) una colocalización y múltiples señales rojas es una delección y amplificación de *ERG*.
- 30 En vista de los muchos modos de realización posibles a los que se pueden aplicar los principios de la divulgación, se debe reconocer que los modos de realización ilustrados son solamente ejemplos de la divulgación y no se deben tomar como limitantes del alcance de la invención. En cambio, el alcance de la divulgación se define mediante las siguientes reivindicaciones.

## LISTADO DE SECUENCIAS

|    |                                                                 |                                                        |  |
|----|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--|
|    | <110>                                                           | Ventana Medical Systems, Inc.                          |  |
| 5  | <120>                                                           | ANÁLISIS AUTOMATIZADO DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES |  |
|    | <130>                                                           | 7668-88299-03                                          |  |
|    | <150>                                                           | 61/581.825                                             |  |
| 10 | <151>                                                           | 30-12-2011                                             |  |
|    | <160>                                                           | 5                                                      |  |
|    | <170>                                                           | PatentIn versión 3.5                                   |  |
| 15 | <210>                                                           | 1                                                      |  |
|    | <211>                                                           | 1461                                                   |  |
|    | <212>                                                           | ADN                                                    |  |
|    | <213>                                                           | Homo sapiens                                           |  |
| 20 | <220>                                                           |                                                        |  |
|    | <221>                                                           | CDS                                                    |  |
|    | <222>                                                           | (1)..(1461)                                            |  |
| 25 | <400>                                                           | 1                                                      |  |
|    | atg att cag act gtc ccg gac cca gca gct cat atc aag gaa gcc tta | 48                                                     |  |
|    | Met Ile Gln Thr Val Pro Asp Pro Ala Ala His Ile Lys Glu Ala Leu |                                                        |  |
|    | 1 5 10 15                                                       |                                                        |  |
|    | tca gtt gtg agt gag gac cag tcg ttg ttt gag tgt gcc tac gga acg | 96                                                     |  |
|    | Ser Val Val Ser Glu Asp Gln Ser Leu Phe Glu Cys Ala Tyr Gly Thr |                                                        |  |
|    | 20 25 30                                                        |                                                        |  |
|    | cca cac ctg gct aag aca gag atg acc gcg tcc tcc tcc agc gac tat | 144                                                    |  |
|    | Pro His Leu Ala Lys Thr Glu Met Thr Ala Ser Ser Ser Ser Asp Tyr |                                                        |  |
|    | 35 40 45                                                        |                                                        |  |
|    | gga cag act tcc aag atg agc cca cgc gtc cct cag cag gat tgg ctg | 192                                                    |  |
|    | Gly Gln Thr Ser Lys Met Ser Pro Arg Val Pro Gln Gln Asp Trp Leu |                                                        |  |
|    | 50 55 60                                                        |                                                        |  |
|    | tct caa ccc cca gcc agg gtc acc atc aaa atg gaa tgt aac cct agc | 240                                                    |  |
|    | Ser Gln Pro Pro Ala Arg Val Thr Ile Lys Met Glu Cys Asn Pro Ser |                                                        |  |
|    | 65 70 75 80                                                     |                                                        |  |
|    | cag gtg aat ggc tca agg aac tct cct gat gaa tgc agt gtg gcc aaa | 288                                                    |  |
|    | Gln Val Asn Gly Ser Arg Asn Ser Pro Asp Glu Cys Ser Val Ala Lys |                                                        |  |
|    | 85 90 95                                                        |                                                        |  |
|    | ggc ggg aag atg gtg ggc agc cca gac acc gtt ggg atg aac tac ggc | 336                                                    |  |
|    | Gly Gly Lys Met Val Gly Ser Pro Asp Thr Val Gly Met Asn Tyr Gly |                                                        |  |
|    | 100 105 110                                                     |                                                        |  |
|    | agc tac atg gag gag aag cac atg cca ccc cca aac atg acc acg aac | 384                                                    |  |
|    | Ser Tyr Met Glu Glu Lys His Met Pro Pro Pro Asn Met Thr Thr Asn |                                                        |  |
|    | 115 120 125                                                     |                                                        |  |
|    | gag cgc aga gtt atc gtg cca gca gat cct acg cta tgg agt aca gac | 432                                                    |  |
|    | Glu Arg Arg Val Ile Val Pro Ala Asp Pro Thr Leu Trp Ser Thr Asp |                                                        |  |
|    | 130 135 140                                                     |                                                        |  |
|    | cat gtg cgg cag tgg ctg gag tgg gcg gtg aaa gaa tat ggc ctt cca | 480                                                    |  |

# ES 2 695 101 T3

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| His<br>145 | Val        | Arg        | Gln        | Trp        | Leu<br>150 | Glu        | Trp        | Ala        | Val        | Lys<br>155 | Glu        | Tyr        | Gly        | Leu        | Pro<br>160 |      |
| gac<br>Asp | gtc<br>Val | aac<br>Asn | atc<br>Ile | ttg<br>Leu | tta<br>Leu | ttc<br>Phe | cag<br>Gln | aac<br>Asn | atc<br>Ile | gat<br>Asp | ggg<br>Gly | aag<br>Lys | gaa<br>Glu | ctg<br>Leu | tgc<br>Cys | 528  |
| aag<br>Lys | atg<br>Met | acc<br>Thr | aag<br>Lys | gac<br>Asp | gac<br>Asp | ttc<br>Phe | cag<br>Gln | agg<br>Arg | ctc<br>Leu | acc<br>Thr | ccc<br>Pro | agc<br>Ser | tac<br>Tyr | aac<br>Asn | gcc<br>Ala | 576  |
| gac<br>Asp | atc<br>Ile | ctt<br>Leu | ctc<br>Leu | tca<br>Ser | cat<br>His | ctc<br>Leu | cac<br>His | tac<br>Tyr | ctc<br>Leu | aga<br>Arg | gag<br>Glu | act<br>Thr | cct<br>Pro | ctt<br>Leu | cca<br>Pro | 624  |
| cat<br>His | ttg<br>Leu | act<br>Thr | tca<br>Ser | gat<br>Asp | gat<br>Asp | gtt<br>Val | gat<br>Asp | aaa<br>Lys | gcc<br>Ala | tta<br>Leu | caa<br>Gln | aac<br>Asn | tct<br>Ser | cca<br>Pro | cgg<br>Arg | 672  |
| tta<br>Leu | atg<br>Met | cat<br>His | gct<br>Ala | aga<br>Arg | aac<br>Asn | aca<br>Thr | ggg<br>Gly | ggt<br>Gly | gca<br>Ala | gct<br>Ala | ttt<br>Phe | att<br>Ile | ttc<br>Phe | cca<br>Pro | aat<br>Asn | 720  |
| act<br>Thr | tca<br>Ser | gta<br>Val | tat<br>Tyr | cct<br>Pro | gaa<br>Glu | gct<br>Ala | acg<br>Thr | caa<br>Gln | aga<br>Arg | att<br>Ile | aca<br>Thr | act<br>Thr | agg<br>Arg | cca<br>Pro | gat<br>Asp | 768  |
| tta<br>Leu | cca<br>Pro | tat<br>Tyr | gag<br>Glu | ccc<br>Pro | ccc<br>Pro | agg<br>Arg | aga<br>Arg | tca<br>Ser | gcc<br>Ala | tgg<br>Trp | acc<br>Thr | ggt<br>Gly | cac<br>His | ggc<br>Gly | cac<br>His | 816  |
| ccc<br>Pro | acg<br>Thr | ccc<br>Pro | cag<br>Gln | tcg<br>Ser | aaa<br>Lys | gct<br>Ala | gct<br>Ala | caa<br>Gln | cca<br>Pro | tct<br>Ser | cct<br>Pro | tcc<br>Ser | aca<br>Thr | gtg<br>Val | ccc<br>Pro | 864  |
| aaa<br>Lys | act<br>Thr | gaa<br>Glu | gac<br>Asp | cag<br>Gln | cgt<br>Arg | cct<br>Pro | cag<br>Gln | tta<br>Leu | gat<br>Asp | cct<br>Pro | tat<br>Tyr | cag<br>Gln | att<br>Ile | ctt<br>Leu | gga<br>Gly | 912  |
| cca<br>Pro | aca<br>Thr | agt<br>Ser | agc<br>Ser | cgc<br>Arg | ctt<br>Leu | gca<br>Ala | aat<br>Asn | cca<br>Pro | ggc<br>Gly | agt<br>Ser | ggc<br>Gly | cag<br>Gln | atc<br>Ile | cag<br>Gln | ctt<br>Leu | 960  |
| tgg<br>Trp | cag<br>Gln | ttc<br>Phe | ctc<br>Leu | ctg<br>Leu | gag<br>Glu | ctc<br>Leu | ctg<br>Leu | tcg<br>Ser | gac<br>Asp | agc<br>Ser | tcc<br>Ser | aac<br>Asn | tcc<br>Ser | agc<br>Ser | tgc<br>Cys | 1008 |
| atc<br>Ile | acc<br>Thr | tgg<br>Trp | gaa<br>Glu | ggc<br>Gly | acc<br>Thr | aac<br>Asn | ggg<br>Gly | gag<br>Glu | ttc<br>Phe | aag<br>Lys | atg<br>Met | acg<br>Thr | gat<br>Asp | ccc<br>Pro | gac<br>Asp | 1056 |
| gag<br>Glu | gtg<br>Val | gcc<br>Ala | cgg<br>Arg | cgc<br>Arg | tgg<br>Trp | gga<br>Gly | gag<br>Glu | cgg<br>Arg | aag<br>Lys | agc<br>Ser | aaa<br>Lys | ccc<br>Pro | aac<br>Asn | atg<br>Met | aac<br>Asn | 1104 |
| tac<br>Tyr | gat<br>Asp | aag<br>Lys | ctc<br>Leu | agc<br>Ser | cgc<br>Arg | gcc<br>Ala | ctc<br>Leu | cgt<br>Arg | tac<br>Tyr | tac<br>Tyr | tat<br>Tyr | gac<br>Asp | aag<br>Lys | aac<br>Asn | atc<br>Ile | 1152 |
| atg<br>Met | acc<br>Thr | aag<br>Lys | gtc<br>Val | cat<br>His | ggg<br>Gly | aag<br>Lys | cgc<br>Arg | tac<br>Tyr | gcc<br>Ala | tac<br>Tyr | aag<br>Lys | ttc<br>Phe | gac<br>Asp | ttc<br>Phe | cac<br>His | 1200 |

# ES 2 695 101 T3

```

ggg atc gcc cag gcc ctc cag ccc cac ccc ccg gag tca tct ctg tac      1248
Gly Ile Ala Gln Ala Leu Gln Pro His Pro Pro Glu Ser Ser Leu Tyr
                        405                        410                        415

aag tac ccc tca gac ctc ccg tac atg ggc tcc tat cac gcc cac cca      1296
Lys Tyr Pro Ser Asp Leu Pro Tyr Met Gly Ser Tyr His Ala His Pro
                        420                        425                        430

cag aag atg aac ttt gtg gcg ccc cac cct cca gcc ctc ccc gtg aca      1344
Gln Lys Met Asn Phe Val Ala Pro His Pro Pro Ala Leu Pro Val Thr
                        435                        440                        445

tct tcc agt ttt ttt gct gcc cca aac cca tac tgg aat tca cca act      1392
Ser Ser Ser Phe Phe Ala Ala Pro Asn Pro Tyr Trp Asn Ser Pro Thr
                        450                        455                        460

ggg ggt ata tac ccc aac act agg ctc ccc acc agc cat atg cct tct      1440
Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Thr Arg Leu Pro Thr Ser His Met Pro Ser
465                        470                        475                        480

cat ctg ggc act tac tac taa      1461
His Leu Gly Thr Tyr Tyr
                        485

```

<210> 2  
 <211> 486  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ile Gln Thr Val Pro Asp Pro Ala Ala His Ile Lys Glu Ala Leu
1                        5                        10                        15

Ser Val Val Ser Glu Asp Gln Ser Leu Phe Glu Cys Ala Tyr Gly Thr
                20                        25                        30

Pro His Leu Ala Lys Thr Glu Met Thr Ala Ser Ser Ser Ser Asp Tyr
                35                        40                        45

Gly Gln Thr Ser Lys Met Ser Pro Arg Val Pro Gln Gln Asp Trp Leu
50                        55                        60

Ser Gln Pro Pro Ala Arg Val Thr Ile Lys Met Glu Cys Asn Pro Ser
65                        70                        75                        80

Gln Val Asn Gly Ser Arg Asn Ser Pro Asp Glu Cys Ser Val Ala Lys
                        85                        90                        95

Gly Gly Lys Met Val Gly Ser Pro Asp Thr Val Gly Met Asn Tyr Gly
100                        105                        110

Ser Tyr Met Glu Glu Lys His Met Pro Pro Pro Asn Met Thr Thr Asn
115                        120                        125

```

# ES 2 695 101 T3

Glu Arg Arg Val Ile Val Pro Ala Asp Pro Thr Leu Trp Ser Thr Asp  
 130 135 140

His Val Arg Gln Trp Leu Glu Trp Ala Val Lys Glu Tyr Gly Leu Pro  
 145 150 155 160

Asp Val Asn Ile Leu Leu Phe Gln Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Cys  
 165 170 175

Lys Met Thr Lys Asp Asp Phe Gln Arg Leu Thr Pro Ser Tyr Asn Ala  
 180 185 190

Asp Ile Leu Leu Ser His Leu His Tyr Leu Arg Glu Thr Pro Leu Pro  
 195 200 205

His Leu Thr Ser Asp Asp Val Asp Lys Ala Leu Gln Asn Ser Pro Arg  
 210 215 220

Leu Met His Ala Arg Asn Thr Gly Gly Ala Ala Phe Ile Phe Pro Asn  
 225 230 235 240

Thr Ser Val Tyr Pro Glu Ala Thr Gln Arg Ile Thr Thr Arg Pro Asp  
 245 250 255

Leu Pro Tyr Glu Pro Pro Arg Arg Ser Ala Trp Thr Gly His Gly His  
 260 265 270

Pro Thr Pro Gln Ser Lys Ala Ala Gln Pro Ser Pro Ser Thr Val Pro  
 275 280 285

Lys Thr Glu Asp Gln Arg Pro Gln Leu Asp Pro Tyr Gln Ile Leu Gly  
 290 295 300

Pro Thr Ser Ser Arg Leu Ala Asn Pro Gly Ser Gly Gln Ile Gln Leu  
 305 310 315 320

Trp Gln Phe Leu Leu Glu Leu Leu Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Cys  
 325 330 335

Ile Thr Trp Glu Gly Thr Asn Gly Glu Phe Lys Met Thr Asp Pro Asp  
 340 345 350

Glu Val Ala Arg Arg Trp Gly Glu Arg Lys Ser Lys Pro Asn Met Asn  
 355 360 365

Tyr Asp Lys Leu Ser Arg Ala Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Lys Asn Ile  
 370 375 380

# ES 2 695 101 T3

Met Thr Lys Val His Gly Lys Arg Tyr Ala Tyr Lys Phe Asp Phe His  
385 390 395 400

Gly Ile Ala Gln Ala Leu Gln Pro His Pro Pro Glu Ser Ser Leu Tyr  
405 410 415

Lys Tyr Pro Ser Asp Leu Pro Tyr Met Gly Ser Tyr His Ala His Pro  
420 425 430

Gln Lys Met Asn Phe Val Ala Pro His Pro Pro Ala Leu Pro Val Thr  
435 440 445

Ser Ser Ser Phe Phe Ala Ala Pro Asn Pro Tyr Trp Asn Ser Pro Thr  
450 455 460

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Thr Arg Leu Pro Thr Ser His Met Pro Ser  
465 470 475 480

His Leu Gly Thr Tyr Tyr  
485

<210> 3  
<211> 1212  
5 <212> ADN  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
10 <222> (1)..(1212)

<400> 3  
atg aca gcc atc atc aaa gag atc gtt agc aga aac aaa agg aga tat 48  
Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr  
1 5 10 15  
caa gag gat gga ttc gac tta gac ttg acc tat att tat cca aac att 96  
Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile  
20 25 30  
att gct atg gga ttt cct gca gaa aga ctt gaa ggc gta tac agg aac 144  
Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn  
35 40 45  
aat att gat gat gta gta agg ttt ttg gat tca aag cat aaa aac cat 192  
Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His  
50 55 60  
tac aag ata tac aat ctt tgt gct gaa aga cat tat gac acc gcc aaa 240  
Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys  
65 70 75 80  
ttt aat tgc aga gtt gca caa tat cct ttt gaa gac cat aac cca cca 288  
Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro

ES 2 695 101 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|--|--|
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |      |  |  |  |
| cag | cta | gaa | ctt | atc | aaa | ccc | ttt | tgt | gaa | gat | ctt | gac | caa | tgg | cta | 336  |  |  |  |
| Gln | Leu | Glu | Leu | Ile | Lys | Pro | Phe | Cys | Glu | Asp | Leu | Asp | Gln | Trp | Leu |      |  |  |  |
| 100 |     |     |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |      |  |  |  |
| agt | gaa | gat | gac | aat | cat | gtt | gca | gca | att | cac | tgt | aaa | gct | gga | aag | 384  |  |  |  |
| Ser | Glu | Asp | Asp | Asn | His | Val | Ala | Ala | Ile | His | Cys | Lys | Ala | Gly | Lys |      |  |  |  |
| 115 |     |     |     |     |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |      |  |  |  |
| gga | cga | act | ggt | gta | atg | ata | tgt | gca | tat | tta | tta | cat | cgg | ggc | aaa | 432  |  |  |  |
| Gly | Arg | Thr | Gly | Val | Met | Ile | Cys | Ala | Tyr | Leu | Leu | His | Arg | Gly | Lys |      |  |  |  |
| 130 |     |     |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |      |  |  |  |
| ttt | tta | aag | gca | caa | gag | gcc | cta | gat | ttc | tat | ggg | gaa | gta | agg | acc | 480  |  |  |  |
| Phe | Leu | Lys | Ala | Gln | Glu | Ala | Leu | Asp | Phe | Tyr | Gly | Glu | Val | Arg | Thr |      |  |  |  |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160  |  |  |  |
| aga | gac | aaa | aag | gga | gta | act | att | ccc | agt | cag | agg | cgc | tat | gtg | tat | 528  |  |  |  |
| Arg | Asp | Lys | Lys | Gly | Val | Thr | Ile | Pro | Ser | Gln | Arg | Arg | Tyr | Val | Tyr |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |     |     | 175  |  |  |  |
| tat | tat | agc | tac | ctg | tta | aag | aat | cat | ctg | gat | tat | aga | cca | gtg | gca | 576  |  |  |  |
| Tyr | Tyr | Ser | Tyr | Leu | Leu | Lys | Asn | His | Leu | Asp | Tyr | Arg | Pro | Val | Ala |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |      |  |  |  |
| ctg | ttg | ttt | cac | aag | atg | atg | ttt | gaa | act | att | cca | atg | ttc | agt | ggc | 624  |  |  |  |
| Leu | Leu | Phe | His | Lys | Met | Met | Phe | Glu | Thr | Ile | Pro | Met | Phe | Ser | Gly |      |  |  |  |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |      |  |  |  |
| gga | act | tgc | aat | cct | cag | ttt | gtg | gtc | tgc | cag | cta | aag | gtg | aag | ata | 672  |  |  |  |
| Gly | Thr | Cys | Asn | Pro | Gln | Phe | Val | Val | Cys | Gln | Leu | Lys | Val | Lys | Ile |      |  |  |  |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     | 220 |     |     |     |      |  |  |  |
| tat | tcc | tcc | aat | tca | gga | ccc | aca | cga | cgg | gaa | gac | aag | ttc | atg | tac | 720  |  |  |  |
| Tyr | Ser | Ser | Asn | Ser | Gly | Pro | Thr | Arg | Arg | Glu | Asp | Lys | Phe | Met | Tyr |      |  |  |  |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240  |  |  |  |
| ttt | gag | ttc | cct | cag | ccg | tta | cct | gtg | tgt | ggt | gat | atc | aaa | gta | gag | 768  |  |  |  |
| Phe | Glu | Phe | Pro | Gln | Pro | Leu | Pro | Val | Cys | Gly | Asp | Ile | Lys | Val | Glu |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     |     |     |     | 255  |  |  |  |
| ttc | ttc | cac | aaa | cag | aac | aag | atg | cta | aaa | aag | gac | aaa | atg | ttt | cac | 816  |  |  |  |
| Phe | Phe | His | Lys | Gln | Asn | Lys | Met | Leu | Lys | Lys | Asp | Lys | Met | Phe | His |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     |     |     |     | 270  |  |  |  |
| ttt | tgg | gta | aat | aca | ttc | ttc | ata | cca | gga | cca | gag | gaa | acc | tca | gaa | 864  |  |  |  |
| Phe | Trp | Val | Asn | Thr | Phe | Phe | Ile | Pro | Gly | Pro | Glu | Glu | Thr | Ser | Glu |      |  |  |  |
| 275 |     |     |     |     |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |      |  |  |  |
| aaa | gta | gaa | aat | gga | agt | cta | tgt | gat | caa | gaa | atc | gat | agc | att | tgc | 912  |  |  |  |
| Lys | Val | Glu | Asn | Gly | Ser | Leu | Cys | Asp | Gln | Glu | Ile | Asp | Ser | Ile | Cys |      |  |  |  |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     |     |     |     | 300 |     |     |     |      |  |  |  |
| agt | ata | gag | cgt | gca | gat | aat | gac | aag | gaa | tat | cta | gta | ctt | act | tta | 960  |  |  |  |
| Ser | Ile | Glu | Arg | Ala | Asp | Asn | Asp | Lys | Glu | Tyr | Leu | Val | Leu | Thr | Leu |      |  |  |  |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     | 320  |  |  |  |
| aca | aaa | aat | gat | ctt | gac | aaa | gca | aat | aaa | gac | aaa | gcc | aac | cga | tac | 1008 |  |  |  |
| Thr | Lys | Asn | Asp | Leu | Asp | Lys | Ala | Asn | Lys | Asp | Lys | Ala | Asn | Arg | Tyr |      |  |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     |     |     | 335  |  |  |  |
| ttt | tct | cca | aat | ttt | aag | gtg | aag | ctg | tac | ttc | aca | aaa | aca | gta | gag | 1056 |  |  |  |

# ES 2 695 101 T3

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| gag ccg tca aat cca gag gct agc agt tca act tct gta aca cca gat | 1104 |
| Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| gtt agt gac aat gaa cct gat cat tat aga tat tct gac acc act gac | 1152 |
| Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| tct gat cca gag aat gaa cct ttt gat gaa gat cag cat aca caa att | 1200 |
| Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile |      |
| 385 390 395 400                                                 |      |
| aca aaa gtc tga                                                 | 1212 |
| Thr Lys Val                                                     |      |

<210> 4  
 <211> 403  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr |
| 1 5 10 15                                                       |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile |
| 20 25 30                                                        |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn |
| 35 40 45                                                        |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His |
| 50 55 60                                                        |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys |
| 65 70 75 80                                                     |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro |
| 85 90 95                                                        |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu |
| 100 105 110                                                     |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys |
| 115 120 125                                                     |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys |
| 130 135 140                                                     |

10

# ES 2 695 101 T3

Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr  
 145 150 155 160  
 Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala  
 180 185 190  
 Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly  
 195 200 205  
 Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile  
 210 215 220  
 Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu  
 245 250 255  
 Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His  
 260 265 270  
 Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu  
 275 280 285  
 Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys  
 290 295 300  
 Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu  
 305 310 315 320  
 Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr  
 325 330 335  
 Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu  
 340 345 350  
 Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp  
 355 360 365  
 Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp  
 370 375 380  
 Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile  
 385 390 395 400

# ES 2 695 101 T3

## Thr Lys Val

|    |            |                          |                                                    |
|----|------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
|    | <210>      | 5                        |                                                    |
|    | <211>      | 1365                     |                                                    |
|    | <212>      | ADN                      |                                                    |
| 5  | <213>      | Secuencia artificial     |                                                    |
|    | <220>      |                          |                                                    |
|    | <223>      | sonda para centrómero 10 |                                                    |
| 10 | <400>      | 5                        |                                                    |
|    | cgacttttaa | tatgaagata               | tttccatgtc taagattggc gtcaaatcgc ttgaaatctc 60     |
|    | cacttgcaaa | ttccacaaaa               | agtgtttttc aaaactgctc tgaataaagg aaggttccac 120    |
|    | tctgtgagtt | gaatacacac               | aacacaaagg atttactgag aattcttctg tctagcagta 180    |
|    | aatgagaaat | cccgcttcca               | acgaaggcct caaacgggct taactaatca cttgcagact 240    |
|    | ttacagacag | agtctttcca               | aactgctcta tgaagagaaa ggtgaaactc tgtgaactga 300    |
|    | acgcacagat | gacaaagcag               | tttctgagaa tgcttctgtg tagtttttac acgaagatat 360    |
|    | ttccatttca | aagattagcc               | tcaaatcgct tgaaatctcc acttgcaaac tccacagaaa 420    |
|    | gaatttttca | aaactgctct               | gtctaaagga aggttcaact ctgtgacttg aatacacaca 480    |
|    | acacaaagaa | gtgactgaga               | attcttctgt ctagcattat atgaagaaat cccgtttcca 540    |
|    | acgaaggcct | caatgaagtc               | caaaaaagca cttgcaggct ttacaaacag agtgtttcca 600    |
|    | aactgctcta | tgaaaagaaa               | ggttaaactc tgtgagttga acgcacacat cacaaagtag 660    |
|    | ttcttgagaa | tgattctgtg               | tagtttttat acgaagatat ttcgttttct gccataggcc 720    |
|    | tagaagcgct | tgaaatctgc               | acttgcaaat tccaaaaaca gagtgtttca aatctgctct 780    |
|    | ctctaaagga | aggttcaa                 | atctgtgagttg aatacaaaaca acacaaagac gttactgaga 840 |
|    | attcttctgt | ctagcattat               | atgaggaaat cccgtttcca acgaagggtc caaagagggc 900    |
|    | caattatcca | cctgcagact               | tacaaagagt gtatttcaa actgctogat taaagaaagg 960     |
|    | ttaaactctg | tgagttgaac               | acacacatca caaagtgtt tctgagaatg attttgtcta 1020    |
|    | gttttaatac | gaagatatat               | cctttcctat cactgtcttc gaagcgtttg aaatctgcac 1080   |
|    | ttgcaaattc | caaaaacaga               | gtgtttcaac tctgctctct ctcaagaaag gttcaactct 1140   |
|    | gtgagttgaa | tacacacaac               | acaaagaagt tactgagaat tcttctgtct agtgttgat 1200    |
|    | gaagaaatcc | cgtttccaac               | gaaggcctca aagaggtcca aatatccact tgcagacttt 1260   |
|    | agaaatagag | tgtttccaaa               | ctgctctatg aaaagaaagg ttaaactctg tgagttgaag 1320   |
|    | gcacacatca | caaactagtt               | tctacgaatg actctgtgct gagct 1365                   |

# REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de análisis de una muestra que contiene células tumorales circulantes (CTC) usando un instrumento automatizado, que comprende:  
5 depositar una muestra de un sujeto con cáncer de próstata sobre un sustrato configurado para su uso con el instrumento automatizado,  
fijar la muestra con formol al 0,4 % durante 1 a 5 minutos seguido de formol tamponado neutro (FTN) al 10 %  
10 durante 5 a 15 minutos y metanol durante 1 a 5 minutos,  
permeabilizar la muestra con Tween 20 al 0,2 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS),  
retener al menos un 90 % de las CTC en la muestra sobre el sustrato tras la fijación y permeabilización,  
15 disponer el sustrato en el instrumento automatizado,  
recuperar las dianas de moléculas de proteína y ácido nucleico en la muestra, en el que la recuperación se hace mediante el instrumento automatizado, en el que la recuperación comprende:  
20 (i) poner en contacto la muestra con reactivos de identificación de CTC, en el que el contacto de la muestra con reactivos de identificación de CTC se hace mediante el instrumento automatizado,  
(ii) poner en contacto la muestra con sondas de ácido nucleico dirigidas al gen relacionado con ETS (ERG),  
25 homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y centrómero 10 (CEN-10), en el que el contacto de la muestra con las sondas de ácido nucleico se hace mediante el instrumento automatizado,  
obtener imágenes de la muestra,  
(iii) localizar las CTC en la muestra sobre el sustrato localizando los reactivos de identificación de CTC, en el que los reactivos de identificación de CTC son reactivos inmunohistoquímicos dirigidos a una proteína CD45, una proteína citoqueratina (CQ), una proteína ERG, un receptor androgénico (RA), una proteína PSMA, o combinaciones de los mismos, en el que la localización de los reactivos inmunohistoquímicos se hace mediante el instrumento  
30 automatizado, y  
(iv) obtener imágenes espectrales de las CTC por localización para detectar las sondas de ácido nucleico, en el que la obtención de imágenes espectrales de las CTC se hace mediante el instrumento automatizado, y  
analizar la muestra analizando las imágenes espectrales y los reactivos de caracterización de CTC detectados.  
40  
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fijación de la muestra comprende fijar la muestra con formol al 0,4 % durante 2 minutos seguido de formol tamponado neutro (FTN) al 10 % durante 10 minutos y metanol durante 3 minutos.  
45  
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la permeabilización de la muestra comprende permeabilizar la muestra con Tween 20 al 0,2 % en PBS durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente.  
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que depositar la muestra sobre un sustrato comprende usar un procedimiento de rodillo.  
50  
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es una muestra de sangre o médula ósea.  
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el cáncer de próstata es un cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), opcionalmente en el que el CPRC es un CPRC metastásico (CPRCm).  
55  
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además enriquecer el contenido de CTC de la muestra usando un anticuerpo de captura específico para una proteína gen relacionado con ETS (ERG), una proteína antígeno prostático específico de membrana (PSMA) o una proteína molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), en el que el enriquecimiento del contenido de CTC de la muestra se produce antes de depositar la muestra sobre el sustrato.  
60  
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el gen relacionado con ETS (ERG), homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) y centrómero 10 (CEN-10) se analizan para determinar la expresión génica y/o reordenamientos/deleciones genéticas.  
65

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las sondas de ácido nucleico son una sonda para ERG en 5', una sonda para ERG en 3', una sonda para PTEN y una sonda para CEN-10.
- 5 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la obtención de imágenes de la muestra comprende inmunofluorescencia para obtener imágenes de los reactivos inmunohistoquímicos, opcionalmente en el que la inmunofluorescencia procede de anticuerpos dirigidos a una proteína CD45, una proteína citoqueratina (CQ), una proteína ERG, un receptor androgénico (RA), una proteína PSMA, o combinaciones de los mismos, en el que los anticuerpos se marcan directamente con fluoróforos.
- 10 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la obtención de imágenes espectrales de las CTC comprende la luminiscencia de imágenes espectrales de las sondas de ácido nucleico, procediendo la luminiscencia de las sondas de ácido nucleico, en el que las sondas de ácido nucleico se marcan directamente con puntos cuánticos, o en el que las sondas de ácido nucleico se marcan indirectamente con puntos cuánticos, procediendo la luminiscencia de los puntos cuánticos que marcan los anticuerpos secundarios antihapteno, siendo los anticuerpos secundarios antihapteno específicos para haptenos que marcan las sondas de ácido nucleico.
- 15 12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el análisis de la muestra comprende detectar una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata en las CTC y comparar la expresión de la una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata en las CTC con un control de la una o más de otras moléculas relacionadas con el cáncer de próstata esperadas en una muestra de próstata normal.
- 20 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además:
- 25 predecir que el cáncer de próstata responderá a un inhibidor de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN;
- predecir que el cáncer de próstata no responderá a la radioterapia cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN;
- 30 predecir que el cáncer de próstata responderá a un bloqueador hormonal cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN;
- predecir que el cáncer de próstata tiene una probabilidad más alta de recidiva en los 5 años tras una prostatectomía cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN en comparación con un cáncer de próstata sin un reordenamiento de ERG y sin una delección de PTEN;
- 35 predecir que el cáncer de próstata tiene una probabilidad más alta de progresar cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN en comparación con un cáncer de próstata sin un reordenamiento de ERG y sin una delección de PTEN;
- 40 predecir que es más probable que el cáncer de próstata metastatice en los 5 años tras una prostatectomía cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN en comparación con un cáncer de próstata sin un reordenamiento de ERG y sin una delección de PTEN;
- 45 predecir un tiempo de supervivencia de menos de 5 años cuando las CTC tengan un reordenamiento de ERG y/o una delección de PTEN; o
- combinaciones de los mismos.
- 50 14. Un procedimiento de caracterización de un cáncer de próstata, que comprende:
- diseminar las células tumorales circulantes (CTC) aisladas de un sujeto que tiene cáncer de próstata sobre un portaobjetos de vidrio para formar una capa homogénea;
- 55 fijar las CTC sobre el portaobjetos de vidrio con formol al 0,4 % durante 1 a 5 minutos seguido de formol tamponado neutro (FTN) al 10 % durante 5 a 15 minutos y metanol durante 1 a 5 minutos;
- permeabilizar las CTC sobre el portaobjetos de vidrio con Tween 20 al 0,2 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS), en el que al menos un 90 % de las CTC sobre el portaobjetos de vidrio se retienen tras la fijación y permeabilización;
- 60 poner en contacto las CTC sobre el portaobjetos de vidrio con una o más sondas de ácido nucleico específicas para ERG, PTEN y CEN-10, en el que cada sonda comprende uno o más puntos cuánticos;
- 65 detectar señales del uno o más puntos cuánticos en la una o más sondas de ácido nucleico;

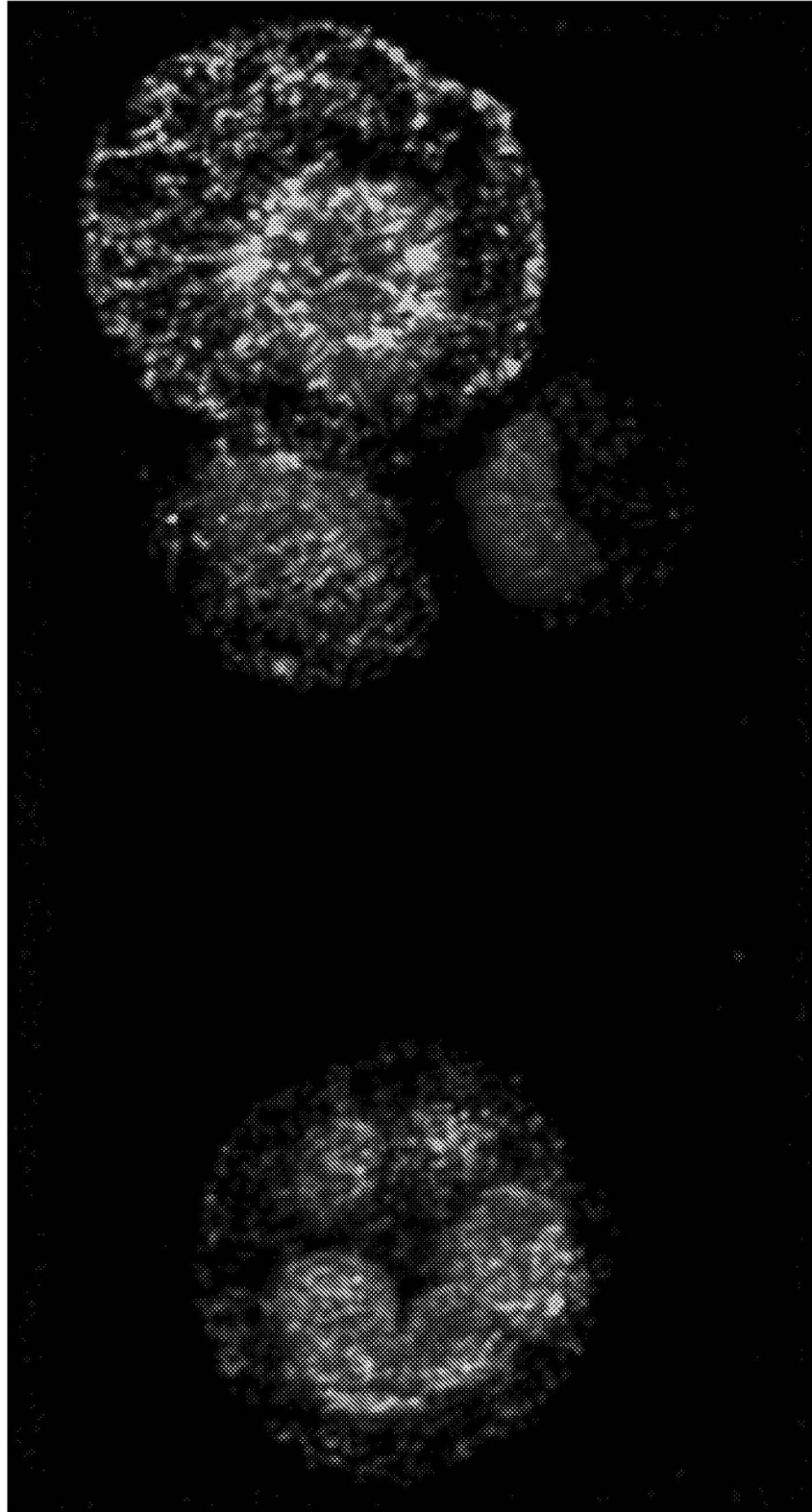
## ES 2 695 101 T3

determinar si se reordena uno o más ERG, si se delecciona uno o más genes PTEN y si se detecta CEN-10; y

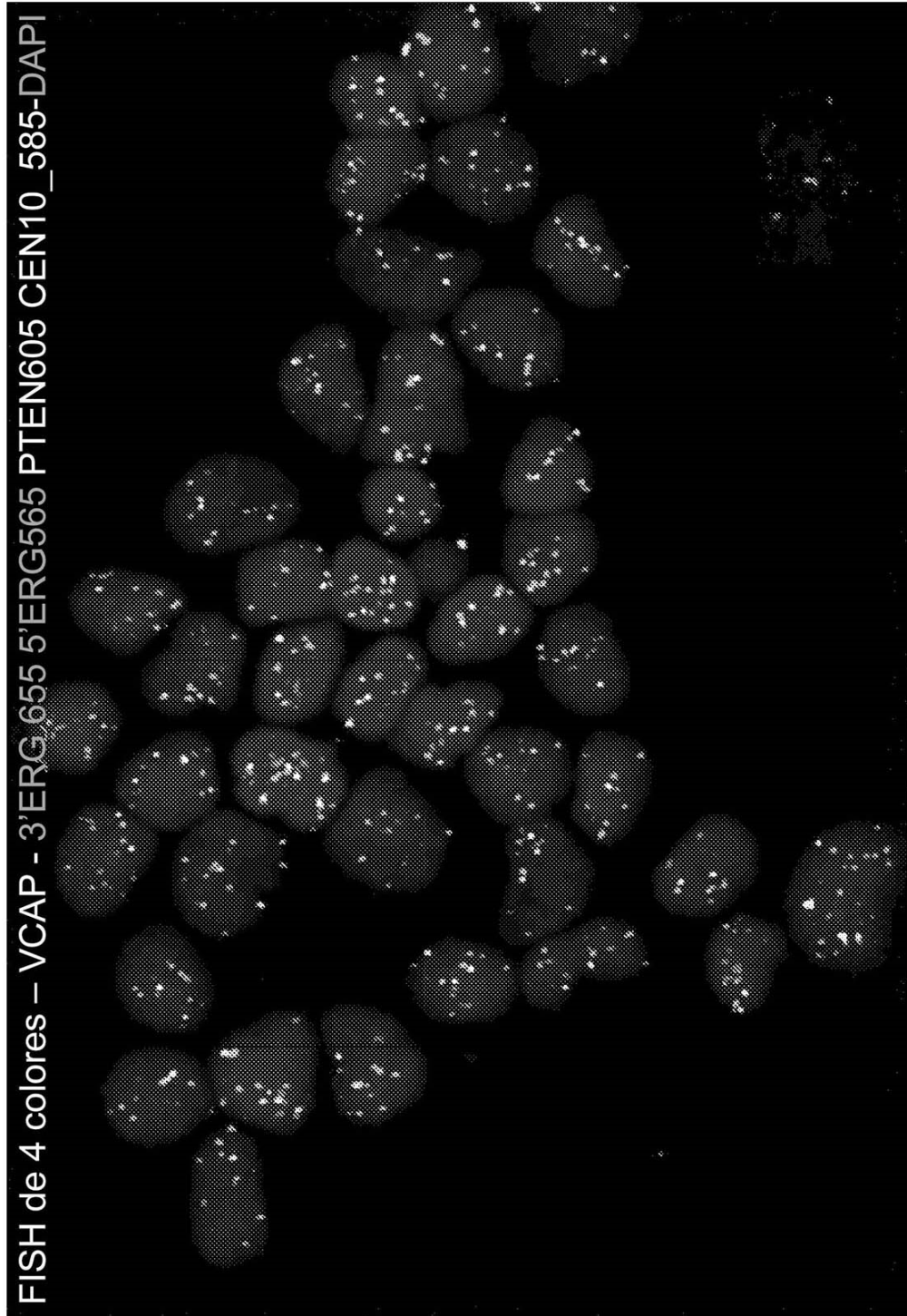
caracterizar el cáncer de próstata basándose en si se reordena uno o más ERG, si se delecciona uno o más genes PTEN y si se detecta CEN-10.

5

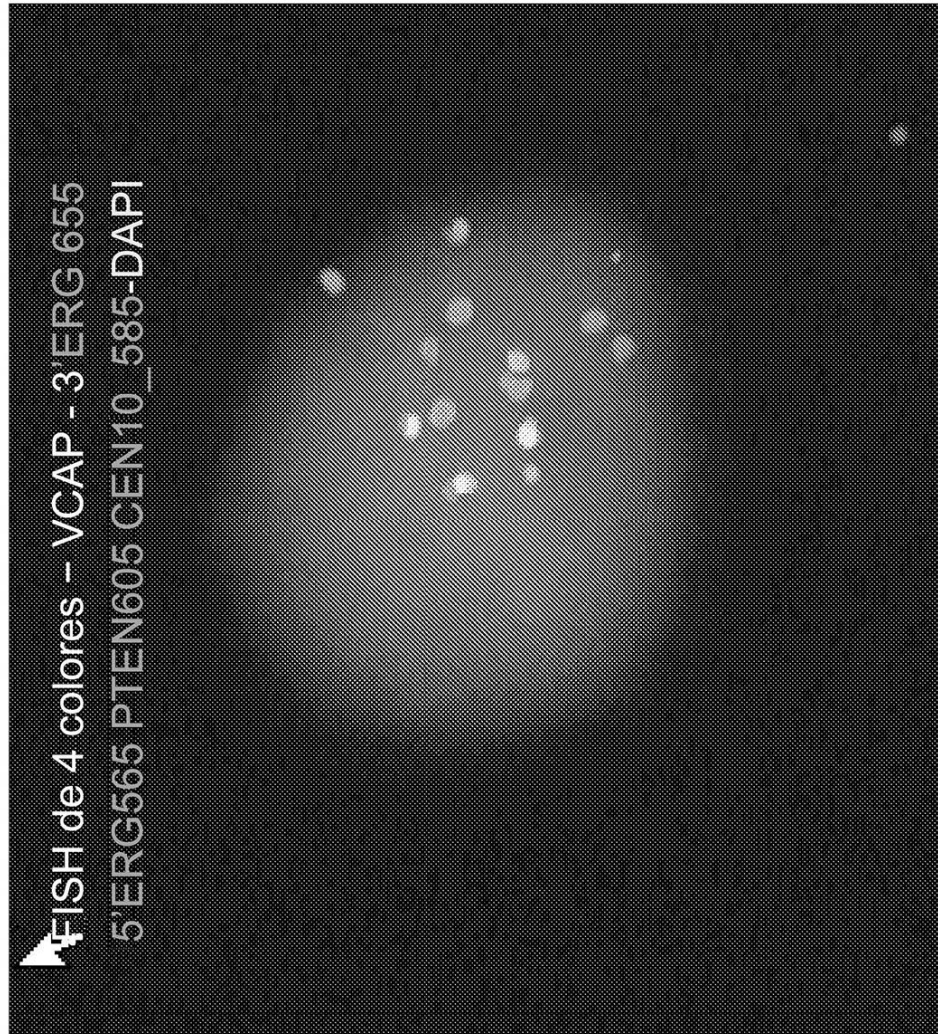
**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**



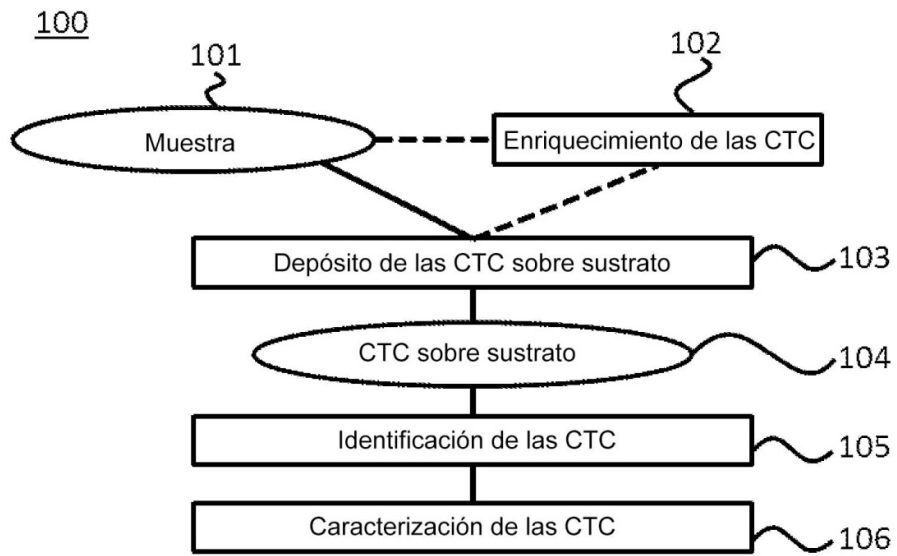


FIG. 4

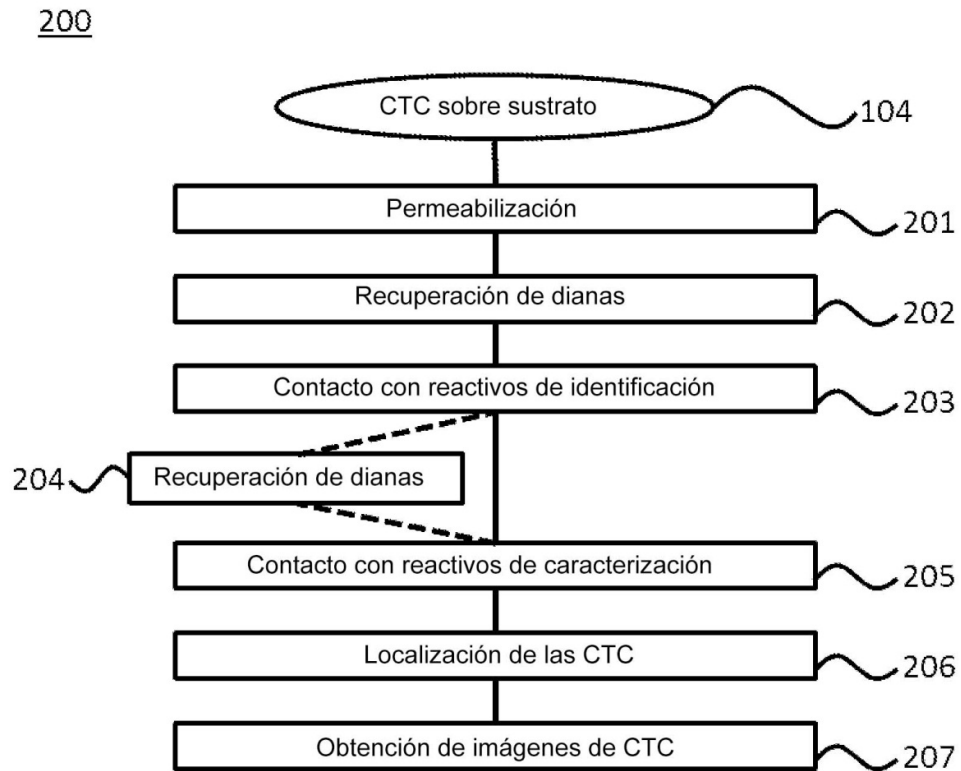


FIG. 5