



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 101**

51 Int. Cl.:
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02739098 .8**
96 Fecha de presentación : **07.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1429603**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2004**

54 Título: **Células marcadas para su uso como control funcional interno en ensayos de detección de células raras.**

30 Prioridad: **08.03.2001 US 801471**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2011

73 Titular/es: **VERIDEX, L.L.C.**
1001 Us Highway Route 202
North Raritan, New Jersey 08869, US

72 Inventor/es: **Terstappen, Leon, W., M., M.;**
Rao, Galla, Chandra;
Rutner, Herman y
Liberti, Paul, A.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 101 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

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere al uso de células previamente marcadas como control funcional interno en los procedimientos de selección y análisis de células. La invención proporciona una única entidad que puede controlar esos diversos parámetros como marcado magnético, selección magnética, viscosidad, temperatura, adición de reactivos, actividad de reactivos y error del operador en procedimientos que implican el aislamiento de células raras. La invención es útil en aspectos de la selección de células que incluye cribado de cáncer, estadificación, monitorización de tratamientos de quimioterapia, monitorización de recaída, hibridación de ADN y otras numerosas formas de diagnóstico y monitorización médicos. La presente invención es especialmente útil en la separación de células raras.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La mayoría de las muertes por cáncer no se producen por el tumor primario. En su lugar, la muerte se produce por metástasis, es decir, múltiples colonias de tumor extendidas establecidas por células malignas que se unen a sí mismas desde el sitio del tumor original y se desplazan por el cuerpo, frecuentemente a sitios distantes. Si un tumor primario se detecta suficientemente pronto, la cirugía, la radiación, la quimioterapia o alguna combinación de estos tratamientos puede eliminarlo frecuentemente. Desafortunadamente, las colonias metastásicas son más difíciles de detectar y eliminar y frecuentemente es imposible tratar todas ellas satisfactoriamente. Por tanto, desde un punto de vista clínico, las metástasis pueden considerarse el acontecimiento decisivo en la progresión natural del cáncer.

Además, la capacidad de metastatizar es la propiedad que caracteriza excepcionalmente a un tumor maligno. La metástasis de cáncer comprende la siguiente serie compleja de acontecimientos secuenciales:

- 20 1. Extensión desde el locus primario a los tejidos circundantes;
2. Penetración en cavidades y vasos del cuerpo;
3. Liberación de células tumorales para el transporte por el sistema circulatorio hasta sitios distantes;
4. Reinvasión de tejido en el sitio de ataque; y
- 25 5. Adaptaciones al nuevo entorno de manera que se promueva la supervivencia de células tumorales, la vascularización y el crecimiento tumoral.

30 Basándose en la complejidad del cáncer y la metástasis del cáncer, y la frustración en el tratamiento de pacientes con cáncer con el transcurso de los años, se han hecho muchos intentos por desarrollar pruebas de diagnóstico para guiar el tratamiento y monitorizar los efectos de tal tratamiento en metástasis o recaída. Tales pruebas también podrían usarse supuestamente para el cribado de cáncer, sustituyendo pruebas relativamente rudimentarias tales como la mamografía para tumores de mama o exámenes rectales digitales para cánceres de próstata. Para ese fin se han desarrollado varias pruebas durante los últimos 20 años y se han evaluado sus beneficios. Uno de los primeros intentos fue la formulación de un inmunoensayo para el antígeno carcinoembrionario [CEA]. Este antígeno aparece en células fetales y reaparece en células tumorales en ciertos cánceres. Se han hecho grandes esfuerzos para evaluar la utilidad de probar para CEA, además de para muchos otros antígenos "tumorales" tales como PSA, CA 15.3, CA125, PSMA, CA27.29. Estos esfuerzos han demostrado ser algo inútiles ya que la aparición de tales antígenos en una muestra de prueba no ha sido generalmente predictiva y se detectan frecuentemente cuando hay poca esperanza para el paciente. Sin embargo, en los últimos años, una prueba ha demostrado ser útil en la detección temprana de cáncer, concretamente PSA para cánceres de próstata. Cuando se usa con examen físico de seguimiento y biopsia, la prueba de PSA ha desempeñado una notable función en la detección temprana de cáncer de próstata, momento en el que se trata mejor.

40 A pesar del éxito de la prueba de PSA, la prueba deja mucho que desear. Por ejemplo, altos niveles de PSA no siempre establecen una correlación con cáncer ni parecen ser una indicación del potencial metastásico del tumor. Esto puede ser debido en parte al hecho de que el PSA es un componente de tejido de próstata normal, además de otros factores desconocidos. Además, cada vez es más evidente que un gran porcentaje de pacientes con cáncer de próstata continuarán teniendo enfermedad localizada que no es potencialmente mortal. Basándose en el deseo de obtener una mejor concordancia entre aquellos pacientes con cánceres que metastatizarán y aquellos que no se ha intentado determinar si las células de la próstata están en la circulación. Cuando se añade a altos niveles de PSA y datos de biopsia, la existencia de células tumorales en circulación podrían dar indicaciones de cómo de energicamente debería tratarse el paciente.

50 El enfoque recomendado para determinar la presencia de células tumorales de la próstata en circulación ha sido probar la expresión de ARN mensajero de PSA en sangre. Esto se está haciendo mediante el laborioso procedimiento de aislar todo el ARNm de una muestra de sangre y realizar RT-PCR. No existe una buena correlación entre la presencia de tales células en la sangre y la capacidad de predecir qué pacientes están en necesidad de un tratamiento energético (LG Gomella, J of Urology, 158:326-337(1997)). Es de notar que la PCR es difícil de realizar cuantitativamente, si no imposible, en muchas situaciones, es decir, para determinar el número de células tumorales por volumen unitario de muestra biológica. Adicionalmente, frecuentemente se observan positivos falsos usando esta técnica. Un inconveniente añadido es el límite finito y práctico a la sensibilidad de esta técnica basándose en el tamaño de muestra examinado. Normalmente, la prueba se

55

5 realiza en 10^5 a 10^6 células purificadas de eritrocitos interferentes. Con $5-10 \times 10^6$ leucocitos en sangre normal, esto se corresponde con un límite inferior práctico de sensibilidad de una célula tumoral/0,1 ml de sangre. Por tanto, se necesita que haya aproximadamente 10 células tumorales en un ml de sangre antes de que la señal sea detectable. Como complicación adicionalmente posible, las células tumorales son frecuentemente genéticamente inestables. Por consiguiente, las células cancerosas que tienen transposiciones genéticas y cambios de secuencias pueden pasarse por alto en un ensayo de PCR ya que puede perderse la complementariedad de secuencias necesarias entre cebadores de PCR y secuencias diana.

10 En resumen, una prueba de diagnóstico útil necesita ser altamente sensible y cuantitativa de forma fiable. Una prueba tal debe poder detectar la presencia de una única célula tumoral en un ml de sangre, correspondiéndose así en promedio con 3000-4000 células totales en circulación. En estudios de inóculo que establecen tumores en animales, ese número de células puede conducir de hecho al establecimiento de un tumor. Además, si 3000-4000 células en circulación representan el 0,01% de las células totales en un tumor, entonces contendría aproximadamente 4×10^7 células totales. Un tumor que contiene ese número de células no sería visible por ninguna técnica actualmente existente. De ahí que, si las células tumorales se propagaran en las fases tempranas de cáncer, una prueba con la sensibilidad mencionada anteriormente detectaría el cáncer. Si las células tumorales se propagaran en alguna relación funcional con el tamaño del tumor, entonces sería beneficiosa una prueba cuantitativa para evaluar la carga tumoral. Hasta ahora no se ha informado de información referente a la existencia de células tumorales en circulación en cánceres muy tempranos. Además, hay dudas muy considerables en la bibliografía médica referentes a la existencia de tales células y el potencial de tal información. La visión general es que los tumores están inicialmente muy confinados y de ahí que haya pocas células, si hay alguna, en circulación en fases tempranas de la enfermedad, y que sería poco probable que la detección temprana de células cancerosas en circulación, aunque fuera viable, proporcionara cualquier información útil.

25 Basándose en lo anterior, es evidente que es altamente deseable un procedimiento para identificar aquellas células en circulación con potencial metastásico antes del establecimiento de un tumor secundario, particularmente durante las fases tempranas de cáncer. Para apreciar la ventaja que una prueba tal tendría sobre inmunoensayos convencionales se considera que un inmunoensayo altamente sensible tiene un límite de sensibilidad funcional inferior a 10^{-17} moles. Si una célula tumoral puede capturarse de un ml de sangre y analizarse, el número de moles de receptor de superficie, suponiendo 100.000 receptores por célula, sería 10^{-19} moles. Como pueden detectarse aproximadamente 300 moléculas en una célula, un ensayo tal tendría una sensibilidad funcional del orden de 10^{-22} moles, que es bastante notable. Lograr ese nivel de sensibilidad en el aislamiento de tales células raras y aislarlas en un modo que no comprometa o interfiera con su caracterización es una tarea extraordinaria.

30 La introducción de citometría de flujo para discriminar entre poblaciones de células ha mejorado significativamente la capacidad de identificar y enumerar con exactitud componentes de poblaciones de células que no pueden distinguirse por características morfológicas. Otra mejora de la sensibilidad del examen de citometría de flujo de mezclas de células heterogéneas ha sido obtenida por análisis multidimensional de los datos. Las poblaciones de células se identifican por la evaluación simultánea de parámetros de dispersión de la luz y de fluorescencia. Los parámetros de dispersión de la luz miden el tamaño de la célula y la granularidad de la célula. Los parámetros de fluorescencia pueden usarse para evaluar antígenos de superficie celular, antígenos intracelulares, ADN, ARN y contenido de proteína. Mediante el análisis simultáneo de parámetros de dispersión de la luz y de fluorescencia de células individuales que pasan a través del rayo láser se crea un espacio multidimensional en el que las células con propiedades diferentes emergen en diferentes localizaciones. Las condiciones necesarias para detectar células infrecuentes / raras por citometría de flujo son:

- 40 1. Volumen de muestra suficiente para el análisis;
2. Análisis por citometría de flujo en un periodo de tiempo razonable;
3. Selección de parámetros de forma que la población de células de interés se localice en una posición única;
4. La frecuencia de las células diana debe ser superior a 1 en 10^5 células.

45 Los actuales procedimientos de preparación de muestras en los que muestras de sangre se incuban con anticuerpos fluorescentemente marcados seguido de la adición de un agente de lisado de eritrocitos diluyen la muestra diez veces y, por tanto, no es adecuado para la detección de células raras. En laboratorios de investigación, las separaciones por densidad o los procedimientos de lisado de eritrocitos consiguen la reducción del volumen de muestra y un aumento en la concentración de células. Estos procedimientos conducen a pérdidas de células variables y son difíciles de normalizar entre laboratorios. Además, no se obtiene un enriquecimiento significativo de las células diana.

50 Un procedimiento para aislar células tumorales en circulación para el análisis y la enumeración se describe en el documento US-A-6365362. El procedimiento descrito en ese documento usa una partícula magnética marcada con anticuerpos para marcadores comúnmente encontrados en células tumorales en circulación que pueden seleccionarse magnéticamente a partir de una muestra de sangre de un paciente. Los ensayos basados en este procedimiento han mostrado que no sólo células tumorales de cáncer de mama pueden encontrarse en la sangre de un paciente con tumores al límite más bajo de detección por mamografía, sino que el número de células tumorales en circulación puede guardar relación con terapias convencionales. Por ejemplo, el número de células tumorales en circulación disminuye con tratamientos quimioterapéuticos o cirugía. Otras pruebas usando este procedimiento han mostrado que el número de células tumorales en circulación es proporcional a la masa tumoral en varios pacientes con cáncer de colon. De todos modos, otras pruebas mostraron que

cuándo un paciente con cáncer sale de remisión, el número de células tumorales en circulación aumenta. Estos notables resultados se encontraron en una variedad de cánceres, que incluyen cánceres de mama, de próstata y de colon.

Estos resultados son tan fascinantes que deben atenuarse con la cantidad apropiada de limitación científica. Mientras que la detección de células tumorales en circulación en la propia sangre es aterradora para el paciente, todavía no se ha demostrado que un resultado de prueba negativo sea una indicación de que un paciente está libre de cáncer. Incluso peor sería un resultado negativo falso de glóbulos sanguíneos en circulación. El fallo de reactivos, el fallo instrumental y los errores del operador pueden todos conducir a resultados negativos erróneos. Como las células cancerosas en sangre son raras (frecuentemente menos de 1 célula/ml de sangre), los volúmenes de sangre necesarios para realizar la prueba son restrictivamente grandes. El requisito de un gran volumen tal de sangre prohíbe el uso de muestras de sangre adicionales para fines de control externo tradicionales. Como se ha tratado por Terstappen en "Detection of infrequent cells in blood and bone marrow by flow cytometry", Hematopoietic Stem Cell Therapy, ed. A. Ho, Marcel Dekker Inc. pág. 137-152, (2000), para probar la unión no específica (negativa) en ensayos de detección de células no raras tradicionales, el número de células contado es generalmente inferior al 1% de la población de células de partida. En la prueba real, los reactivos específicos detectan una población de células generalmente superior al 1%, confirmándose así que los reactivos están funcionando en realidad. Esta unión no específica (NSB) produciría una cifra de células de 10^5 células, si se empezó con 10^7 células, y una NSB del 1%. Sin embargo, en la detección de células cancerosas, la unión específica de 0 células puede detectarse en un paciente libre de cáncer y debe discriminarse de la presencia de 1-100 células tumorales en circulación en un paciente que está sufriendo una recaída. Con 0 células detectadas, no se tiene forma de saber si los reactivos y/o el procedimiento están funcionando. Por tanto, se desea un control interno / permanente para evaluar cada uno de los componentes usados en la prueba.

Con el fin de tener la certeza requerida de que un resultado de prueba es válido se necesitan controles en varios puntos esenciales en el procedimiento. El primer punto esencial que necesita control es la etapa de marcado magnético. Con tan pocas células tumorales en la muestra de prueba es vital que estas células sean elegidas como diana por las partículas magnéticas que llevan el anticuerpo. Otro punto es la selección magnética de las dianas magnéticamente marcadas que incluye aspirar el exceso de líquido y las células no seleccionadas, y el lavado adicional de los complejos de partícula magnética/célula. Todavía otro punto en el procedimiento es la etapa de marcar con colorantes fluorescentes específicos de antígeno, algunos de los cuales eligen como diana antígeno presente en la superficie celular, pero algunos de los cuales requieren la permeabilización de la membrana celular y/o nuclear. Todavía otro punto es la enumeración de las células diana reales. Como se describe en el documento US-A-6365362, la enumeración se realiza por citometría de flujo, pero si se desea también puede emplearse el uso del sistema descrito en el documento US-A-6623983 o el sistema descrito en la patente de EE.UU. nº 5.985.153.

Un ejemplo de un control experimental es el uso de 'dilución isotópica' para determinar el rendimiento en reacciones químicas o purificaciones. En este procedimiento, una muestra pura de la molécula o compuesto de interés se marca con un isótopo radiactivo de uno de los átomos en la molécula. Una cantidad conocida del compuesto isotópicamente marcado se añade al material de partida y se realiza la reacción química o el procedimiento de aislamiento. Al final del procedimiento se calcula el porcentaje de compuesto isotópicamente marcado. La comparación entre los materiales de partida originales y el producto final permite un cálculo del rendimiento o recuperación en porcentaje del material de partida. Este tipo de control también permite un sofisticado análisis de qué etapas en un procedimiento producen la pérdida de producto o el bajo rendimiento. El uso de un protocolo de 'dilución isotópica' genuino no es posible en el aislamiento de materiales biológicos tales como células, especialmente células tumorales. Sin embargo, el uso de células que se marcan con un marcador característico para distinguirlas de las células diana, y que se comportan de un modo que podría demostrarse que es muy similar al de las células diana, sería útil para divulgar alguna información sobre el porcentaje de recuperación al investigador.

Los controles tradicionales para el inmunofenotipado de células son controles de isotipo. En un control de isotipo, la prueba se realiza usando un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo, misma especie, pero dirigidos contra un antígeno irrelevante. En el ensayo de células tumorales en circulación mencionado anteriormente, el anticuerpo monoclonal sobre la partícula magnética se dirige contra la molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM). El clon usado en los ejemplos en esta memoria descriptiva es un anticuerpo de ratón IgG1k. El control de isotipo tradicional para esta partícula debe ser una partícula magnética preparada idénticamente, sólo que ahora la partícula está marcada con un de anticuerpo de ratón IgG1k dirigido contra un antígeno que no aparece en seres humanos tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). Las células seleccionadas después de la separación magnética con este anticuerpo de isotipo sobre la partícula magnética están unidas no específicamente, y puede determinarse el número de células no específicamente seleccionadas. El anticuerpo monoclonal IgG1k dirigido contra el antígeno de leucocito CD45 está marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El control de isotipo tradicional es un anticuerpo monoclonal IgG1k marcado con FITC dirigido contra un antígeno que no se expresa en seres humanos tal como KLH. Las células seleccionadas después de la separación magnética y teñidas con este anticuerpo de isotipo marcado con FITC determinan la tinción de fondo en el canal de FITC. El anticuerpo monoclonal dirigido contra las citoqueratinas 4, 5, 6, 8, 10, 13 y 18 está marcado con ficoeritrina (PE). Este anticuerpo es un anticuerpo monoclonal murino, IgG1k. El control de isotipo tradicional es un anticuerpo IgG1k monoclonal marcado con PE dirigido contra un antígeno que no aparece en seres humanos tal como KLH. Las células seleccionadas después de la separación magnética y teñidas con este anticuerpo de isotipo marcado con PE determinan la tinción de fondo en el canal de PE. Por tanto, todos los anticuerpos en el sistema serían idénticos a aquellos en la muestra del paciente, excepto por la especificidad. La selección de células con estos reactivos se realizaría yuxtapuesta a una muestra del paciente usando una alícuota idéntica de sangre del paciente. Si se usara citometría de flujo multiparamétrica para el análisis final, los resultados mostrarían una población de células y podrían seleccionarse puertas para la detección de células tumorales [FITC-, PE+].

5 Para discriminar entre las células de tinción no específica y las células no específicamente seleccionadas se ejecutaría una muestra de sangre adicional, libre de células tumorales, usando la partícula magnética de control de isotipo, la CD45-FITC y el PE de control de isotipo. Si se usara citometría de flujo multiparamétrica, las células FITC[+] serían los leucocitos no específicamente seleccionados. Las células FITC[+], PE[+] serían las células no específicamente seleccionadas y las de tinción no específica. Las células que son FITC[-], PE[+] serían células no específicamente seleccionadas que se unirían no específicamente a PE, pero no al MAb FITC, ya que el isotipo de ambos anticuerpos es el mismo. Esta unión no específica es debida al fluorocromo, y no al anticuerpo, o a cambios producidos por la conjugación. En líneas generales, el mismo número de leucocitos también aparecería en la muestra del paciente con reactivos específicos, que también habrían sido seleccionados no específicamente, pero específicamente teñidos. Los análisis diferenciales eliminan eficazmente estos leucocitos de los resultados de la prueba, ofreciendo la seguridad adicional de que cualquier "célula tumoral" detectada en la prueba es en realidad células epiteliales en circulación y no glóbulos sanguíneos no específicamente unidos.

10 Un control más exacto sería el uso de FF de EpCAM, CD45-FITC y un MAb PE de isotipo. En una muestra del paciente, la mayoría de las células seleccionadas se seleccionan no específicamente. Estas células son reconocidas por el MAb CD45-FITC y, por tanto, pueden enumerarse y representan la verdadera selección no específica por FF de EpCAM. Las células tumorales reales no se teñirán con CD45-FITC, ni con el anticuerpo PE de control de isotipo. Sin embargo, como la frecuencia es extremadamente baja, no puede determinarse en realidad si hay células tumorales en la muestra del paciente.

15 Aunque los controles de isotipo tradicionales descritos anteriormente representan los tipos de controles apropiados para la selección de células, no son controles verdaderamente funcionales. Primero, el nivel de fondo varía considerablemente dependiendo de qué anticuerpo se elija para un control de isotipo. Por tanto, podría hacerse la elección de controles de isotipo para influir en un mayor o menor umbral de fondo. Segundo, este tipo de control no tiene en cuenta los reactivos usados en la prueba real del paciente. Por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra citoqueratina en la prueba en pacientes puede haberse omitido sin querer de la mezcla de pruebas. Este error sería indetectable por el control de isotipo. Finalmente, y lo más importante, este tipo de control de isotipo puede usarse para pequeñas muestras de sangre que requieren 50-150 µl de sangre. Sin embargo, en el aislamiento de células raras se requiere un tubo lleno, y óptimamente 5-30 ml de sangre completa para la detección de células tumorales. Se han detectado números de células de tan sólo 1 célula/ml de sangre, por tanto, cuanto mayor sea la muestra, menos probable es que la prueba pase por alto un paciente con una baja incidencia de células tumorales en circulación. Estos pacientes con cáncer ya están sometidos a una variedad de pruebas médicas, por lo que la extracción de 20-30 ml de sangre adicionales para un control de isotipo de valor limitado no es aceptable. El uso de una pequeña muestra de sangre para un control de isotipo también es de valor limitado. La división de la muestra de sangre en una muestra de control de isotipo y de prueba real disminuye la sensibilidad, y se pasarían por alto aquellos pacientes con un bajo nivel de células tumorales en circulación. Como se ha documentado por Stelzer y col., *Cytometry* 30:214-230 (1997), y Keeney y col., *Cytometry* 34:280-283 (1998), se está creando un consenso para la eliminación de una muestra del paciente para uso como cualquier tipo de control, que incluye un control de isotipo.

20 La patente de EE.UU. nº 5.985.153 de Immunicon describe un control interno que es sustancialmente diferente de un control de isotipo externo. En los ejemplos 6 y 7 de la patente 153, perlas con una "carga" magnética o "cargas" de antígeno similares a las encontradas en células cancerosas se añaden a la muestra de sangre. El porcentaje o el número de perlas detectado por la prueba se usan para determinar la eficiencia de la prueba. El uso de perlas como control es muy conocido en la técnica y tiene una clara ventaja ya que no hay oportunidad de confundir una perla con una célula durante el análisis de la prueba. Las perlas también se almacenan bien y pueden fabricarse de forma reproducible, y tienen el beneficio añadido de que pueden usarse para determinar con exactitud el volumen de una muestra. Como se describe por Stewart y col., *Cytometry* 2(4): 238-243 (1982), el uso de una cantidad conocida de perlas fluorescentes soluciona el problema común de determinar el volumen de muestra realmente analizado por un citómetro de flujo. Sin embargo, el uso de perlas como control tiene limitaciones. Las perlas pueden ser extremadamente resistentes, y como tales verse inafectadas por numerosas condiciones que destruirían una célula, limitándose así su utilidad como control frente al error del operador. La sensibilidad de la perla a condiciones tales como temperatura, pH y fuerza isotónica deberá ser similar a la de una célula real. Serían difíciles las consideraciones de ingeniería y fabricación para formar una perla tal con los antígenos apropiados, densidad de antígenos y colorantes para proporcionar un control para la selección de células. No sólo debe tener la perla los antígenos apropiados, deben estar accesibles en condiciones similares a las de una célula real. Por ejemplo, deben considerarse factores estéricos y constantes de unión. Finalmente, las perlas son objetos sólidos no afectados por las reacciones de permeabilización, limitando su utilidad como control a la etapa crucial. Por tanto, aunque pudiera duplicarse perfectamente una superficie celular, las perlas todavía no podrían servir de control positivo interno real para una prueba de selección de células.

25 Otra solución para proporcionar un control sería usar células reales como controles. De hecho, un procedimiento de control de calidad estándar para el fenotipado de la superficie celular es obtener especímenes de donantes normales que van a prepararse y analizarse colateralmente con la muestra del paciente. Idealmente, el espécimen normal es del mismo tipo y se obtiene en el mismo momento que la muestra del paciente, aunque esto no es generalmente posible para especímenes distintos de sangre periférica. Incluso con sangre periférica, el uso de sangre fresca puede ser costoso, requerir tiempo, y no siempre está disponible, haciendo que muchos laboratorios vuelvan a productos celulares almacenados como fuente de sus controles. El uso de células preparadas, obtenidas comercialmente, conservadas como controles para diversas pruebas médicas es muy conocido en la técnica. Las células de control incorporadas en gelatina, parafina o agar se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.610.022 (Battifora) y 5.187.099 (Healy y col.). El uso de células conservadas para controles de referencia para contadores de células se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.981.282 (Ryan); 5.432.089 (Ryan); 5.342.754 (Maples y col.); y 5.763.204 (Maples y col.). También se usa conservación por liofilización como se describe en las

5 patentes de EE.UU. nº 5.059.518 (Kortright y col.); 5.968.831 (Shukla y col.); y la patente europea 469 766B1 (Davis). La creación de disoluciones patrón usadas para contadores de células, citómetros de flujo y otros instrumentos se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.529.933 (Young y col.); 5.888.823 (Matsumoto y col.); y la memoria descriptiva aceptada japonesa 01259261. Una revisión de los catálogos de los principales proveedores de reactivos para analizadores de hematología, citómetros de flujo y otras plataformas de análisis de células revela un gran número de controles basados en células para estos instrumentos. Algunos ejemplos incluyen Streck Laboratories Cell-Chex® y reactivos Chem-Chex, R&D Systems, reactivos de R&D Retic, células de control de BeckmanCoulter Cyto-Trol® y la línea de BioErgonomics FluoroTrol® de leucocitos estabilizados.

10 El documento US-A-5478722 desvela un procedimiento para preparar células de control fluorescentemente marcadas para uso en citometría de flujo e inmunología en el que las células se tratan con un inhibidor de proteasa antes de marcarse fluorescentemente.

El documento WO-A-94/16314 desvela células de control multimarcadas para uso en citometría de flujo.

El documento EP-A-0608987 desvela un procedimiento para detectar células raras usando citometría de flujo y marcado fluorescente doble de las células.

15 El documento WO-A-00/62071 desvela un procedimiento para detectar células cancerosas en circulación usando citometría de flujo y marcado fluorescente doble de las células.

20 Aunque las células de control descritas en las patentes anteriormente mencionadas y las diversas líneas de reactivos comercialmente disponibles ofrecen muchas formas de células estabilizadas para procedimientos celulares, los procedimientos y reactivos descritos sólo podrían proporcionar controles externos para el procedimiento de selección y de análisis de células. Ninguno proporcionaría un control interno adecuado para la selección y la enumeración de células raras, tales como células tumorales en circulación. Además, la estabilidad de las células se limita a 14-30 días. En aquellos casos en los que hay una estabilidad prolongada, las células se han liofilizado, aumentando la estabilidad en almacén, pero puede disminuir la reproducibilidad debido a una reconstitución inadecuada.

25 Si fueran a usarse células como control positivo interno para la selección de células raras se presentarían muchos problemas. Por ejemplo, ¿cómo pueden obtenerse las células? ¿cómo pueden ser diferenciables las células de control de las células diana? ¿cómo puede demostrarse que las células de control se comportan similarmente a las células diana? ¿cómo pueden usarse las células para controlar el experimento? El uso, la reproducibilidad y la eficacia son asuntos esenciales referentes al uso de células como control positivo interno para la selección de células, todos los cuales se tratan más adelante en este documento.

30 RESUMEN DE LA INVENCION

35 En un procedimiento para aislar células diana raras de una muestra que también comprende células no diana se requiere un sistema de control interno reproducible normalizado. Por tanto, un número de células conocido que expresa antígenos de superficie e intracelulares que están presentes en las células raras elegidas como diana se estabiliza y se modifica de tal forma que pueda discriminarse claramente de las células raras elegidas como diana. Estas "células de control" se añaden directamente a una muestra de sangre completa del paciente antes de procesar la muestra. Se analizan el número de células de control detectadas después de la muestra del paciente y las características fluorescentes de las células de control como se determinan mediante la plataforma analítica para confirmar que los reactivos están funcionando adecuadamente e indicar que la muestra del paciente se ha procesado con exactitud.

40 En la actualidad, la línea celular SKBR-3 de cáncer de mama se ha estabilizado satisfactoriamente para uso como células de control. Las células pueden marcarse fluorescentemente con el colorante de membrana lipófilo perclorato de 3,3'-dihexadecilocxacarbocianina (DiOC₁₆(3)), (DiOC₁₈(5)) u otros colorantes y marcas de forma que las células de control puedan discriminarse claramente de una célula tumoral "verdadera". Estas células SKBR-3 tienen ciertas características que potencian su uso como células de control en la selección de células tumorales, que incluyen:

- 45
1. Expresan el antígeno de la molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM) y se seleccionan a partir de sangre mediante partículas magnéticas recubiertas con el MAb EpCAM;
 2. Las membranas de las células de control están permeabilizadas por el reactivo de permeabilización;
 3. Las células de control expresan citoqueratinas intracelulares y se identifican por un MAb dirigido contra citoqueratina fluorescentemente marcada;
 4. Las células de control no expresan antígeno de CD45 y no deben teñirse con el anticuerpo dirigido contra CD45 fluorescentemente marcado; y
 5. Las células de control tienen un núcleo y deben teñirse con un compuesto fluorescente que tiñe el núcleo.
- 50

La recuperación de las células de control refleja con exactitud la recuperación de células tumorales en circulación en muestras de pacientes. Aunque es imposible demostrar qué células de control se comportan exactamente como una célula tumoral epitelial en circulación, puede mostrarse que la técnica de separación magnética descrita no encontró diferencia

significativa en la recuperación de células tumorales cultivadas, tanto si tenían como si no una alta o baja densidad de antígenos. El intervalo de densidades de antígenos de líneas celulares disponibles es similar al intervalo de células tumorales encontradas en pacientes con cáncer.

5 Por tanto, en un aspecto de la invención se proporcionan células estabilizadas para uso como control interno en procedimientos para aislar e identificar células raras. Las células de control de la invención tienen determinantes en común con las células raras. Los componentes celulares y los restos antigénicos de la célula de control se han estabilizado posteriormente por exposición a fijador. Las células están marcadas redundantemente en la membrana con al menos dos marcas fluorescentes que tienen las mismas propiedades espectrales.

10 En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para preparar las células de control interno estabilizadas. El procedimiento incluye las siguientes etapas: i) marcar redundantemente la célula de control con al menos dos marcas fluorescentes que tienen las mismas propiedades espectrales; ii) poner en contacto las células marcadas con un fijador de células, efectuando el fijador la estabilización de tanto la estructura celular como los restos antigénicos presentes en dicha célula de control; y iii) posteriormente quitar el fijador en exceso para promover el almacenamiento a largo plazo de dichas células de control, siendo dichas células de control física y biológicamente estables durante al menos seis meses.

15 Por tanto, según la presente invención se mejoran procedimientos para aislar y enumerar células raras en una población de células mixta comprendida en una muestra de sangre extraída de un sujeto, siendo números crecientes de células raras indicativos de un estado de enfermedad. En una realización particularmente preferida, la célula rara es una célula cancerosa y el estado de enfermedad es cáncer. Un procedimiento a modo de ejemplo de la invención incluye las siguientes etapas: i) preparar una muestra inmunomagnética en la que la muestra de sangre se mezcla con partículas magnéticas acopladas a un ligando que reacciona específicamente con un determinante de las células raras para la exclusión sustancial de otros componentes de muestra; ii) poner en contacto la muestra inmunomagnética con al menos un reactivo que marca un determinante de las células raras; y iii) analizar las células raras marcadas para determinar la presencia y el número de cualquier célula rara en la muestra inmunomagnética, cuanto mayor sea el número de células raras presentes en dicha muestra, mayor será la gravedad del estado de enfermedad, comprendiendo la mejora la adición de una célula estabilizada como se ha descrito anteriormente para uso como célula de control interno en dicho procedimiento. En una realización de lo anteriormente mencionado, el ligando es un anticuerpo dirigido contra EpCAM y el reactivo se une específicamente a citoqueratina.

20 En una realización adicional de la presente invención se proporciona un kit que facilita la práctica de los procedimientos descritos en este documento. Un kit a modo de ejemplo para aislar células (tumorales) epiteliales en circulación en sangre humana incluye: nanopartículas magnéticas recubiertas que comprenden un material de núcleo magnético, un material de recubrimiento basado en proteína y un anticuerpo que se une específicamente a células derivadas de epiteliales, estando el anticuerpo acoplado directa o indirectamente a dicho material de recubrimiento base; al menos un anticuerpo que tiene especificidad de unión por las células tumorales derivadas de epiteliales que está marcado con una marca detectable; y células de control estabilizadas como se han descrito anteriormente. El kit puede contener opcionalmente reactivos permeabilizantes, tampones de lavado y/o de dilución, reactivos de agregación, anticuerpos detectablemente marcados adicionales o colorantes específicos de células adicionales.

25 Otro aspecto de la invención es un medio de almacenamiento de densidad similar al de las células de control, es decir, un medio de densidad de flotación neutra. Esto asegurará que las células de control queden bien dispersas de manera que puedan pipetarse con mayor precisión.

40 **UNA BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Figuras 1A-1C: Análisis de citometría de flujo de células de control.

Fig. 2: Estabilidad de células SKBR-3 fijadas (previamente marcadas con MAb HER2neu-Cy2™) en paraformaldehído (PFA) en exceso o sin PFA, en comparación con células frescas.

45 Fig. 3: Densidad de antígenos como se mide por intensidad media de fluorescencia en 18 pacientes con cáncer de mama.

Fig. 4a-e: Análisis en Cell Spotter® de células seleccionadas con EpCAM-ferrofluido a partir de sangre de paciente con cáncer de próstata.

Fig. 5a-d: Análisis de citometría de flujo de células seleccionadas con EpCAM-ferrofluido a partir de sangre, con y sin una adición de células tumorales.

50 Fig. 6a-d: Análisis de citometría de flujo de células seleccionadas con EpCAM-ferrofluido a partir de sangre, sin una adición de células tumorales.

Fig. 7a-d: Análisis de citometría de flujo de células seleccionadas con EpCAM-ferrofluido a partir de sangre, con adición de células tumorales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones generales

A menos que se indique de otro modo, los términos de uso general en toda la presente memoria descriptiva se definen del siguiente modo.

- 5 El término "bioentidades diana" como se usa en este documento se refiere a una variedad de materiales de interés biológico o médico. Ejemplos incluyen hormonas, proteínas, péptidos, lectinas, oligonucleótidos, fármacos, sustancias químicas, moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y/o ADN) y analitos particulados de origen biológico que incluyen biopartículas tales como células, virus, bacterias y similares.
- 10 El término "células raras" como se usa en este documento se refiere a una variedad de células, microorganismos, bacterias y similares. Las células se caracterizan como raras en una muestra porque 1) no están presentes en muestras normales del mismo origen, y 2) están a varios órdenes de magnitud de concentración más bajos que las células típicas en una muestra normal. En una realización preferida de la invención, células cancerosas en circulación, células viralmente infectadas o células fetales en circulación materna pueden aislarse eficazmente a partir de células no diana y/u otras bioentidades usando las composiciones, procedimientos y kits de la presente invención.
- 15 El término "especimen biológico" incluye, sin limitación, fluidos corporales que contienen células, sangre periférica, aspirados de médula ósea, biopsias de médula ósea, biopsias de tejido linfático, homogeneizados de tejido, aspirados con aguja fina, fluidos serosos, fluidos espinales, piel, mucosa, aspirados de pezón y cualquier otra fuente de células que pueda obtenerse a partir de un sujeto humano. Un homogeneizado de tejido a modo de ejemplo puede obtenerse a partir del ganglio centinela en una paciente con cáncer de mama. También pueden obtenerse especímenes biológicos de muestras de agua tratadas y productos alimenticios.
- 20 El término "determinante", cuando se usa en referencia a cualquiera de las anteriores bioentidades diana, puede estar específicamente unido por un ligando bioespecífico o un reactivo bioespecífico, y se refiere a que la porción de la bioentidad diana que participa en, y es responsable de, la unión selectiva a una sustancia de unión específica cuya presencia se requiere para que se produzca la unión selectiva. En términos fundamentales, los determinantes son regiones de contacto molecular sobre bioentidades diana que son reconocidas por receptores en reacciones de pares de unión específica.
- 25 El término "par de unión específica" como se usa en este documento se refiere a cualquier sustancia que reconoce e interactúa selectivamente con un determinante en una bioentidad diana. Los pares de unión específica incluyen interacciones de antígeno-anticuerpo, receptor-hormona, receptor-ligando, agonista-antagonista, lectina-carbohidrato, secuencias híbridantes de ácido nucleico (ARN o ADN), receptor de Fc o IgG de ratón-proteína A, avidina-biotina, estreptavidina-biotina y virus-receptor. Se contemplan diversas otras combinaciones de determinante-sustancia de unión específica en la práctica de los procedimientos de la presente invención tales como serán evidentes para aquellos expertos en la materia. El término "anticuerpo" como se usa en este documento incluye inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos de inmunoglobulina inmunorreactiva y anticuerpos monocatenarios. En la invención también se contemplan para uso péptidos, oligonucleótidos o una combinación de los mismos que reconocen específicamente
- 30 determinantes con especificidad similar a anticuerpos tradicionalmente generados.
- 35 El término "marca detectable" se usa en este documento para referirse a cualquier sustancia cuya detección o medición, tanto directa como indirectamente, por medios físicos o químicos, es indicativa de la presencia de la bioentidad diana en una muestra de prueba. Ejemplos representativos de marcas detectables útiles incluyen, pero no se limitan a, moléculas o iones directa o indirectamente detectables basados en propiedades de absorbancia de la luz, fluorescencia, índice de reflexión, dispersión de la luz, fosforescencia o luminiscencia; moléculas o iones detectables por sus propiedades radiactivas; moléculas o iones detectables por sus propiedades de resonancia magnética nuclear o paramagnéticas. Entre el grupo de moléculas indirectamente detectables basado en la absorbancia de la luz o la fluorescencia están incluidas, por ejemplo, diversas enzimas que hacen que sustratos apropiados conviertan, por ejemplo, moléculas no absorbentes de la luz en absorbentes de la luz, de moléculas no fluorescentes en fluorescentes.
- 40 La expresión "colorantes específicos de células" describe un colorante libre o sin conjugar que tiñe un elemento celular específico (por ejemplo, tinciones nucleares que diferencian ADN y ARN), o un colorante conjugado con un aglutinante que se une selectivamente a y tiñe un receptor celular específico.
- 45 La frase "para la exclusión sustancial de" se refiere a la especificidad de la reacción de unión entre el ligando bioespecífico o reactivo bioespecífico y su determinante diana correspondiente. Los ligandos y reactivos bioespecíficos que tienen actividad de unión específica por su determinante diana también pueden presentar aún un bajo nivel de unión no específica a otros componentes de muestra.
- 50 La expresión "cáncer en fase temprana" como se usa en este documento se refiere a aquellos cánceres que han sido clínicamente determinados que están confinados en órgano. También se incluyen tumores demasiado pequeños para ser detectados por procedimientos convencionales tales como mamografía para pacientes con cáncer de mama o rayos X para pacientes con cáncer de pulmón. Aunque la mamografía puede detectar tumores que tienen aproximadamente 2×10^8 células, los procedimientos de la presente invención deberán permitir la detección de células cancerosas en circulación de tumores que se aproximan a este tamaño o más pequeño.

- 5 El término “enriquecimiento” como se usa en este documento se refiere a aumentar la relación de células diana con respecto a células totales en una muestra biológica. En los casos en los que la sangre periférica se use como materiales de partida, los eritrocitos no se cuentan cuando se evalúa el grado de enriquecimiento. Usando el procedimiento de la presente invención, las células epiteliales en circulación pueden enriquecerse con respecto a los leucocitos hasta el punto de al menos 2.500 veces, más preferentemente 5.000 veces, y lo más preferentemente 10.000 veces.
- 10 El término “ensayo” como se usa en este documento se refiere a un procedimiento o una serie de procedimientos que usa reactivos conocidos con el fin de determinar la ausencia o presencia de una bioentidad diana en un espécimen biológico. Un ensayo puede incluir reactivos cuantificados y protocolos establecidos para evaluar la presencia, ausencia o la actividad de una entidad biológica.
- 15 El término “sistema de prueba” se usa en este documento para significar el procedimiento completo usando reactivos conocidos para determinar la ausencia o presencia de una bioentidad diana en un espécimen biológico. La prueba se realiza por un operador con el sistema que incluye al menos un ensayo, el hardware y software (si los hay) usados para realizar el (los) ensayo(s) y el análisis de los resultados del (de los) ensayo(s).
- El término “patrón” se usa en este documento para significar materiales que se usan para ajustar y/o calibrar un instrumento y que no requieren preparación adicional. Además, los patrones tienen propiedades específicas similares al analito, por ejemplo, una población de microperlas que tiene una intensidad y longitud de onda específicas para establecer el intervalo de análisis de un instrumento y/o cuantificar la intensidad de fluorescencia.
- 20 El término “control” describe una sustancia o mezcla de composición conocida con propiedades que se encuentran dentro de intervalos predeterminados y se diseña para someterse a los mismos protocolos de procesamiento que el analito o sustancia de interés para garantizar que los reactivos y/o preparaciones de células están funcionando como se espera.
- El término “control de isotipo” se refiere al uso de un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo, misma especie, pero dirigido contra un antígeno irrelevante. Los controles de isotipo se usan ampliamente para establecer el nivel discriminatorio entre el fondo no específico y la tinción fluorescente positiva.
- 25 El término “control externo” como se usa en este documento se refiere a cualquier sustancia o mezcla de composición conocida que se somete a las mismas condiciones que la sustancia de prueba dentro de un ensayo o un sistema de prueba con el fin de establecer una base para la comparación con la sustancia de prueba. Un control externo puede ser un control positivo o uno negativo y pueden usarse múltiples controles externos dentro de un sistema de prueba.
- 30 El término “control interno” se refiere a cualquier sustancia o mezcla de composición conocida que se añade a o se mezcla con una sustancia de prueba dentro de un sistema de prueba para establecer una base para la comparación con la sustancia de prueba. En virtud de la presencia simultánea de la sustancia de prueba y la sustancia de control, las dos sustancias se someten a condiciones idénticas dentro del sistema de prueba, proporcionando una medida explícita de la eficacia de todo el sistema de prueba. En una realización preferida de la invención, una alícuota de células de control funcionales cuantificadas y apropiadamente marcadas añadida a una muestra de sangre de paciente proporciona no sólo un control interno del sistema de prueba, sino también un control cuantificable y analítico de la recuperación de células en el sistema de prueba. En otras palabras, basándose en la recuperación de células de control al final del análisis es posible considerar no sólo cuántas células diana se recuperaron en realidad, sino también qué volumen de muestra se procesó en realidad. Esto permite una predicción más exacta del intervalo de incidencia de células tumorales en la muestra del paciente.
- 35 El término “control negativo” como se usa en este documento se refiere a una sustancia de control interno o externo que se comporta de un modo generalmente similar a la bioentidad diana. Sin embargo, la sustancia de control negativo carece al menos de uno de los determinantes característicos que diferencian la bioentidad diana de otras entidades biológicas, de forma que al final del ensayo o del procedimiento de prueba la sustancia de control negativo no se detecta.
- 40 El término “control positivo” se refiere a una sustancia de control interno o externo que se comporta de un modo similar a la bioentidad diana, e incluye los determinantes característicos que se usan en el ensayo o procedimiento de prueba para distinguir la bioentidad diana de otras entidades biológicas. De hecho, en algunos casos un control positivo funciona en realidad como la bioentidad diana. Un control positivo sometido a un ensayo o a un sistema de prueba está presente al final del ensayo o el procedimiento de prueba, asegurándose así que si el control positivo hubiera sido la bioentidad diana se habría detectado. Obsérvese que es sólo tras el análisis de los resultados cuando el control positivo se “separa” de la sustancia diana.
- 45 El término “fijado” como se usa en este documento se refiere a la práctica de añadir un compuesto químico para conservar la estructura celular para el análisis. Los agentes de fijado tradicionales incluyen, pero no se limitan a, paraformaldehído, glutaraldehído, metanol u otros alcoholes. Aunque una célula fijada sigue siendo físicamente estable durante un periodo prolongado, algunos antígenos celulares pueden no conservarse, que es perjudicial para cualquier procedimiento (tinción, separación, marcado, etc.) que requiera la integridad del antígeno.
- 50 El término “estabilizado” se usa en este documento para significar una célula fijada que mantiene la integridad del antígeno de un modo reproducible con el tiempo. Por tanto, una célula estabilizada puede teñirse satisfactoriamente y reproduciblemente, separarse o marcarse en una reacción específica de antígeno.
- 55

5 Las partículas magnéticas o ferrofluidos preferidos para uso en la realización de la presente invención son partículas que se comportan como coloides. Tales partículas se caracterizan por su tamaño de partícula submicrométrico que es generalmente inferior a aproximadamente 200 nanómetros (nm) y su resistencia a la separación gravitatoria de la disolución durante periodos de tiempo prolongados. Además de muchas otras ventajas, este intervalo de tamaño hace que sean esencialmente invisibles para las técnicas analíticas ópticas comúnmente aplicadas a análisis de células. Las partículas dentro del intervalo de 90-150 nm y que tienen entre el 70-90% de masa magnética se contemplan para uso en la presente invención. Partículas magnéticas adecuadas están compuestas por un núcleo cristalino de material superparamagnético rodeado por moléculas de recubrimiento que están unidas, por ejemplo, físicamente absorbidas o covalentemente unidas, al núcleo magnético y que confieren propiedades coloidales estabilizantes. El material de recubrimiento deberá aplicarse preferentemente en una cantidad eficaz para evitar interacciones no específicas entre macromoléculas biológicas encontradas en la muestra y los núcleos magnéticos. Tales macromoléculas biológicas pueden incluir residuos de ácido siálico en la superficie de células no diana, lectinas, glicoproteínas y otros componentes de la membrana. Además, el material de recubrimiento deberá contener una relación de masa magnética/nanopartícula tan alta como sea posible. El tamaño de los cristales magnéticos que comprenden el núcleo es suficientemente pequeño de forma que no contienen un dominio magnético completo. El tamaño de las nanopartículas es tal que su energía browniana supera su momento magnético. Por consiguiente, no parece se produzca que el alineamiento de Polo norte a Polo sur y la posterior atracción/repulsión mutua de estas partículas magnéticas coloidales incluso en campos magnéticos moderadamente fuertes, contribuyendo a su estabilidad en disolución. Finalmente, las partículas magnéticas deberán poder separarse en separadores de campo externo de alto gradiente magnético. Esta característica facilita la manipulación de muestras y proporciona ventajas económicas con respecto a las columnas de gradiente interno más complicadas cargadas con perlas ferromagnéticas o lana de acero. Las partículas magnéticas que tienen las propiedades anteriormente descritas pueden prepararse por modificación de materiales base descritos en la patente de EE.UU. nº 5.698.271. En una realización preferida de la invención, partículas magnéticas recubiertas con anticuerpo dirigido contra EpCAM se preparan como se describe en el documento US-A-6365362. En estos procedimientos de aislamiento de células raras también pueden usarse partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-epiteliales comercializados por otras empresas que incluyen Miltenyi Biotec y Dynal.

La siguiente tabla muestra líneas celulares a modo de ejemplo que pueden usarse como fuente de células de control. Cada una de estas líneas celulares expresa marcadores de superficie que son específicos para la enfermedad, haciendo que sean candidatos útiles para células de control.

Línea celular	Marcador	Origen tumoral
SKBR3	Mamoglobulina	Mama
	Globulina de grasa láctea humana	
	Her2neu	
MCF-7	Receptor estrogénico	Mama
LNCaP	PSMA	Próstata
	PSA	
	Receptor androgénico	
CEM	CD4	Leucemia de linfocitos T
Raji	CD19	Leucemia de linfocitos B
SU-DHL	CD20	B-NHL
C32	CD146	Melanoma

30 Pueden usarse otras líneas celulares tumorales como fuente de células de control siempre que tengan marcadores de superficie y la capacidad de aceptar marcas adicionales. Hay líneas celulares similares para cánceres de colon y de vejiga, además de líneas celulares adicionales para cánceres de mama y de próstata.

35 El ensayo de células raras como se aplica a la determinación de células tumorales en circulación implica la selección y la detección de células cancerosas presentes en sangre. Las células tumorales en pacientes con tumores derivados de epiteliales pueden estar presentes en frecuencias inferiores a una célula por ml de sangre. Esto es por lo que se prefiere procesar 5-10 ml de sangre por ensayo. Un ensayo de la invención a modo de ejemplo consiste en varias etapas:

- 1) Incubación de sangre con partículas magnéticas unidas a un anticuerpo que es específico para células epiteliales con el fin de marcar células tumorales epiteliales en sangre;
- 2) Separación de células magnéticamente marcadas de células sin marcar por separación magnética, seguida de una etapa de lavado para eliminar cualquier leucocito remanente;
- 3) Selección adicional de células epiteliales mediante marcado con un anticuerpo específico para células epiteliales conjugado con un fluorocromo; y

4) Análisis de células por diferentes plataformas ópticas para determinar números y tipos de células.

Pueden usarse dos tipos de controles. Un control es externo, en el que un número conocido de células tumorales epiteliales se añade a una muestra de sangre de control normal, que entonces se ensaya junto con la muestra del paciente. El ensayo de control externo permite determinar la recuperación de células tumorales añadidas, que deberá encontrarse dentro de especificaciones establecidas. Puede ser difícil utilizar un ensayo tal debido a que el laboratorio puede no tener células para añadir a la sangre, o puede que no pueda obtener una muestra normal de 5-10 ml de sangre. En las etapas manuales del procedimiento de ensayo, los controles externos pueden no ser ideales ya que no controlan errores aleatorios del operador con respecto a la adición de reactivos y el barrido de cualquier reactivo. En tales casos, el mejor control será interno, en el que el número de células epiteliales añadidas a una muestra del paciente puede recuperarse y detectarse.

Con el fin de diferenciar un gran número de células de control añadidas de un número más pequeño de células tumorales reales presentes en la sangre del paciente, las células de control añadidas deben marcarse previamente con un colorante fluorescente específico u otro marcador con la alta eficiencia de marcado (inferior a una célula sin marcar en 10^5). Puede usarse más de un tipo de marca para garantizar adicionalmente que no estén presentes células de control sin marcar. Sin embargo, normalmente no se necesita tal marcado redundante. La presencia de esta marca específica sobre las células durante el análisis indicará una célula de control. Para utilizar una prueba tal es necesario proporcionar controles marcados positivos junto con el ensayo. Pueden usarse células tumorales cultivadas con los marcadores apropiados como controles positivos, pero no son estables durante más de 24 horas. Por tanto, las células de control marcadas positivas deberán marcarse previamente y estabilizarse para el uso a largo plazo. Los antígenos específicos presentes en controles positivos también deberán conservarse durante el marcado previo y seguirán conservándose bajo condiciones de almacenamiento adecuadas.

El número de células de control recuperadas al final del procedimiento transmite cierta información al analista. Garantiza que la prueba se realizó correctamente y que los reactivos y los sistemas estuvieron funcionando apropiadamente. La recuperación de células tumorales a partir de sangre completa, como se describe en el documento US-A-6365362, no describe el uso de células de control. En muestras biológicas artificialmente creadas usando células tumorales cultivadas en sangre, por ejemplo, células de control añadidas cultivadas, las recuperaciones de las células añadidas oscilan del 60-95%. Las células pueden perderse en numerosas etapas en el procedimiento, que incluyen separación, lavado, resuspensión y transferencia de la muestra a la plataforma de análisis, además de la eficiencia de la plataforma de análisis. Si se usa un citómetro de flujo como plataforma de análisis, frecuentemente queda una pequeña cantidad de líquido en el fondo del tubo de muestra que conduce a un gran componente del error. Aquellos expertos en la materia de la citometría de flujo generalmente explican esta fuente de error no reproducible constante en sus análisis usando una fuente independiente de acontecimientos para comparar con sus recuentos.

Desafortunadamente, en un sistema biológico nunca puede suponerse que dos células diferentes se comportarán idénticamente. Por tanto, en un procedimiento de aislamiento de células raras no puede suponerse que las células diana y las células de control se recuperen a una velocidad idéntica. Sin embargo, puede mostrarse que células tumorales de pacientes y células de cáncer de mama cultivadas comparten muchas características pertinentes, se comportan de un modo similar y pueden usarse para reflejar con exactitud la recuperación. Es importante observar que de la descripción de la presente invención proporcionada en este documento no se da a entender que las células de control y las células epiteliales en circulación se recuperen en proporciones idénticas, solamente que se recuperan en el mismo intervalo. Como se describen en el documento US-A-6623982, el intervalo de densidad del antígeno de EpCAM, que se usa para la recogida magnética, es similar en muestras de pacientes y en líneas celulares cultivadas. Hay muchas líneas de células cancerosas disponibles para el analista, que incluyen líneas Colo204, SKBR-3, MCF-7, BT474 y PC3. Estas líneas celulares expresan grados variables del antígeno de EpCAM, pero como se muestra en la Fig. 3, las densidades de antígenos de las líneas celulares reflejan las densidades de antígeno de las células tumorales encontradas en realidad en pacientes con cáncer de mama. Además, como se muestra en el documento US-A-6623982 y el Ejemplo 5 en esta memoria descriptiva, la recuperación de células después de la separación magnética de células de baja densidad de antígenos (la línea PC3) es significativamente inferior a la de células de alta densidad de antígenos (la línea SKBR-3). Sin embargo, el uso de la técnica de agregación controlada enseñada en el documento US-A-6623982 pone la recuperación de las dos líneas celulares en el mismo intervalo, compensando la baja densidad de antígenos. Las células de control descritas en la presente solicitud son células modificadas elegidas de entre estas líneas celulares. Las densidades de antígenos de células de control también se encuentran en el intervalo de las densidades de antígenos encontradas en pacientes reales con cáncer de mama. Adicionalmente, la técnica de agregación controlada descrita en el documento US-A-6623982 se usa para poner la recuperación de células tumorales de baja densidad de antígenos en el mismo intervalo que las células con la mayor densidad de antígenos. Por tanto, la recuperación de células de control y células tumorales del paciente deberá ser comparable, aunque las células tumorales en el paciente tengan un bajo nivel de densidad de antígenos.

En vista de esta discusión es tentador asumir que si se añadieron 1000 células de control a 10 ml de sangre completa de un paciente con cáncer y se recuperaron 800 células de control y 8 células tumorales, entonces había 10 células tumorales en la muestra de sangre de 10 ml original. Sin embargo, como se acaba de reconocer, la recuperación de células de control y la recuperación de células tumorales son similares, no idénticas. Adicionalmente, cuando se trata con acontecimientos raros, tales cálculos proporcionales no están garantizados. Es más preciso concluir que se recuperaron 8 células tumorales de un volumen inicial de 10 ml en una prueba que también recuperó el 80% de las células de control. Por supuesto, este resultado supone que las células de control se recuperaron en la región apropiada del histograma de citometría de flujo o con las características fluorescentes apropiadas, si se usa una plataforma óptica diferente.

Una ventaja de las células de control y los procedimientos de uso de las mismas de la presente invención es que si se recupera un número razonable de células de control con las características fluorescentes apropiadas no puede cuestionarse que cuando las células epiteliales se recuperen de una muestra del paciente de sangre sean todo menos células epiteliales. Excepto algunas enfermedades extrañas, las fuentes de células epiteliales en circulación son aquellas liberadas de los tumores. El diseño de los anticuerpos usados eficazmente elimina la unión no específica a un grado tal que los recuentos de células tumorales en un único dígito pueden observarse entre $5-10 \times 10^7$ leucocitos en una muestra de sangre de 10 ml. Sin embargo, la exactitud de esta prueba puede potenciarse mediante el uso de un control para confirmar que los reactivos y el procedimiento están funcionando correctamente. La aparición de un gran número de células de control apropiadamente localizadas que hacen de control interno positivo valida el procedimiento de prueba y los resultados.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente con cierto detalle el procedimiento de uso de las células de control de la presente invención. También se exponen varias realizaciones preferidas para poner en práctica los procedimientos de la invención. Estos ejemplos pretenden ilustrar en vez de limitar la invención. Aunque estos ejemplos muestran el uso eficaz de células de control en la selección de células tumorales en circulación, debe ser evidente para un experto en la materia que con la elección apropiada de anticuerpos, líneas celulares y partículas magnéticas la enseñanza de la presente invención puede extenderse a la selección de otras células raras de otros especímenes biológicos.

Ejemplo 1: Preparación de células de control previamente marcadas estabilizadas

Las células de control positivo pueden marcarse previamente con diversos marcadores. Un procedimiento implica marcar células usando un colorante fluorescente lipófilo específico de membrana. Hay numerosos tipos de colorantes de membrana conocidos en la técnica que están comercialmente disponibles. Las carbocianinas están entre los colorantes de membrana que se absorben más fuertemente. Los colorantes de membrana marcan células uniéndose a los lípidos de la membrana. Es importante que este marcado no evite la unión del anticuerpo a antígenos epiteliales específicos. La unión del colorante a células deberá ser esencialmente no reversible, y no deberá producirse la fuga durante el almacenamiento y los procedimientos de prueba. Otra solución es marcar células usando un conjugado de anticuerpo fluorescente específico para antígenos de superficie celular. Otra solución implica marcar componentes celulares con colorantes fluorescentes. Ejemplos de esta solución incluyen, sin limitación, DAPI y Hoechst 33342 para ADN bicatenario, naranja de acridina para ADN y ARN, diversos derivados de rodamina para mitocondrias y el retículo endoplásmico, rojo neutro para lisosomas o BODIPY lipófilo para el aparato de Golgi. En el presente ejemplo se describe el marcado de células con un colorante de membrana fluorescente lipófilo.

En este ejemplo se usaron células cultivadas derivadas de cáncer de mama. Las células SKBR-3 que se adherieron al matraz se desprendieron con tripsina y se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) por centrifugación. Las células se lavaron una segunda vez con Diluyente C (Sigma, nº de cat. CGL-DIL). Entonces, las células se resuspendieron en Diluyente C y la concentración de células se ajustó a 1×10^6 células/ml. Se seleccionó un colorante fluorescente específico de membrana, perclorato de 3,3'-dihexadeciloxocarbocianina ($\text{DiOC}_{16}(3)$), para marcar células. El $\text{DiOC}_{16}(3)$ se compró de Molecular Probes (número de catálogo D-1125). El colorante tenía emisión de fluorescencia máxima a 501 nm. Se preparó una disolución madre de $\text{DiOC}_{16}(3)$ 50 μM en manitol al 5% con dimetilsulfóxido al 1%. Las células lavadas se mezclaron con disolución de $\text{DiOC}_{16}(3)$ a 1:1. Entonces, el tubo se cubrió bien de lámina de aluminio y se dejó que el marcado avanzara a temperatura ambiente durante 30 minutos con mezclado ocasional. La muestra se centrifugó a 2.000 rpm durante 5 minutos para eliminar el colorante sin reaccionar de las células. El sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en PBS. Las células se lavaron de nuevo por centrifugación. El sedimento de células se resuspendió en disolución permeabilizante (parte de Immunicon nº 6025) y se ajustó a una concentración de células de 1×10^6 /ml. La etapa de permeabilización permite la unión de antígenos intracelulares por anticuerpos específicos de antígeno. Las células se incubaron con disolución permeabilizante durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de la etapa de permeabilización, las células se fijaron para potenciar la estabilidad. Las células se centrifugaron para eliminar la disolución permeabilizante en exceso. El sedimento de células se resuspendió en PBS y se lavó una vez más con centrifugación. Finalmente, las células se resuspendieron de nuevo en PBS a una concentración de células hasta 1×10^6 células/ml. Se añadió paraformaldehído (PFA) a la suspensión de células a una concentración final del 0,5%. El tubo se cubrió con lámina de aluminio y las células se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con mezclado. Después de 2 horas, el PFA en exceso se eliminó por centrifugación. El sedimento de células se resuspendió en PBS y se lavó dos veces por centrifugación. Después del segundo lavado, el sedimento de células se resuspendió en PBS y la concentración de células se ajustó a aproximadamente $1,0-2,0 \times 10^5$ células/ml. Las células se almacenaron en la oscuridad a 4°C. Las células $\text{DiOC}_{18}(5)$ y otros marcadores usando protocolos similares. También pueden usarse protocolos adecuados para teñir células adherentes como se conocen en la técnica.

Los colorantes preferidos para preparar controles son colorantes lipófilos fluorescentes con una alta afinidad por componentes lipófilos de la membrana celular. Los requisitos para tales colorantes son: espectros de excitación/emisión adecuados para minimizar la interferencia con colorantes de detección para células diana, tinción eficaz y uniforme de todas las células, unión sustancialmente irreversible a la membrana celular, escape y transferencia mínimos del colorante durante el almacenamiento, estabilidad óptica al fotoblanqueamiento tanto durante el almacenamiento a largo plazo como a la irradiación intensa por luz láser. Los colorantes de membrana que cumplen ampliamente estos requisitos se ejemplifican conjuntamente como carbocianinas, indocarbocianinas e indodicarbocianinas lipófilas de cadena larga designadas por las abreviaturas $\text{DiOC}_{12}(3)$, $\text{DiOC}_{12}(5)$, $\text{DiOC}_{12}(7)$, $\text{DiOC}_{14}(3)$, $\text{DiOC}_{14}(5)$, $\text{DiOC}_{14}(7)$, $\text{DiOC}_{16}(3)$, $\text{DiOC}_{16}(5)$, $\text{DiOC}_{16}(7)$, $\text{DiOC}_{18}(3)$, $\text{DiOC}_{18}(5)$, $\text{DiOC}_{18}(7)$ para las carbocianinas y los análogos de carboindocianinas (Dil) y carboindodicianinas

(DiD) correspondientes y derivados de los mismos. Tal marcado redundante puede hacerse opcionalmente mediante adición concurrente o secuencial del segundo colorante de marcado previo, y tanto antes como después de la fijación de células de control. También pueden usarse derivados de disulfonato (DS) y sulfopropilo (SP) más solubles ejemplificados por DiIC18(5)-DS y SP-DiOC18(3) como tinciones de la membrana. También son adecuados colorantes de aminoestirilo lipófilos designados como los colorantes DiA, por ejemplo, 4-Di-16-ASP. En general, los análogos de cadena larga de numerosos colorantes fluorescentes, por ejemplo, rodamina B C18 y fluoresceína C18, también tienen altas afinidades por la membrana. También están disponibles y pueden aplicarse tinciones para otros orgánulos celulares. La mayoría de estos colorantes están disponibles de Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, o pueden sintetizarse por procedimientos publicados (F.M. Hamer, The Cyanine Dyes and Related Compounds, Interscience, 1964).

También pueden prepararse células de control marcando antígenos de la superficie celular con anticuerpos fluorescentes con afinidad por tales antígenos como se ejemplifica preparando células SKBR de control marcadas con anticuerpo HER81 fluorescente. El marcado de dos componentes celulares diferentes también permite el marcado dual superficial de células de control con dos fluoróforos estructural y espectralmente diferentes. El marcado previo redundante de elementos celulares estructurales diferentes o iguales da lugar a células de control que reducen adicionalmente la ya baja probabilidad de clasificar erróneamente una célula de control como célula tumoral. Por ejemplo, cuando se marca una vez una célula de control existe una probabilidad inferior a <1 entre 1000 de que no se marque de forma detectable. El marcado redundante de células de control reduce este fallo en la probabilidad de marcado a <1 entre 1 millón de células.

La Fig. 1 muestra el análisis de citometría de flujo de 5.000 células de control en 500 μ l de PBS. Se fijó un umbral en la dispersión de la luz hacia adelante y las células se prohibieron en la dispersión de ángulo hacia adelante y recto. La Figura 1a muestra el histograma de la intensidad de fluorescencia en FL1 ($\lambda=530\pm30$ nm). La Figura 1b muestra el histograma de la intensidad de fluorescencia en FL2 ($\lambda=585\pm42$ nm). La Figura 1c muestra el histograma de la intensidad de fluorescencia en FL3 ($\lambda=670$ +nm). Como puede verse en los histogramas, todas las células se tiñeron homogéneamente.

Ejemplo 2: Preparación de células de control previamente marcadas usando un anticuerpo conjugado con un colorante fluorescente

En este ejemplo se usaron de nuevo las células tumorales cultivadas SKBR-3 descritas en el Ejemplo 1. Sin embargo, las células se marcaron previamente con un anticuerpo Her2neu conjugado con un colorante de cianina. Anti-Her2neu se une específicamente a un antígeno de superficie presente en ciertas células tumorales que incluyen SKBR-3. El MAb Her2neu se conjugó con un colorante Cy2™ usando un éster de N-hidroxisuccinimida del colorante Cy2™ (catálogo de Amersham nº PA22000) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células SKBR-3 adheridas al matraz se desprendieron con tripsina y se lavaron dos veces con PBS por centrifugación. Las células se resuspendieron en disolución de permeabilización y se tiñeron con el colorante Her2neu-Cy2® para el marcado. El reactivo de permeabilización no tuvo ningún efecto sobre la tinción de células con anticuerpo. La concentración final de anticuerpo durante la tinción fue 2 μ g/ml y la concentración de células fue 1×10^6 células/ml. La tinción y la permeabilización se hicieron en la oscuridad cubriendo el tubo con lámina de aluminio durante 15 minutos. Después de la permeabilización y la tinción, las células se fijaron para la estabilización del siguiente modo.

Las células se centrifugaron para eliminar el exceso de disolución permeabilizante y el anticuerpo sin reaccionar. El sedimento de células se resuspendió y se lavó una vez más con PBS. Las células se resuspendieron de nuevo en PBS y la concentración de células se ajustó a 1×10^6 células/ml. Se añadió cinco por ciento de PFA a las células, produciendo una concentración final de PFA del 0,5%. Las células se incubaron en un tubo cubierto con lámina de aluminio a temperatura ambiente durante 2 horas con mezclado constante. Después de dos horas, la muestra se dividió en dos tubos. Un tubo se almacenó en la oscuridad a 4°C sin eliminar el PFA en exceso. El PFA en exceso se eliminó del segundo tubo por centrifugación. El sedimento de células se resuspendió en PBS y se lavó dos veces por centrifugación. Después del segundo lavado, el sedimento de células se resuspendió en PBS y la concentración de células se ajustó a aproximadamente $1,0-2,0 \times 10^5$ células/ml. La suspensión de células final se almacenó en la oscuridad a 4°C.

Ejemplo 3: Estabilidad de células de control previamente marcadas

Las células frescas son generalmente estables durante sólo uno o dos días. Después de este tiempo, los antígenos empiezan a liberarse y pronto las células se disgregan, haciendo que el número de células disminuya drásticamente. Las células de control previamente marcadas descritas en los Ejemplos 1 y 2 permanecieron estables durante periodos mucho más largos. Se usaron dos criterios importantes para seguir la estabilidad: estabilidad física y estabilidad biológica. La estabilidad física se define como la presencia de una célula intacta en una suspensión. La estabilidad biológica se define como la conservación de antígenos presentes en superficies celulares y dentro de células. Tanto la estabilidad física como la biológica son indicadores importantes de la estabilidad funcional de células de control.

La estabilidad física de células de control se observó en función del tiempo determinando el número de células presentes en la suspensión usando citometría de flujo para el tamaño de célula, presencia de un núcleo e integridad de antígenos. Se comprobaron dos antígenos para la integridad, que son importantes en la presente invención para uso como células de control. El primer antígeno fue EpCAM, que se usa para capturar células. El segundo antígeno fue citoqueratina, que se usa para la detección. La adición de un número conocido de células a la sangre normal proporcionó los datos de estabilidad del antígeno mediante recuperación y posterior detección usando ferrofluido de EpCAM/anti-citoqueratina-fluorocromo. En este

ejemplo se examinó la estabilidad de células de control preparadas en el Ejemplo 2.

Estabilidad física: número de células

5

Las células preparadas como se describe en el Ejemplo 2 se almacenaron sin interrupciones en la oscuridad a 4°C. Un conjunto de células de control se fijó con PFA, eliminándose el PFA en exceso después de 2 horas. El otro conjunto de células fue idéntico, excepto que el PFA no se eliminó después de la fijación. En ambos casos, una muestra madre almacenada se diluyó y el número de células se determinó como se describe más adelante. Todos los recuentos de células se determinaron por triplicado.

10

Se añadieron doscientos microlitros de disolución de permeabilización a un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm. La disolución madre de células se mezcló con vórtex y al tubo de disolución de permeabilización se añadieron 20 µl de células. Entonces, 5 µl de anti-citoqueratina conjugada con PE se añadieron a las células para teñir el antígeno de citoqueratina. Las células se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron trescientos microlitros de PBS a cada muestra y se mezclaron. Se añadieron diez microlitros de colorante de ácido nucleico ProCOUNT (Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS), San Jose, CA) a la muestra para teñir el ADN presente en las células y se añadieron 10.000 (10 µl) de perlas fluorescentes (Beckman-Coulter, catálogo nº 6607007). Entonces, la muestra se analizó por el citómetro de flujo FACSCalibur usando FL1 como umbral. La fracción de perlas fluorescentes adquiridas en el citómetro de flujo se usó para determinar la cantidad de muestra analizada por citometría de flujo, que a su vez se usó para calcular el número de células de control presentes en la muestra. Este estudio se siguió en función del tiempo. Los resultados se muestran en la Tabla 1a.

15

Tabla 1a

Días	Células almacenadas en presencia de PFA en exceso (10 ⁵ células/ml)	Células almacenadas en ausencia de PFA en exceso (10 ⁵ células/ml)
1	1,5 ± 0,01	1,3 ± 0,2
15	1,3 ± 0,04	1,2 ± 0,1
30	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,04
60	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
90	1,4 ± 0,01	1,1 ± 0,1
120	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,04
180	1,7 ± 0,1	1,4 0,1
270	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1

20

Estabilidad biológica: Recuperación de células de control añadidas de la sangre

25

Se añadió un número conocido de células de control (como se ha determinado anteriormente), células almacenadas que contienen PFA o células frescas en tampón de células, a 1 ml de sangre empobrecida en plasma en un tubo de 12 x 75 mm. La sangre empobrecida en plasma se preparó centrifugando sangre para separar los glóbulos sanguíneos del plasma. Después de la centrifugación, la mayoría del plasma se eliminó por aspiración. Entonces, al sedimento se añadieron 0,5 ml de tampón de lavado-de dilución (catálogo de Immunicon nº B2110). Después de mezclar la muestra se añadieron 20 µl de EpCAM-ferrofluído a la muestra de sangre y se mezcló bien. El tubo se colocó en un separador magnético (catálogo de Immunicon nº QS-012) durante 10 minutos. El tubo se sacó del imán y la muestra se mezcló con vórtex, y se colocó de nuevo en el separador magnético durante 10 minutos para la recogida de células magnéticamente marcadas. La muestra sin recoger se aspiró y el tubo se sacó del separador magnético. Las células magnéticamente recogidas se resuspendieron en 0,75 ml de tampón de lavado-de dilución y se volvieron a separar en un separador magnético durante 10 minutos. La muestra sin recoger se desechó y las células recogidas se resuspendieron en 200 µl de disolución de permeabilización después de sacar el tubo del separador magnético.

30

35

Entonces, la muestra se tiñó con anticuerpos marcados para determinar la recuperación de células tumorales por citometría de flujo del siguiente modo. Se añadieron cinco microlitros de Mab conjugado con PE, que es específico para citoqueratina y está presente en células de control, a la muestra y se incubaron durante 15 minutos. Después de la incubación, 1 ml de tampón de lavado-de dilución se añadió al tubo y se realizó una separación magnética durante 10 minutos con el fin de eliminar los anticuerpos de tinción en exceso. Las células magnéticamente recogidas se resuspendieron en 500 µl de tampón de lavado-de dilución. Luego se añadieron 10 µl de colorante de ácido nucleico ProCOUNT y 10.000 (10 µl) de perlas fluorescentes (Beckman-Coulter, nº de catálogo 6607007). Entonces, la muestra se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur usando FL1 como umbral. La fracción de perlas fluorescentes adquiridas en el citómetro de flujo se usó para determinar la cantidad de muestra analizada por citometría de flujo que luego se usó para calcular la recuperación de células de control añadidas. Las recuperaciones en porcentaje de células de control se facilitan en la Tabla 1b.

40

Tabla 1b

Recuperación de células añadidas (%)			
Días	Células frescas	Células de control (almacenadas en presencia de PFA en exceso)	Células de control (almacenadas en ausencia de PFA en exceso)
1	72 ± 5	64 ± 6	82 ± 10
15	88 ± 5	74 ± 0,0	76 ± 4
30	97 ± 1	67 ± 1	93 ± 1
60	82 ± 4	48 ± 0,1	72 ± 6
90	86 ± 2	33 ± 0,0	64 ± 6
120	70 ± 2	34 ± 9	80 ± 1
180	88 ± 5	39 ± 0,0	69 ± 4
270	80 ± 4	35 ± 8	73 ± 1

La Tabla 1a muestra la estabilidad física de las células. No hay cambio significativo en la concentración de células hasta 270 días (9 meses) en presencia o en ausencia de PFA en exceso. Los cambios en la concentración de células de un momento de tiempo a otro son debidos a/están dentro de los errores experimentales. No hay tendencia durante el periodo de 270 días. Estos datos muestran que la estabilidad de las células puede mantenerse físicamente tratando células con PFA y guardándolas con o sin PFA en exceso.

La Tabla 1b muestra la recuperación de células de control en función del tiempo. Estos datos se representan en la Fig. 2 y muestran la estabilidad biológica de células de control. Los antígenos presentes sobre y en la célula deberán conservarse para la selección de glóbulos sanguíneos y la detección. El EpCAM presente sobre la superficie de células de control se usa para la selección de células, que se logra conjugando MAb dirigido contra EpCAM con partículas magnéticas. La unión y la selección de células de control por partículas magnéticas dirigidas contra EpCAM están directamente relacionadas con la presencia y la conservación de antígeno de EpCAM sobre las células. La recuperación de células de control disminuirá si el antígeno de EpCAM no está conservado, ya que las partículas magnéticas no se unirán a las células de control. Las células de control después de la selección se detectaron usando anti-citoqueratina conjugada con un fluorocromo. El antígeno de citoqueratina sólo está presente en células de control y no en glóbulos sanguíneos. Las células de control magnéticamente seleccionadas no se detectarán si el antígeno de citoqueratina no se conserva, y la recuperación de células de control será inferior. La conservación de tanto los antígenos de EpCAM como de citoqueratina es esencial para la recuperación de las células de control.

La recuperación de las células de control se comparó con células frescas en cada momento de tiempo. Se prepararon células frescas en el día en que se probaron. Como se observa en la Tabla 1b, no hubo cambio significativo en la recuperación de células frescas y células de control almacenadas sin PFA en exceso en función del tiempo. La recuperación de las células de control que se almacenaron en presencia de PFA en exceso tendió a disminuir significativamente con respecto a la de las células frescas. Esto muestra que la presencia de PFA durante el almacenamiento de células daña al antígeno haciéndolo reaccionar con los sitios activos expuestos. Este estudio muestra que la exposición de PFA a células durante un periodo de tiempo limitado mantendrá las células física y biológicamente estables.

Ejemplo 4: Análisis de niveles de antígeno de EpCAM sobre células tumorales en pacientes con cáncer de mama

En este ejemplo y en el siguiente se mostrará que las células de cáncer de mama encontradas en pacientes tienen una densidad de antígenos de EpCAM altamente variable que puede variar durante un intervalo de 1-3 logaritmos. Sin embargo, a pesar de esta alta variabilidad, también se muestra en el siguiente ejemplo que la técnica de separación magnética empleada captura satisfactoriamente un porcentaje reproducible de células tumorales, tanto si tienen como si no altas o bajas densidades de antígenos. La conclusión que puede extraerse de estos resultados es que la recuperación de células de control refleja con exactitud la recuperación de células tumorales en circulación en muestras de pacientes.

Se trocearon finamente con tijeras biopsias de dieciocho cánceres de mama patológicamente confirmados que oscilaban en tamaño de 0,1-2,5 cm, almacenados en solución salina, y luego se pasaron a través de un filtro de nailon de 53 µm (SpectraMesh, SPECTRUM, Houston, TX) para eliminar grupos de células grandes. Las células se lavaron en PBS/BSA al 1%/EDTA 50 mM (tampón de células), luego se resuspendieron en tampón de células. Los recuentos de células nucleadas totales se realizaron por hemocitómetro con naranja de acridina/bromuro de etidio.

Se colocaron aproximadamente 20.000-50.000 células nucleadas totales (10-50 µl de suspensión de células) en cada uno de dieciocho conjuntos de tres tubos de 12 x 75 mm. El volumen se enrasó hasta 150 µl con tampón de células. Entonces, todos los tubos recibieron 0,25 µg de CD45 PerCP. El tubo 1 no recibió reactivo (control de autofluorescencia), el tubo 2 recibió 20 µl de control de isotipo PE FastImmune y el tubo 3 recibió 0,25 µg del MAb EpCAM-PE. Las suspensiones de células se incubaron con reactivos durante 15 minutos, luego se añadió 1 ml de tampón de células a cada tubo, y los tubos se centrifugaron. Los sobrenadantes se eliminaron cuidadosamente y los sedimentos de células se resuspendieron en 500 µl

de disolución de lisado FACS (BDIS). En este momento se añadieron 3,0 µg (10 µl a 300 µg/ml) del colorante de ácido nucleico ProCOUNT y 50 µl de perlas FACSCount Counting Control High (BDIS) a cada tubo. Entonces, las muestras se ejecutaron en un FACSCalibur (BDIS) con umbral fijado en FL1 y el voltaje del fotomultiplicador de FL2 se ajustó de forma que las señales de autofluorescencia de las células sin tñer estuvieran presentes en la primera década.

5 Las poblaciones de células que se tñeron con el colorante de ácido nucleico y EpCAM, pero que no se tñeron con CD45, se consideraron las células tumorales dentro de las suspensiones de células. La intensidad media de fluorescencia de las células positivas para EpCAM se determinó para cada muestra de tumor de mama. La Fig. 3 ilustra la intensidad media de fluorescencia de cada una de las células tumorales en cada una de las 18 biopsias de cáncer de mama. El intervalo de tñción de fondo se indica a lo largo del eje vertical con flechas de puntos. Los intervalos encontrados para la intensidad media de fluorescencia para una variedad de líneas celulares tumores Colo204 (alta), SKBR-3, MCF-7, BT474 y PC3 (baja) se indican en el eje derecho.

Ejemplo 5: Recuperación de células de baja y alta densidad de antígenos de EpCAM con adiciones de la sangre con y sin agregación de MAb CA-EpCAM-ferrofluido.

15 Las células de carcinoma de mama (SKBR-3) tienen densidad de antígenos aproximadamente 7 veces superior a EpCAM, en comparación con células PC3, y se eligieron como modelo de células tumorales de alta densidad de antígenos para este ejemplo. Se añadió un número conocido de células SKBR-3 o PC3 en tampón de células a 1 ml de sangre lavada por separado en un tubo de 12 x 75 mm. La sangre lavada se preparó mezclando 10 ml de sangre anticoagulada con ácido-citrato-dextrosa (ACD) con 10 ml de tampón de lavado-de dilución (catálogo de WDB Immunicon nº B2110) comprendida en un tampón fosfato que contenía proteínas para evitar cualquier unión no específica de células a los reactivos. Entonces se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm. El sobrenadante se aspiró, y el volumen se aumentó hasta 20 ml con WDB. Se mezcló y se centrifugó de nuevo. El sobrenadante se aspiró, y el volumen se aumentó hasta 10 ml, produciendo 10 ml de "sangre lavada". Se añadieron quinientos microlitros de WDB y 15 µl de PBS que contenían reactivo de agregación (estreptavidina, parte de Immunicon nº 6026) a la muestra. Después de mezclar la muestra se añadieron 25 µl de ferrofluido de moléculas de adhesión a células epiteliales de agregación controlada (FF de CA-EpCAM, parte de Immunicon nº 6029) y la muestra de sangre se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos. Después de la incubación, el tubo se colocó en un separador magnético de cuádrupolo durante 10 minutos para recoger células magnéticamente marcadas. Las células magnéticamente aisladas se analizaron para la recuperación de células tumorales por citometría de flujo.

Tabla 2

Concentración de reactivo de agregación (µg/ml)	Recuperación de células PC3 (%)	Recuperación de células SKBR-3 (%)
0	23	91
2	77	98

30 Los datos revelan una diferencia significativa en la recuperación de células tumorales entre células de alta y baja densidad de antígenos cuando el reactivo de agregación no se añadió a la muestra de sangre. Tampoco hubo agregados de ferrofluido en disolución ni sobre superficies celulares sin reactivo de agregación como se observa con el microscopio. La adición del reactivo de agregación a la muestra de sangre aumentó significativamente la recuperación de células PC3 de baja densidad de antígenos (3 veces) con un aumento acorde de la agregación del ferrofluido en disolución y sobre las células. Por otra parte, sólo hubo una pequeña diferencia en la recuperación de células SKBR-3 de alta densidad de antígenos con y sin reactivo de agregación presente en la muestra de sangre. Hubo suficiente ferrofluido sobre las células SKBR-3, incluso sin agregación del ferrofluido, para recogerlas eficazmente y para proporcionar una alta recuperación. En el caso de células de baja densidad de antígenos no hubo suficiente ferrofluido sobre las células para ser recogidas eficazmente por procedimientos magnéticos. La agregación del ferrofluido por el reactivo de agregación aumentó la cantidad de ferrofluido sobre estas células, facilitando la recogida, produciendo eficazmente una mayor recuperación. También es de notar que la agregación del ferrofluido aumentó la recuperación de células de baja densidad de antígenos próxima a la obtenida con las células de alta densidad de antígenos. En otras palabras, no hubo diferencia significativa en las recuperaciones de células tumorales de baja y alta densidad de antígenos tras la adición del agregador de ferrofluido a la muestra de sangre.

45 **Ejemplo 6: Células de control en una muestra de paciente real con detección mediante Cell Spotter®.**

50 Se añadieron cinco mililitros de WDB a una muestra de sangre de 5 ml de un paciente con cáncer de próstata. Después de mezclarse, la sangre se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm, con el freno desactivado. El plasma se eliminó por aspiración y el volumen se enrasó hasta 10 ml con WDB. La muestra se mezcló de nuevo y se centrifugó. El sobrenadante se eliminó por aspiración y el volumen de la sangre lavada aumentó hasta 5 ml con WDB. Las células de control se prepararon usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y luego se añadieron a los 5 ml de la muestra de sangre lavada. Se usaron veinte microlitros de $5,0 \times 10^3$ células/ml de disolución madre de células de control, produciendo una adición de 100 células de control. Entonces se añadieron 2,5 ml de WDB, 50 µl de reactivo de agregación y 75 µl de FF de CA-EpCAM en ese orden y se mezclaron, uno a uno. Después de mezclarse, el tubo se colocó en un separador magnético de células durante 10 minutos. Entonces, el tubo se sacó, se invirtió y se colocó de nuevo en el separador durante otros 10

5 minutos. El tubo se sacó de nuevo, se invirtió y se separó durante 20 minutos. Entonces, el líquido en el tubo se aspiró cuidadosamente, teniendo cuidado con no perturbar las células y el material magnético en los lados del tubo. El tubo se sacó del separador magnético y se añadieron 3 ml de WDB al tubo, que se agitó con vórtex para resuspender el material en el lado del tubo. Entonces, el tubo se volvió a insertar en el separador magnético durante 10 minutos. El líquido se eliminó por aspiración mientras que el tubo continuó en el separador magnético. El tubo se sacó del separador magnético y se añadieron los siguientes reactivos: 200 μ l de reactivo de permeabilización (parte de Immunicon nº 6032), 20 μ l de CD45-FITC (Becton Dickinson nº de catálogo 347643), 10 μ l de DAPI (100 μ g/ml, Molecular Probes nº de catálogo D-3571), 15 μ l de α -citoqueratina-Cy3® (50 μ g/ml) y 5 μ l de α -Her2neu-Cy5® (50 μ g/ml). Obsérvese que tanto Cy3® como Cy5® se conjugan con anticuerpos siguiendo procedimientos recomendados por el fabricante (Amersham). La muestra se agitó con vórtex para resuspender las células magnéticamente recogidas, y luego se incubaron durante 15 minutos. Entonces se añadieron 10 ml de tampón de células (parte de Immunicon nº 6013) y se mezclaron por inversión. Después de la centrifugación (1300 rpm, 10 min, freno desactivado), el líquido se aspiró hasta aproximadamente 200 μ l y se añadieron 20 μ l de paraformaldehído al 5%. Toda la muestra se pipeteó en una cámara del Cell Spotter® y se adquirieron imágenes usando conjuntos de filtros para DAPI, FITC, Cy3® y Cy5®.

15 Los resultados del goteo celular se muestran en la Fig. 4, paneles A-E. La Fig. 4A muestra una de las imágenes de Cy3®. Alrededor de los objetos de citoqueratina Cy3+ están dibujados cuatro recuadros con características similares a células. Las fechas están dibujadas desde cada uno de estos recuadros hacia los paneles B, C, D y E. En la imagen superior de cada uno de estos paneles se muestra una superposición de la imagen de α -citoqueratina-Cy3® (verde) y la imagen de DAPI (violeta); la imagen central es el filtro en el que puede observarse la tinción de CD45-FITC y DiOC₁₆(3); y en la imagen inferior la tinción de Her2Cy5®. Los recuadros de los que se muestran las imágenes en los paneles D y E contienen células que tienen un núcleo, se tiñen brillantemente en el filtro de FITC (DiOC₁₆(3)++) y se tiñen positivas para Her2neu-Cy5®. Las dos células son células de control y confirman que los reactivos en la prueba son funcionales. En este caso se identificaron 58 de las células de control que indicaron que no se cometieron errores en la preparación de la muestra. Los otros dos recuadros mostrados en los Paneles B y C contienen células que tienen un núcleo, no aparecen en el filtro de FITC y no aparecen en el filtro de Cy5®. Estas células tienen las propiedades especificadas para células tumorales que no expresan Her2neu. En los recuadros también están otras células como puede verse por la presencia de un núcleo; sin embargo, estas células se tiñen con CD45-FITC y son leucocitos. Los leucocitos que no se unen específicamente a α -citoqueratina-Cy3® se teñirán con CD45-FITC y pueden excluirse. Las células tumorales que no se unen específicamente a CD45 sólo pueden discriminarse si las propiedades celulares son distintas de las de los leucocitos, en cuyo caso pueden considerarse sospechosas. Las células epiteliales normales pueden discriminarse a partir de células epiteliales con características malignas basadas en sus características morfológicas como se evalúa por la tinción nuclear (DAPI) y la tinción citoplásmica (citoqueratina).

Ejemplo 7: Células de control interno para el ensayo de células tumorales en circulación analizado por citometría de flujo

35 Se fijan células de la línea celular de cáncer de mama SKBR-3 y se marcan fluorescentemente con el compuesto DiOC₁₆(3). Este compuesto tiñe membranas celulares y puede excitarse con la línea láser de ión argón (488 nm) comúnmente usada en citómetros de flujo. La emisión del colorante se detecta por el mismo fotomultiplicador que se usa para detectar las señales de fluorescencia emitidas por FITC. Las células teñidas con DiOC₁₆(3) se almacenaron a una concentración de 50.000 células/ml. En el experimento descrito aquí, 100 μ l de células de control (5000 células) se añadieron a dos 2 ml de sangre anticoagulada con ACD en un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm. A una de estas muestras se añadieron 100 μ l de células sin marcar de la línea celular de cáncer de mama SKBR-3 que contenía aproximadamente 5000 células. Se añadieron 2 ml de tampón a la sangre, se mezclaron cuidadosamente y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 minutos. Entonces se aspiraron 2,5 ml del tampón de plasma y se desecharon. La muestra se mezcló y se añadieron 1,5 ml de tampón, 9 μ g de reactivo de agregación y 9 μ g de FF de CA-EpCAM en ese orden a la muestra y se mezclaron, uno a uno. Entonces, el tubo se colocó en un separador magnético. Después de 10 minutos, la muestra se sacó del separador, se mezcló y se colocó de nuevo en el separador durante otros 10 minutos. La muestra se sacó de nuevo del separador, se mezcló y se colocó de nuevo en el separador durante 20 minutos. Entonces, el sobrenadante se eliminó mediante una cuidadosa aspiración y se desechó y al tubo se añadió 1 ml de tampón. La muestra se sacó del separador, asegurándose que se resuspendieran todas las células y el ferrofluido unidos a la pared del tubo. La muestra se colocó de nuevo en el separador. Después de 10 minutos el tampón se aspiró y se desechó. El tubo se sacó del separador y al tubo se añadieron 200 μ l de una disolución que permeabilizó la membrana celular, 10 μ l de anticuerpo monoclonal marcado con PE dirigido contra citoqueratina y 20 μ l de anticuerpo marcado con FITC. La muestra se mezcló de nuevo asegurándose que se resuspendieran el ferrofluido y las células unidas a la pared. Después de la incubación durante 15 minutos se añadieron 2 ml de tampón, se mezclaron y la muestra se colocó de nuevo en el separador durante 10 minutos. Después de aspirarse y desecharse el tampón, la muestra se sacó del separador y se añadieron 0,5 ml de reactivo de disgregación (parte de Immunicon nº 6027). Entonces, las muestras se analizaron por citometría de flujo.

60 Los parámetros instrumentales del citómetro de flujo se ajustaron usando un umbral en la dispersión de la luz hacia adelante. Este parámetro permite la eliminación de acontecimientos no deseados que incluyen partículas de ferrofluido (170 nm) y anticuerpos residuales fluorescentemente marcados basándose en el tamaño. Además, se usó una puerta que eliminó todos los acontecimientos que no se tiñeron con FITC o PE tales como eritrocitos y plaquetas. La Fig. 5 muestra el análisis de ambas muestras. Los dos paneles superiores (Fig. 5a-b) muestran el análisis de la muestra que sólo contuvo células de control y los dos paneles inferiores (Fig. 5c-d) muestran el análisis de la muestra que contuvo ambas células de control,

5 además de células tumorales. Las representaciones de puntos de la dispersión de la luz hacia adelante y ortogonal se muestran a la izquierda (Fig. 5a, 5c) y las representaciones de puntos que guardan relación con las señales de FITC frente a PE a la derecha (Fig. 5b, 5d.) Se indican cuatro puertas en los paneles derechos. La puerta R3 excluye todos los acontecimientos de FITC y PE negativos. Las células de control aparecen en la puerta R1, que se tiñe brillantemente con DiOC₁₆(3) (FL1), además de teñirse brillantemente con citoqueratina-PE. Los leucocitos aparecen en la puerta R4, que se tiñen con CD45-FITC, pero no con citoqueratina-PE. Las células tumorales aparecen en la puerta R2, que no se tiñen con CD45-FITC o DiOC₁₆(3), pero que son positivas para citoqueratina-PE. Los acontecimientos que se encuentran fuera de estas regiones se consideran residuos (R3-(R1+R2+R4)). En los paneles superiores se detectaron 403 leucocitos, 2647 células de control y 0 células tumorales. Como se añadieron 5000 células de control a la muestra de sangre original, en el procedimiento se perdieron 2353. Esta pérdida de células puede producirse en muchas etapas, tales como el marcado, la separación, la aspiración y en este caso un contribuyente principal fue el hecho de que aproximadamente 100 µl se dejaron en el tubo después de la adquisición de datos en el citómetro de flujo (20% de la muestra). En el desarrollo del ensayo es importante identificar las etapas que son las más críticas para la pérdida de células. Si se usa el ensayo para determinar si un paciente tiene o no células cancerosas en la sangre y cuántas células cancerosas por unidad de volumen, es importante saber si la muestra se procesó o no con exactitud y si los reactivos están funcionando o no adecuadamente. En este ejemplo se detectaron 2674 de 5000 células de control y puede concluirse que, aunque el volumen de sangre de partida fuera 2 ml, sólo 2674/5000 x 2 ml = 1,1 ml se analizó eficazmente. Como el número de células tumorales detectado fue 0, puede concluirse que en 1,1 ml de sangre se detectaron 0 células tumorales. Sin embargo, no puede concluirse que en este caso se analizaran 2 ml de sangre y estaban presentes 0 células tumorales. En el caso en el que las células de control se encontraran en una región inferior de la puerta indicada, los reactivos fracasaron, y no puede informarse de resultados. En los paneles inferiores se detectaron 304 leucocitos, 2667 células de control y 2129 células tumorales. En este ejemplo se detectaron 2667 de 5000 células de control y puede concluirse que, aunque el volumen de sangre de partida fue 2 ml, sólo se analizaron eficazmente 2667/5000 x 2 ml = 1,1 ml. Como el número de células tumorales detectado fue 2129, puede concluirse que en 1,1 ml de sangre se detectaron 2129 células tumorales (1996 células tumorales / ml de sangre).

25 **Ejemplo 8: Células de control interno para el ensayo de células tumorales en circulación que puede analizarse por plataformas analíticas de células automatizadas**

30 En este ejemplo, un citómetro de flujo está equipado con un láser de ión argón de 488 nm, además de un diodo láser de 635 nm. Sin embargo, para el análisis también podría usarse un instrumento de análisis de células óptico como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.985.153 equipado con un diodo láser de 535 nm, además de un diodo láser de 635 nm. La combinación de fluorocromos usados para marcar las diferentes sondas para identificar células cancerosas en sangre periférica puede cambiarse fácilmente. En este ejemplo, el anticuerpo que reconoce la citoqueratina todavía está marcado con PE, y se excita con la línea láser de 488 nm o el diodo láser de 535 nm. La fuente de luz de 535 nm está más próxima al pico de absorción máximo de PE y, por tanto, produce una mejor relación de señal con respecto a ruido. El anticuerpo que reconoce leucocitos también se usa para eliminar células o acontecimientos que se unen no específicamente en esta configuración. El anticuerpo CD45 está marcado con alofocianina (APC) y se excita con el diodo láser de 635 nm, pero no con la línea láser de 488 nm o el diodo láser de 535 nm. La ventaja de esta combinación con respecto a la combinación de FITC/PE descrita en el ejemplo previo es que no se produce la interferencia de los espectros de emisión de ambos fluorocromos (es decir, no se necesita compensación).

40 El colorante que se usa para teñir e identificar las células de control se mediría preferentemente en el mismo canal que el canal de APC, siempre que las células de control pudieran separarse de hecho de los leucocitos como en el ejemplo previo. En este ejemplo, las células de la línea celular de cáncer de mama SKBR-3 se fijan y se marcan fluorescentemente con el colorante de membranas lipófilo 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodicarbocianina (DiIC₁₈(5), Fluka). Este compuesto tiñe membranas celulares y puede excitarse con el diodo láser de 635 nm. La emisión del colorante se detecta por el mismo fotomultiplicador que se usa para detectar las señales de fluorescencia emitidas por APC. Las células teñidas con DiIC₁₈(5) se usan a una concentración de trabajo de 1x10⁵ células/ml. En el experimento aquí descrito, 50 µl de células de control (5000 células) se añadieron a dos muestras de 2 ml de sangre lavada. A una de estas muestras se añadieron 50 µl de células sin marcar de la línea celular de cáncer de mama SKBR-3 que contenía aproximadamente 5000 células. La muestra se mezcló y se añadieron 1,0 ml de tampón, 9 µg de reactivo de agregación y 9 µg de FF de CA-EpCAM a la muestra en ese orden, se mezclaron uno a uno y se colocaron en un separador magnético. Después de 10 minutos, la muestra se sacó, se mezcló y se colocó de nuevo en el separador durante otros 10 minutos. La muestra se sacó de nuevo del separador, se mezcló y se colocó de nuevo en el separador durante 20 minutos. El tubo se sacó del separador y al tubo se añadieron 100 µl de una disolución que permeabilizó la membrana celular, 10 µl de anticuerpo monoclonal marcado con PE dirigido contra citoqueratina y 20 µl de anticuerpo marcado con CD45-APC (Pharmingen). La muestra se mezcló asegurándose que se resuspendieran todo el ferrofluido y las células unidas a la pared. Después de la incubación durante 15 minutos se añadió 1 ml de WDB, se mezcló y la muestra se colocó de nuevo en el separador durante 10 minutos. Después de aspirarse y desecharse el tampón, la muestra se sacó del separador y se añadieron 0,5 ml de reactivo de disgregación. Entonces, las muestras se analizaron por citometría de flujo.

60 Los parámetros instrumentales del citómetro de flujo se ajustaron usando un umbral en la dispersión de la luz hacia adelante. Esto permite la eliminación de acontecimientos no deseados que incluyen partículas de ferrofluido (170 nm) y anticuerpos residuales fluorescentemente marcados basándose en el tamaño. Además, se usó una puerta que eliminó todos los acontecimientos que no se tiñeron con APC o PE tales como eritrocitos y plaquetas. Las Fig. 6 y 7 muestran el análisis de ambas muestras. Las Figuras 6a-c muestran el análisis de la muestra que sólo contuvo células de control y las Figuras 7a-c muestran el análisis de la muestra que contuvo tanto células de control, además de células tumorales. Las representaciones

de puntos de la dispersión de la luz hacia adelante y ortogonal se muestran en las Fig. 6a y 7a. Las representaciones de puntos que guardan relación con las señales de PE frente a FL1 ($530 \pm 30\text{nm}$) se muestran en las Fig. 6b y 7b. La puerta R1 se indica identificando acontecimientos de PE[+]. La flecha indica la posición de acontecimientos que son indicativos de fluorescencia no específica en los canales de PE y FL1. Las representaciones de puntos de PE frente a APC se muestran en las Fig. 6c y 7c. Se indican cuatro puertas. Los leucocitos aparecen en la puerta R2, que se tiñen con CD45-APC, pero no con citoqueratina-PE. En la puerta R3 aparecen células tumorales, que no se tiñen con CD45-APC o DiIC₁₈(5), pero que son positivas para citoqueratina-PE. En la puerta R5 aparecen las células de control, que se tiñen brillantemente con DiIC₁₈(5), además de teñirse brillantemente con citoqueratina-PE. Las células que aparecen en la puerta R4 pueden unirse no específicamente a CD45-APC, uniéndose no específicamente leucocitos que se tiñen con PE o posibles células tumorales. En la Figura 6d se detectaron 1144 leucocitos [R2], 2023 células de control [R5], 3 posibles células tumorales [R4] y 0 células tumorales [R3]. Las posibles células tumorales presentan las características de fluorescencia de células tumorales marcadas, pero se encuentran fuera de los umbrales para células tumorales. Estos acontecimientos siempre carecen de una característica que los confirmaría como células tumorales reales.

Como se añadieron 5000 células de control a la muestra de sangre original, 2977 se perdieron en el procedimiento. En este ejemplo se detectaron 2023 de 5000 células de control, y puede concluirse que, aunque el volumen de sangre de partida fue 2 ml, sólo se analizaron eficazmente $2023/5000 \times 2 \text{ ml} = 0,8 \text{ ml}$. Como el número de células tumorales detectado fue 0, puede concluirse que en 0,8 ml de sangre se detectaron 0 células tumorales. Sin embargo, no puede concluirse que en el caso en el que se analizaron 2 ml de sangre estuvieron presentes 0 células tumorales. En ese caso, las células de control se encontrarían en una región por debajo de la puerta indicada, los reactivos habrían fracasado y no podría informarse de resultados. En la Fig. 7d se detectaron 1632 leucocitos [R2], 2042 células de control [R5], 82 posibles células tumorales [R4] y 1644 células tumorales [R3]. En este ejemplo se detectaron 2042 de 5000 células de control y puede concluirse que, aunque el volumen de sangre de partida fue 2 ml, sólo se analizaron eficazmente $2042/5000 \times 2 \text{ ml} = 0,8 \text{ ml}$. Como el número de células tumorales detectado fue 1644 puede concluirse que en 0,8 ml de sangre se detectaron 1644 células tumorales (2055 células tumorales/ml de sangre).

Ejemplo 9: Almacenamiento de células de control bajo condiciones de flotación neutras

A lo largo de mucho trabajo con células de control, al igual que con todas las células, la reproducibilidad de manipulaciones celulares es un problema común. El pipeteo de células es frecuentemente irreproducible y depende del mezclado o la suspensión eficaz de las células, que inmediatamente empiezan a sedimentar en reposo. La adición de células tumorales, la adición de células de control y el uso de células frescas como controles son todos posibles fuentes de error. Un procedimiento novedoso de aumento de la reproducibilidad en el uso de células de control es usar un sistema de almacenamiento de flotación neutro. En este sistema, la gravedad específica de las células de control estabilizadas sería idéntica a la densidad del medio de almacenamiento. Por tanto, las células nunca sedimentarían y seguirían estando perpetuamente mezcladas.

En este ejemplo se prepararon diferentes medios de densidad usando albúmina de suero bovino (BSA) a diferentes concentraciones. Una disolución de BSA al 45% (Sigma) se diluyó hasta el 25%, 15%, 10%, y 5% en PBS. Los gradientes se prepararon en un tubo de centrifuga del siguiente modo: primero se añadieron 3 ml de BSA al 25% al tubo de centrifuga de 15 ml vacío. Luego se dispusieron cuidadosamente en capas 3 ml de disolución de BSA al 15% en la parte superior de la disolución de BSA al 25% sin mezclar. La disolución de BSA al 10% se dispuso cuidadosamente en capas en la parte superior de la del 15%. La disolución de BSA al 5% se dispuso cuidadosamente en capas en la parte superior de la del 10%. Pueden verse claramente las diferentes capas de disoluciones de BSA. Células tumorales cultivadas SKBR-3 frescas (2×10^6 células/ml) en BSA al 1% en PBS se dispusieron en capas en la parte superior de la disolución de BSA al 5%. El tubo de 15 ml se centrifugó a 400 g durante 30 minutos, freno desactivado. Después de la centrifugación hubo bandas principales y secundarias visibles en el tubo. La banda principal fue una banda amplia de células en la parte superior de la disolución de BSA al 15% y la banda secundaria fue una banda mucho más pequeña en la parte superior de la disolución de BSA al 10%. La banda secundaria contuvo principalmente células muertas. Estos datos muestran que las células tumorales SKBR-3 cultivadas tienen una densidad superior a la de BSA al 10%, pero inferior o igual a la de BSA al 15% debido a que las células no entraron en la disolución de BSA al 15%.

El siguiente experimento se diseñó para probar que las células SKBR-3 seguirán estando en suspensión en una disolución de BSA al 15%. Se añadieron células SKBR-3 (1×10^5) a 1 ml de PBS, disolución de BSA al 15% en un tubo de poliestireno de 12 x 75 mm y se mezclaron bien. Como control se añadieron 1×10^5 células SKBR-3 a 1 ml de PBS, disolución de BSA al 1% en otro tubo de poliestireno de 12 x 75 mm. Ambos tubos se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. La centrifugación hará bajar las células al fondo del tubo en tampones regulares. Hubo un sedimento de células en el fondo de BSA al 1% en el tubo de PBS. Sin embargo, no hubo sedimento de células en el fondo del tubo con BSA al 15% debido a que todas las células siguieron estando en suspensión. Este experimento muestra que en un medio en el que las células y el medio tienen la misma densidad la sedimentación cesará debido a la gravedad. Por tanto, el pipeteo de la disolución madre no requerirá volver a mezclar y será una acción reproducible. Las células almacenadas en un medio tal serán superiores a las células almacenadas en el modo tradicional por otros motivos. No se producirán aglutinización ni reticulación, no habrá pegajosidad a la esquina del fondo del vial y se asegurará la homogeneidad de células ya que algo que dañe las células tampoco puede cambiar su densidad. Por tanto, en la centrifugación en densidad de este procedimiento se introduce una etapa de purificación adicional.

Se reconocerá inmediatamente por aquellos expertos en la materia del cultivo celular que los usos de un sistema de

almacenamiento tal se extienden más allá del campo de la selección de células raras y la detección del cáncer.

Ejemplo 10: Uso de controles internos a diferentes concentraciones de células

5 Los Ejemplos 7 y 8 muestran el uso de células previamente marcadas como controles internos a una concentración particular de células. El control interno a una concentración de células mostrará que la prueba se hizo correctamente, pero
 10 no indica la eficiencia de recuperación de células a diferentes concentraciones de células. El número de células tumorales presente en muestras de pacientes varía y puede no ser similar al número de células de control usadas. Sin embargo, la recuperación de células tumorales de cultivo añadidas es lineal de 1 célula/ml a 5000 células/ml de sangre en el estudio modelo. Pero no se sabe cómo se comporta la recuperación de células de control de la muestra del paciente a diversas concentraciones. Esto puede responderse añadiendo células de control a diferentes concentraciones a la muestra del paciente y recuperándolas. Puede lograrse usando células de control con la misma intensidad de fluorescencia para diferentes concentraciones. Puede lograrse usando diferentes células de control con diferentes intensidades del mismo marcador de fluorescencia o con diferentes marcadores fluorescentes.

15 Por ejemplo, pueden prepararse células de control con diferentes marcadores de fluorescencia que tienen diferentes propiedades de fluorescencia características y pueden diferenciarse fácilmente. En los Ejemplos 7 y 8 se usaron dos tipos diferentes de células de control con diferentes propiedades de fluorescencia. Las células de control que se usaron en el Ejemplo 7 se marcaron previamente con DiOC16(3) que tiene una emisión de fluorescencia similar a FITC. En el Ejemplo 8 se usaron células de control que se marcaron previamente con DiOC18(5) y emiten fluorescencia similar a APC. El FITC emite fluorescencia máxima a 519 nm y la APC emite fluorescencia máxima a 660 nm. Estas dos células de control pueden diferenciarse fácilmente por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo u otras plataformas analíticas ópticas que incluyen las descritas en la patente de EE.UU. nº 5.985.153. Las células de control marcadas con DiOC16(3) pueden usarse como células de control a alta concentración (5000 células/ml de sangre) y las células de control marcadas con DiOC18(5) pueden usarse como células de control a baja concentración (5 células/ml de sangre). Se añade un número conocido de células de control a alta y baja concentración a la sangre del paciente y luego se determina la recuperación de tanto las células de control a alta como a baja concentración. El porcentaje de recuperación de ambas células deberá ser similar si la eficiencia de recuperación de las células de control a baja y alta concentración de células es la misma. La recuperación de células tumorales puede encontrarse entre las concentraciones bajas y altas de células de control. Entonces es posible calcular la recuperación de células tumorales usando recuperaciones de células de control tanto a baja como a alta concentración.

20 Otra forma de usar células de control con diversas concentraciones de células es añadiendo células de control que tienen diferentes intensidades de fluorescencia. Las células de control con cierta intensidad de fluorescencia representan poblaciones de células particulares. Las células de control con diferentes intensidades de fluorescencia pueden prepararse cambiando las condiciones de marcado tales como la concentración de colorante o el tiempo de tinción.

30 Usando los procedimientos de los ejemplos anteriores, las composiciones y los procedimientos de la invención pueden aplicarse a otros tipos de células para producir controles internos para otros ensayos. Como se desarrollan nuevos procedimientos para el aislamiento y el enriquecimiento de células en circulación, incluyendo procedimientos para detectar la mayoría de las enfermedades descritas en la solicitud nº 09/248.388, estará la necesidad de controles internos. Marcando previamente líneas celulares conocidas que se ha mostrado que se comportan similarmente a las células diana, los ejemplos anteriores demuestran la posibilidad de crear estos controles. Las células diana incluyen sin limitación células cancerosas en circulación tales como cánceres de mama, próstata, colon, pulmón, riñón, ovario, leucemia, melanomas, gliomas, y cualquiera de la mayoría de los otros tipos de cáncer. Cada uno de éstos tiene una línea celular tumoral que podría ser adecuada para producir células de control. Además, pueden ensayarse otras células diana en circulación indicativas de estados de enfermedad tales como células endoteliales, células de tejido liso, células miocárdicas, y también requieren controles. Estas células también tienen líneas celulares correspondientes, o alternativamente puede cultivarse y hacerse crecer para producir controles funcionales. Finalmente, ensayos para infecciones que se producen en células diana en circulación tales como células víricamente infectadas (VIH), bacterias y otros microbios requerirán controles internos que pueden proporcionarse mediante los procedimientos de la presente invención.

45 Aunque ciertas de las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito y ejemplificado específicamente anteriormente, no se pretende que la invención se limite a tales realizaciones.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento para producir una célula estabilizada para uso como control interno en procedimientos para aislar e identificar células raras, teniendo dicha célula de control estabilizada determinantes en común con dichas células raras, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 a) marcar redundantemente dicha célula de control con al menos dos marcas fluorescentes que tienen las mismas propiedades espectrales;
- b) poner en contacto dicha célula marcada con un fijador de células efectuando dicho fijador la estabilización de tanto la estructura celular como de restos antigénicos presentes sobre dicha célula de control;
- 10 c) eliminar posteriormente el fijador en exceso para promover el almacenamiento a largo plazo de dicha célula de control, siendo dicha célula de control físicamente y biológicamente estable durante al menos seis meses.
- 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho fijador de células se selecciona del grupo que consiste en paraformaldehído, formaldehído, glutaraldehído y glioxal.
- 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dichas marcas fluorescentes son marcas de membrana seleccionadas del grupo que consiste en carbocianinas lipófilas de cadena larga, indocarbocianinas lipófilas de cadena larga, indodicarbocianinas lipófilas de cadena larga y análogos de las mismas, colorantes de aminoestirilo lipófilos y análogos de cadena larga de colorantes de rodamina B C18 y de fluoresceína C18.
- 15 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha célula de control está marcada con un anticuerpo inmunológicamente específico para un antígeno presente sobre dicha célula, estando dicho anticuerpo conjugado con una molécula fluorescente.
- 20 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que componentes celulares de dicha célula de control se marcan con colorantes seleccionados del grupo que consiste en DAPI, Hoechst 33342, naranja de acridina, derivados de rodamina, rojo neutro y BODIPY™ lipófilo.
- 6.- Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicho componente celular se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, núcleos, lisosomas, aparato de Golgi, mitocondrias y el retículo endoplásmico.
- 25 7.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha célula de control expresa molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM) sobre su superficie y también expresa citoqueratina intracelularmente, y en el que dicha célula de control se marca redundantemente en la membrana en la etapa a) con al menos dos marcas fluorescentes que tienen las mismas propiedades espectrales.
- 30 8.- Una célula estabilizada para uso como control interno en procedimientos para aislar e identificar células raras, teniendo dicha célula de control determinantes en común con dichas células raras, en la que dicha célula de control se ha marcado redundantemente con al menos dos marcas fluorescentes que tienen las mismas propiedades espectrales, y en la que componentes celulares y restos antigénicos de dicha célula de control se han estabilizado posteriormente mediante exposición a fijador.
- 35 9.- Una célula de control según la reivindicación 8, en la que la membrana de dicha célula está marcada redundantemente con dichas marcas fluorescentes.
- 10.- Una célula de control según la reivindicación 9 que se selecciona del grupo que consiste en células tumorales, células bacterianamente infectadas, células víricamente infectadas, células miocárdicas, células endoteliales en circulación y células fetales en circulación materna.
- 40 11.- Una célula de control según la reivindicación 9 ó 10, en la que dichas marcas fluorescentes se seleccionan del grupo que consiste en carbocianinas lipófilas de cadena larga, indocarbocianinas lipófilas de cadena larga, indodicarbocianinas lipófilas de cadena larga y análogos de las mismas, colorantes de aminoestirilo lipófilos y análogos de cadena larga de colorantes de rodamina B C18 y fluoresceína C18.
- 45 12.- Una célula de control según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que dicha célula de control está marcada con un anticuerpo inmunológicamente específico para un antígeno presente sobre dicha célula, estando dicho anticuerpo conjugado con una molécula fluorescente.
- 13.- Una célula de control según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que componentes celulares de dicha célula de control se marcan con colorantes seleccionados del grupo que consiste en DAPI, Hoechst 33342, naranja de acridina, derivados de rodamina, rojo neutro y BODIPY™ lipófilo.
- 50 14.- Una célula de control según la reivindicación 13, en la que dicho componente celular se selecciona del grupo que consiste en ácidos nucleicos, núcleos, lisosomas, aparato de Golgi, mitocondrias y retículo endoplásmico.
- 15.- Una célula de control según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, en la que la célula de control es una célula

tumoral que expresa EpCAM sobre su superficie de membrana y la citoqueratina intracelularmente.

16.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula de cáncer de mama SKBR3 que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado seleccionado del grupo que consiste en mamoglobulina, globulina de grasa láctea humana y HER-2/neu.

5 17.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula de cáncer de mama MCF-7 que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es un receptor estrogénico.

18.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula de cáncer de próstata LNCaP que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado seleccionado del grupo que consiste en PSMA, PSA y receptor androgénico.

10 19.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula cancerosa de leucemia de linfocitos T CEM que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD4.

20.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula de leucemia de linfocitos B Raji que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD19.

15 21.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula de leucemia no Hodgkin SU-DHL que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD20.

22.- Una célula de control según la reivindicación 15, siendo dicha célula una célula cancerosa de melanoma C32 que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD146.

23.- Una célula de control según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22, en la que dicho fijador de células se selecciona del grupo que consiste en paraformaldehído, formaldehído, glutaraldehído y glioxal.

20 24.- Una célula de control según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 23 en suspensión en un medio de densidad de flotación.

25.- Un procedimiento para detectar y enumerar células raras en una población de células mixtas comprendida en una muestra de sangre extraída de un sujeto de prueba, siendo la presencia de dichas células raras en dicha población indicativa de gravedad de un estado de enfermedad, que comprende:

25 a) preparar una muestra inmunomagnética en la que dicha muestra se mezcla con partículas magnéticas acopladas a un ligando que reacciona específicamente con un determinante de las células raras para la exclusión sustancial de otros componentes de muestra;

b) poner en contacto dicha muestra inmunomagnética con al menos un reactivo que marca un determinante de dichas células raras; y

30 c) analizar dichas células raras marcada para determinar la presencia y el número de cualquier célula rara en dicha muestra inmunomagnética, cuanto mayor sea el número de células raras presentes en dicha muestra, mayor será la gravedad de dicho estado de enfermedad,

caracterizado porque el procedimiento incluye la adición de una célula estabilizada según la reivindicación 8 para su uso como célula de control interno en dicho procedimiento.

35 26.- Un procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicha célula rara es una célula cancerosa y dicho estado de enfermedad es cáncer.

40 27.- Un procedimiento según la reivindicación 25 o la reivindicación 26, en el que dicha marca de membrana se selecciona del grupo que consiste en carbocianinas lipófilas de cadena larga, indocarbocianinas lipófilas de cadena larga, indodicarbocianinas lipófilas de cadena larga y análogos de las mismas, colorantes de aminoestirilo lipófilos, y análogos de cadena larga de colorantes de rodamina B C18 y fluoresceína C18.

28.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que dicho ligando es un anti-EpCAM y dicho reactivo marca una citoqueratina intracelular, estando dicho EpCAM y dicha citoqueratina presentes en tanto dicha célula rara como dicha célula de control.

45 29.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula cáncer de mama SKBR3 que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado seleccionado del grupo que consiste en mamoglobulina, globulina de grasa láctea humana y HER-2/neu.

30.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula de cáncer de mama MCF-7 que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es un receptor estrogénico.

50 31.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula de cáncer de próstata LNCaP que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado seleccionado del grupo que

consiste en PSMA, PSA y receptor androgénico.

32.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula cancerosa de leucemia de linfocitos T CEM que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD4.

5 33.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula de leucemia de linfocitos B Raji que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD19.

34.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula de leucemia no Hodgkin SU-DHL que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD20.

10 35.- Un procedimiento según la reivindicación 28, en el que la célula de control es una célula cancerosa de melanoma C32 que comprende además un segundo determinante de superficie detectablemente marcado que es una molécula CD146.

36.- Un kit para cribar una muestra de paciente para la presencia de células tumorales en circulación que comprende:

a) nanopartículas magnéticas recubiertas que comprenden un material de núcleo magnético, un material de recubrimiento basado en proteína y anti-EpCAM acoplado directa o indirectamente a dicho material de recubrimiento base;

15 b) al menos un anticuerpo que tiene especificidad de unión por un determinante de célula cancerosa; y

c) colorante específico de células para excluir componentes de muestra distintos de dichas células tumorales del análisis,

caracterizado porque el kit también incluye un recipiente que comprende células estabilizadas según la reivindicación 8 para uso como control interno.

20 37.- Un kit según la reivindicación 36, en el que la célula de control es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22.

Figura 1: Análisis de citometría de flujo de células de control

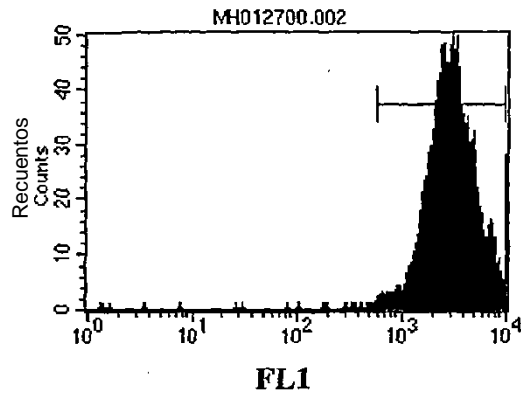


Figura 1a

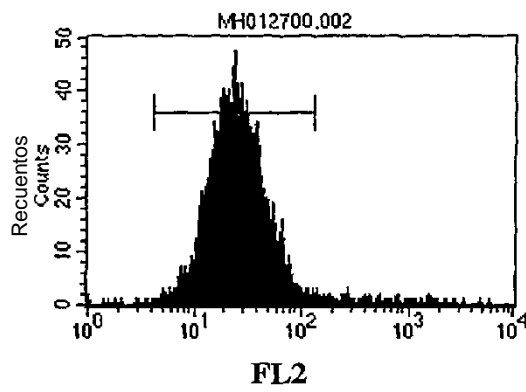


Figura 1b

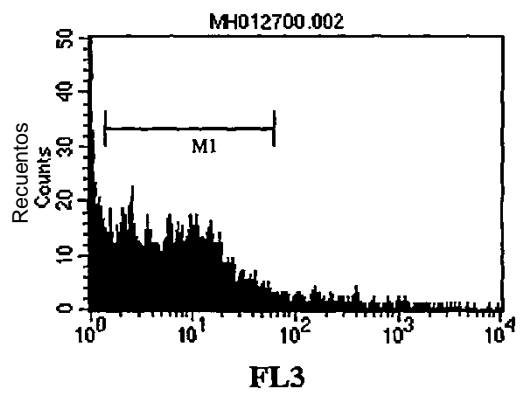


Figura 1c

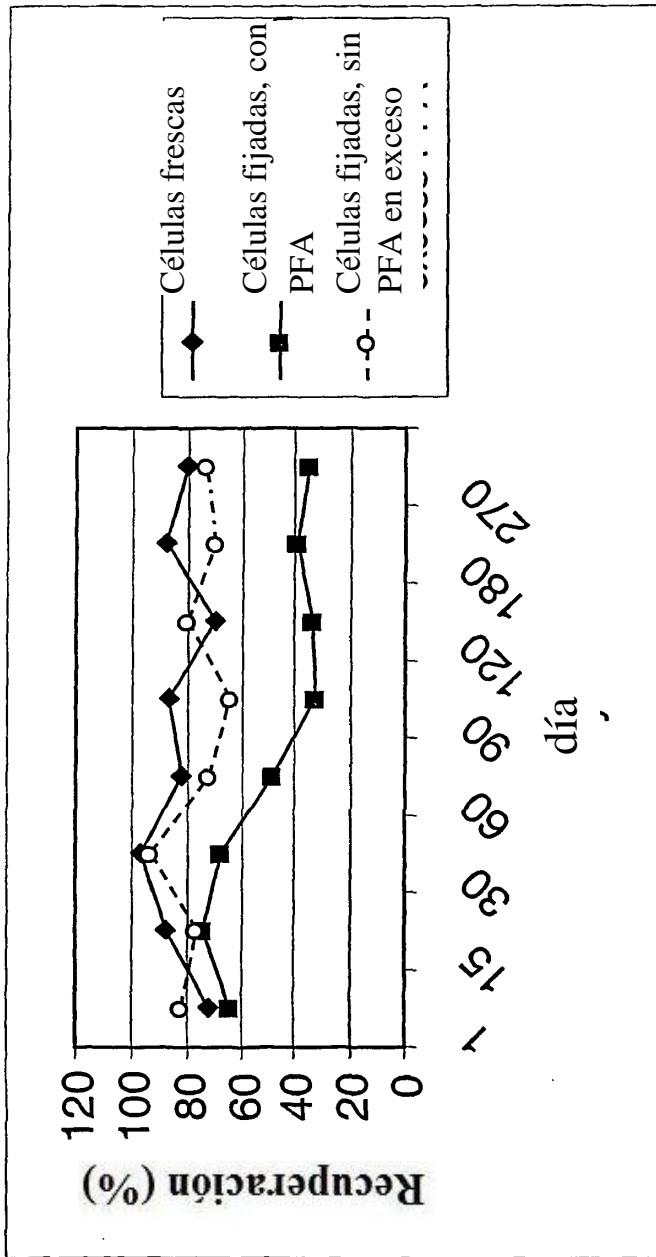


Figura 2

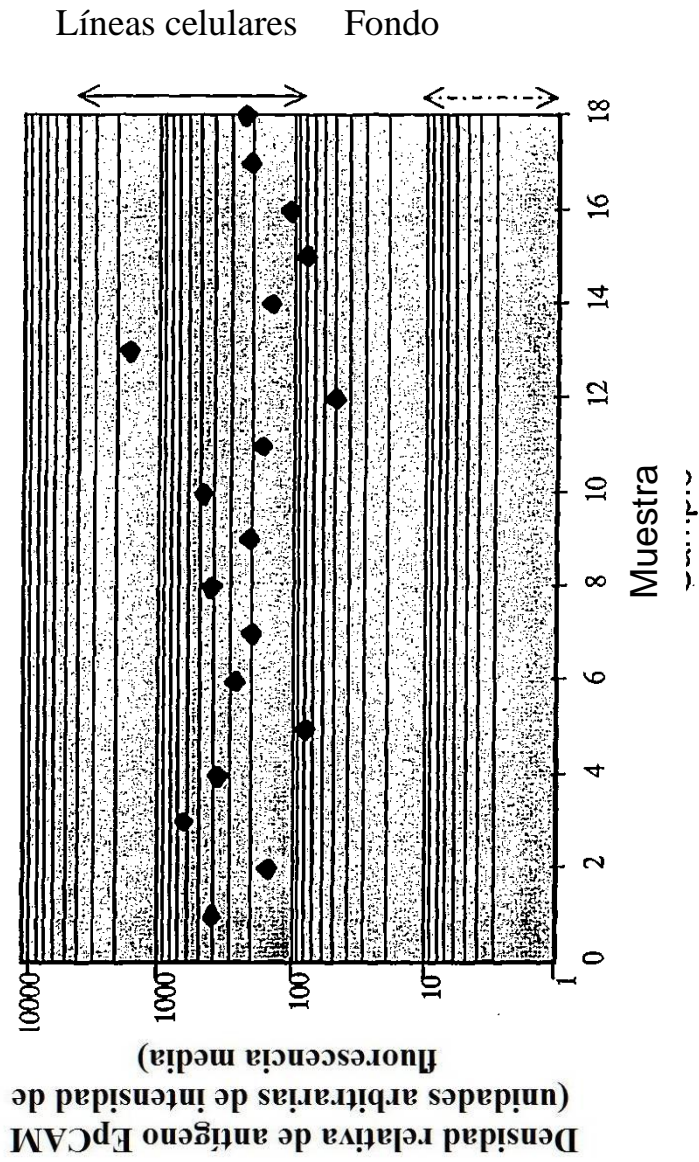


Figura 3

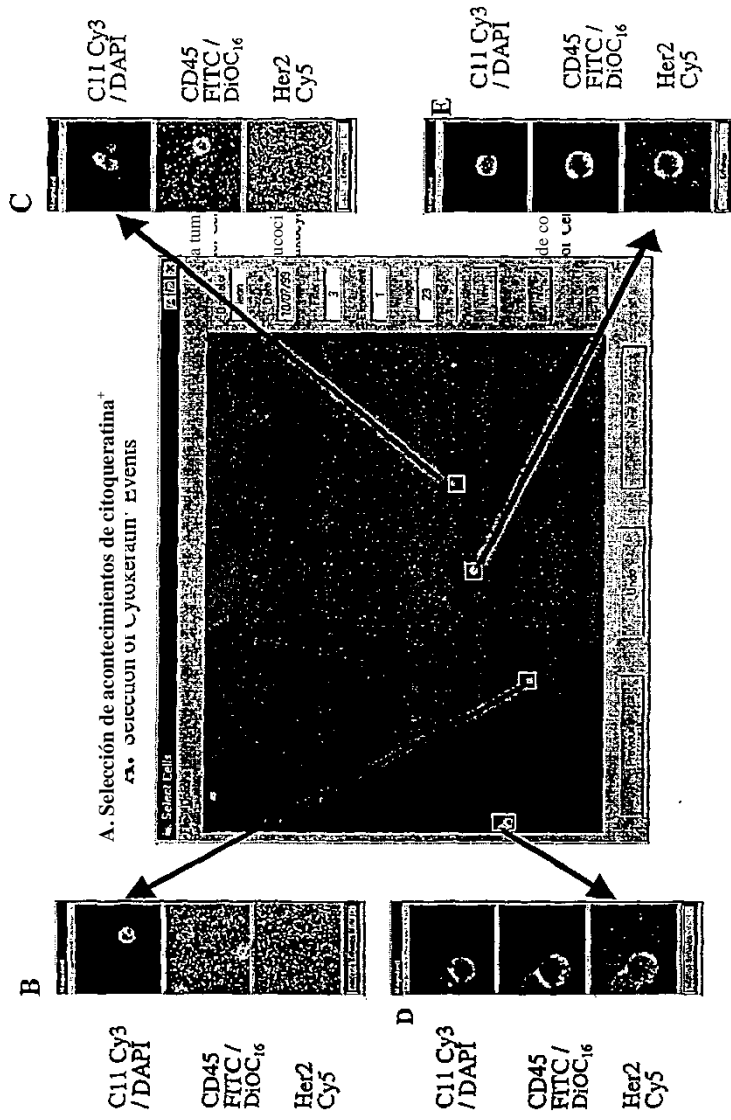
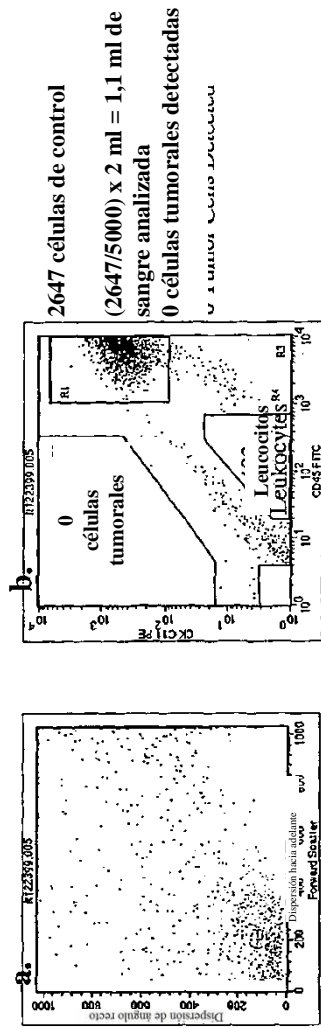


Figura 4

Análisis de citometría de flujo de células seleccionadas con FF de EPCAM de sangre
 Umbral en la dispersión de la luz hacia adelante y puerta que excluye acontecimientos
 negativos fluorescentes

Muestra de sangre de 2 ml sin adiciones



Muestra sangre de 2 ml con adiciones

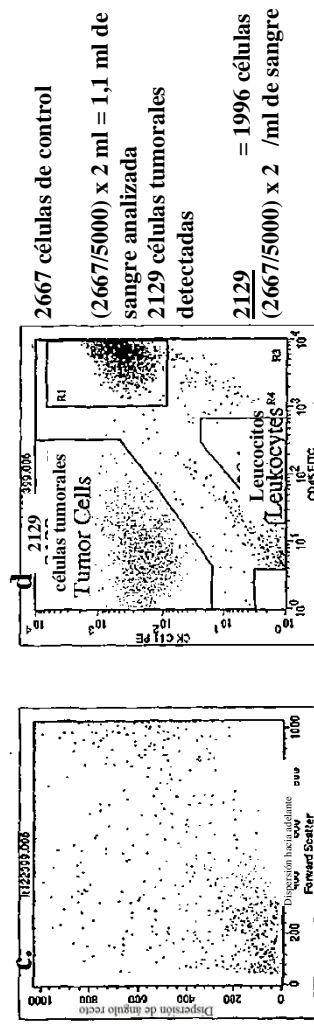


Figura 5

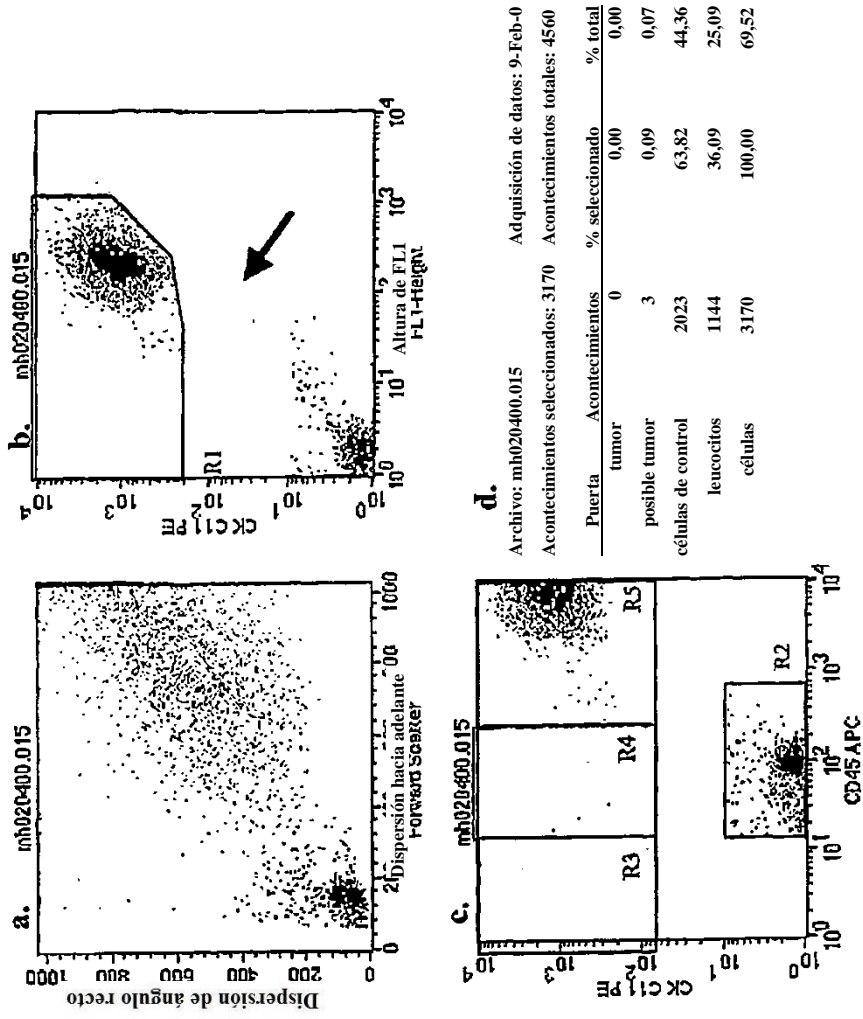


Figura 6

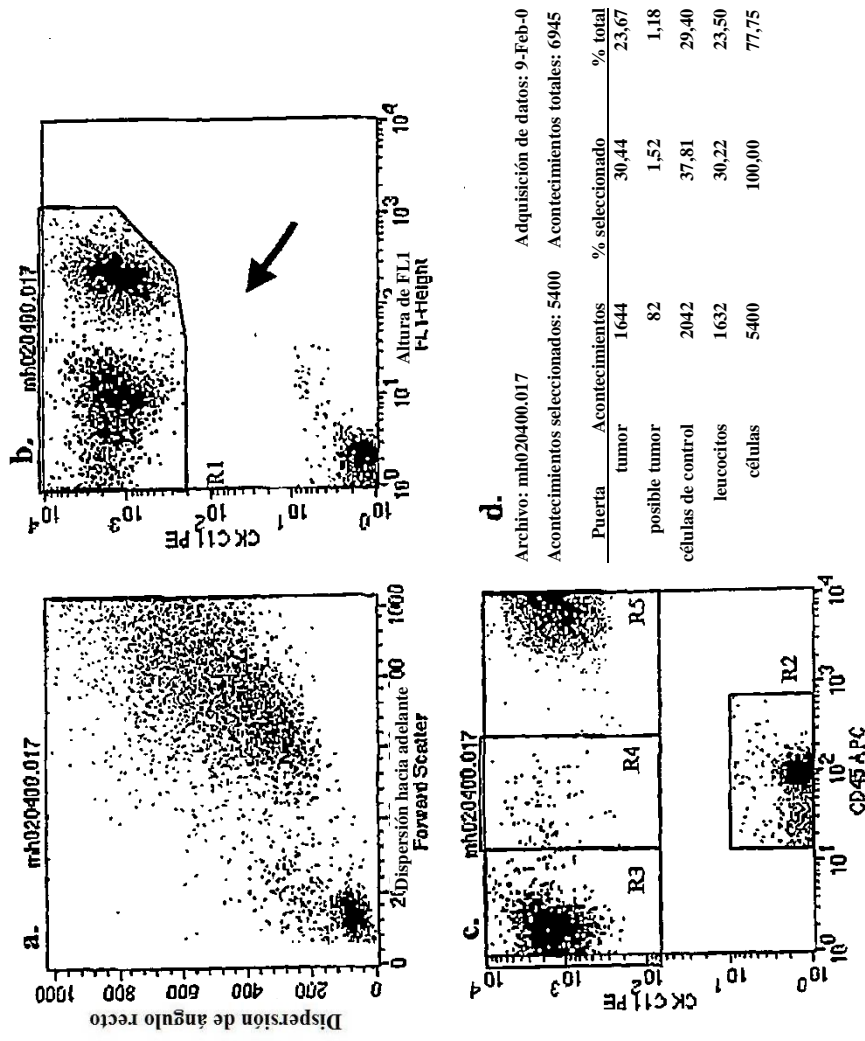


Figura 7