

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 631**

51 Int. Cl.:

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2008 E 08841971 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2210080**

54 Título: **Métodos y dispositivos mejorados para análisis celular**

30 Prioridad:

24.10.2007 US 982279 P
22.09.2008 US 99059

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2015

73 Titular/es:

BIOMARKER STRATEGIES, LLC (100.0%)
855 N. WOLFE ST., SUITE 603
BALTIMORE, MARYLAND 21205, US

72 Inventor/es:

CLARK, DOUGLAS P.;
SCHAYOWITZ, ADAM;
MURPHY, KATHLEEN M. y
DIAMOND, SCOTT L.

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 631 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

Métodos y dispositivos mejorados para análisis celular

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la presente invención se refieren a métodos mejorados para analizar una célula, células agregadas o un tumor sólido. Tales métodos son, por ejemplo, útiles en el campo de la patología y pueden proporcionar resultados analíticos y de procesamiento de células mejorados. El alcance de protección se define mediante las reivindicaciones.

Antecedentes

10 Durante mucho tiempo se han procesado muestras patológicas tradicionales usando métodos que implican la destrucción de las células o tiempos de procesamiento de muestras prolongados. Tales métodos se realizan generalmente en un laboratorio muy lejos del punto de atención. Estos métodos tradicionales no permiten el examen de células vivas, incluyendo biomarcadores dinámicos, relacionados con células vivas, y no permiten un rápido procesamiento de muestras o la generación de resultados analíticos en el punto de atención. Esta falta de información completa y obtenida rápidamente puede impedir que los médicos identifiquen el régimen de tratamiento apropiado o como mínimo ralentizan el proceso, lo que afecta de manera adversa a la calidad de vida del paciente. En la figura 9, se muestra una comparación del procedimiento tradicional con algunas realizaciones mejoradas.

15 Por ejemplo, los oncólogos tienen varias opciones de tratamiento a su disposición, incluyendo diferentes combinaciones de fármacos que se caracterizan como tratamiento de referencia, y varios fármacos que no llevan una declaración en la etiqueta para un cáncer particular, pero para los que hay pruebas de eficacia en ese cáncer. La mayor probabilidad de un buen desenlace del tratamiento requiere que se les asigne a los pacientes un tratamiento contra el cáncer disponible óptimo, y que esta asignación se realice tan rápidamente como sea posible tras el diagnóstico.

20 Aunque algunos cánceres pueden identificarse fácilmente usando marcadores genómicos, no están disponibles marcadores genómicos fiables para todos los cánceres, que pueden caracterizarse mejor como presentan una expresión anómala de uno o (normalmente) muchos genes normales. Las pruebas de diagnóstico disponibles actualmente para diagnosticar tipos de cáncer particulares y evaluar la probable eficacia de diferentes estrategias de tratamiento basándose en la expresión génica pueden tener una o más desventajas, por ejemplo: (1) las pruebas pueden estar diseñadas para someter a prueba sangre y no se adaptan fácilmente para someter a prueba tumores sólidos; (2) los métodos de preparación de muestras para muestras de tumores sólidos, incluyendo desagregación de células, pueden no ser adecuados para manipular células vivas o realizar mediciones posteriores de la expresión de marcadores; (3) muestras pequeñas, por ejemplo, obtenidas usando biopsias con agujas finas, pueden no proporcionar suficiente tejido para realizar un análisis completo; (4) las pruebas pueden requerir cultivar *in vitro* las células, periodos de incubación prolongados y/o retrasos significativos entre el momento en el que se obtienen las células de prueba del paciente y el momento en el que se someten a prueba las células, dando como resultado la posibilidad de una variación amplia e influencias externas sobre la expresión de marcadores; (5) las pruebas pueden no ser adecuadas para medir la expresión de una multiplicidad de genes, fosfoproteínas u otros marcadores en paralelo, lo que puede ser crítico para reconocer y caracterizar la expresión como anómala; (6) las pruebas pueden no ser cuantitativas, basándose principalmente en inmunohistoquímica para determinar la presencia o ausencia de una proteína en contraposición a niveles relativos de expresión de genes; (7) los reactivos y las condiciones de manipulación de las células no están controlados estrictamente, conduciendo a un alto grado de variabilidad de una prueba a otra y de un laboratorio a otro; (8) las pruebas pueden no ser adecuadas para analizar los niveles de ARN, debido a la inestabilidad del ARN y la dificultad práctica de obtención de muestras suficientemente recientes de los pacientes; y (9) las pruebas pueden implicar fijar las células antes de que pueda realizarse cualquier análisis de expresión génica, por ejemplo, en presencia o ausencia de reactivos seleccionados.

45 Recientemente, varios grupos han publicado estudios referentes a la clasificación de diversos tipos de cáncer mediante análisis de expresión génica de microalineamientos (véase, por ejemplo Golub *et al.*, *Science* 286:531-537 (1999); Bhattacharjee *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiang *et al.*, *Bioinformatics* 17 (Supl. 1): S316-S322 (2001); Ramaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:15149-15154 (2001)). También se han notificado determinadas clasificaciones de cánceres de mama humanos basadas en patrones de expresión génica (Martin *et al.*, *Cancer Res.* 60:2232-2238 (2000); West *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11462-11467 (2001); Sorlie *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10869-10874 (2001); Yan *et al.*, *Cancer Res.* 61:8375-8380 (2001)). Sin embargo, estos estudios se centran principalmente en mejorar y refinar la clasificación ya establecida de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, y generalmente no proporcionan nuevos conocimientos sobre las relaciones de los genes expresados diferencialmente. Estos estudios no vinculan los hallazgos con estrategias de tratamiento con el fin de mejorar el desenlace clínico de la terapia contra el cáncer, y no abordan el problema de mejorar y normalizar las técnicas existentes de análisis y manipulación de células. El documento WO 2007/075440 da a conocer microagregados para evaluar los efectos de diversos tratamientos.

Aunque la biología molecular y la bioquímica modernas han revelado más de 100 genes cuyas actividades influyen

5 en el comportamiento de células tumorales, el estado de su diferenciación y su sensibilidad o resistencia a determinados fármacos terapéuticos, con unas pocas excepciones, el estado de estos genes no se ha aprovechado con el fin de tomar decisiones clínicas de manera rutinaria sobre los tratamientos farmacológicos. Una notable excepción es el uso de la expresión de la proteína receptora de estrógenos (ER) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para el tratamiento con fármacos antiestrógenos, tales como tamoxifeno. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes con el fármaco antagonista de Her2 Herceptin® (Genentech, Inc., South San Francisco, Calif.). Sin embargo, para la mayoría de los cánceres, las patologías en la expresión génica pueden ser más sutiles y pueden implicar patrones de expresión de múltiples genes o la expresión de genes en respuesta a estímulos particulares.

10 El desafío del tratamiento contra el cáncer sigue siendo seleccionar como diana regímenes de tratamiento específicos para distinguir de manera patógena tipos de tumores, y para identificar el tratamiento óptimo tan pronto como sea posible con el fin de optimizar el desenlace. Por tanto, existe la necesidad de pruebas que proporcionen simultáneamente información de pronóstico y/o predictiva sobre las respuestas del paciente a la variedad de opciones de tratamiento.

15 Existe la necesidad de un método para preparar biopsias de tumores sólidos o células agregadas de otra forma que aborde las desventajas e integre, en un único aparato pequeño y compacto, la función de manipular y preparar muestras de tejido usando etapas controladas, sistemáticas y eficaces; mantener la viabilidad de la muestra de tejido, para permitir la estimulación y/o conservación de las respuestas de diferentes biomarcadores a partir de la misma muestra de tejido antes de que la muestra pierda viabilidad o se cultive a través de replicación *ex vivo*.

20 **Sumario**

Las realizaciones de la presente invención se refieren a métodos para procesar o preparar una muestra de tejido vivo de células agregadas a partir de un sujeto. Estos métodos pueden incluir: desagregar y dispersar una disolución acuosa que contiene células agregadas vivas obtenidas a partir de un sujeto en al menos una alícuota de prueba en una primera cámara aislada; opcionalmente purificar la alícuota para aumentar el porcentaje de células diana en relación con otros tipos de células contaminantes retirando las células contaminantes; distribuir las células vivas en una o más segundas cámaras aisladas para su análisis; y someter a análisis celular y/o molecular las células distribuidas.

La presente invención se refiere también a métodos para procesar o preparar células cancerosas a partir de un tumor sólido que incluyen: desagregar y dispersar células cancerosas vivas obtenidas a partir de un tumor sólido en al menos una alícuota de prueba en al menos una primera cámara aislada; opcionalmente purificar las células cancerosas vivas para retirar contaminantes; distribuir las células cancerosas vivas en una o más segundas cámaras aisladas para su análisis.

Se describen además en el presente documento cartuchos para procesamiento celular. Por ejemplo, cartuchos para su uso en el procesamiento o la preparación de células cancerosas vivas que tienen una pluralidad de compartimentos estériles, en los que los compartimentos pueden estar separados entre sí. También se describen en el presente documento cartuchos que tienen una pluralidad de compartimentos incluyendo: un compartimento para dispersar células, un compartimento para purificar células y un compartimento que es una cámara aislada.

Se describen en el presente documento sistemas que incluyen un cartucho tal como se describe en el presente documento y un dispositivo analítico. También se describen en el presente documento kits que incluyen los cartuchos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una realización de ejemplo de un cartucho.

La figura 2 muestra cámaras aisladas a modo de ejemplo dentro de un cartucho para recibir y manipular una muestra.

45 La figura 3 muestra un procedimiento de desagregación de ejemplo según la invención.

La figura 4 muestra una realización adicional de un cartucho.

La figura 5 muestra una vista en sección transversal y una desde arriba de una realización a modo de ejemplo de un soporte de portaobjetos de vidrio que puede situarse sobre un cartucho.

La figura 6 muestra una realización adicional de un cartucho que ilustra características a modo de ejemplo.

50 La figura 7 muestra una vista de ejemplo de una realización del cartucho en la que algunos de los compartimentos del cartucho pueden estar separados entre sí.

La figura 8 muestra una realización adicional de un cartucho que ilustra características a modo de ejemplo.

La figura 9 muestra una comparación de un método de procesamiento de muestras de patología tradicional (izquierda) con un método de procesamiento de ejemplo de la presente invención (derecha).

La figura 10 muestra que los métodos de la presente invención producen muestras de ARN que tienen un número de integridad de ARN (RIN) mayor que un procedimiento de incrustación en parafina y fijación con formalina.

5 La figura 11 proporciona una ilustración que muestra que métodos de procesamiento de muestras tumorales tradicionales pueden dañar biomarcadores, lo que puede reducir la información celular disponible.

La figura 12 muestra un método de procesamiento de ejemplo de la presente invención que comienza con la extracción usando aspiración con aguja fina (FNA).

10 La figura 13 muestra puntuaciones de RIN, 13A, μg de ARN producido, 13B, y valores de 260/280, 13C, en células HCT-116 a números de células variables.

La figura 14 muestra puntuaciones de RIN, 14A, μg de ARN producido, 14B, y valores de 260/280, 14C, en células MCF-7 a números de células variables.

La figura 15 muestra el impacto de la dispersión a dinas/cm^2 variables sobre el tamaño de agrupación en células MCF-7 y HCT-116.

15 La figura 16 muestra el impacto de la dispersión a dinas/cm^2 variables sobre la viabilidad celular en células MCF-7 y HCT-116.

La figura 17 muestra niveles variables de inducción de FOS a partir de dispersión y estimulación con EGF en células MCF-7.

20 La figura 18 muestra niveles variables de inducción de FOS a partir de dispersión y estimulación con EGF en células HCT-116.

La figura 19 muestra el enriquecimiento de células tumorales en células MCF-7 y HCT-116 usando los métodos de la presente invención.

La figura 20 muestra los resultados del uso de sondas de células vivas en células MCF-7 preparadas usando los presentes métodos frente a las preparadas usando un procedimiento de fijación con formalina de tres horas.

25 La figura 21 muestra los resultados del uso de sondas de células vivas en células HCT-116 preparadas usando los presentes métodos frente a las preparadas usando un procedimiento de fijación con formalina de tres horas.

La figura 22 muestra una dispersión de ejemplo de células MCF-7 y HCT-116 usando las técnicas de desagregación descritas en el presente documento.

Descripción detallada

30 Se describe en el presente documento un sistema de prueba y procesamiento de células tumorales automatizado, autónomo y fluídico que promueve el desarrollo y uso de terapias dirigidas y pruebas de diagnóstico molecular. Los ejemplos incluyen métodos de uso del sistema, incluyendo métodos de procesamiento patológico mejorados que pueden realizarse con células vivas *ex vivo*.

35 La invención proporciona un método seguro, eficaz, exacto, preciso, reproducible, barato, rentable, eficiente, rápido y conveniente para recoger, manipular y procesar muestras celulares *ex vivo*. Estos métodos pueden mantener la viabilidad de las muestras durante el procesamiento para mantener la integridad de los biomarcadores, y opcionalmente, provocar biomarcadores tales como fosfoproteínas y ARN no presentes en la muestra original a través de estimulación *ex vivo*. La descripción proporciona una gestión de la información y las muestras completamente integrada en un sistema de laboratorio de citología de diagnóstico completo y condiciones controladas tras la biopsia, lo que minimiza la variabilidad entre pruebas, minimiza el riesgo de biocontaminación y minimiza el efecto del propio procedimiento de preparación de las muestras sobre la expresión de biomarcadores. Las realizaciones de la presente invención pueden usarse para facilitar el tratamiento dirigido de los tumores, y opcionalmente también proporcionan una evaluación de la idoneidad de muestras de tejido tal como una función de recuento de células y/u otros análisis relacionados.

45 Tal como se ilustra en la figura 9, las técnicas de procesamiento de células tradicionales pueden usar fijación con formalina antes del procesamiento del tejido y eventualmente incrustan las células en parafina. Esto da como resultado que se "pierda" mucha información celular potencial tal como se muestra en la figura 11. Sin embargo, los métodos mejorados descritos en el presente documento y representados por ejemplo en las figuras 9 y 12 permiten el procesamiento automatizado de células vivas, la estimulación de estas células y luego el análisis de las células usando los métodos descritos a continuación.

Tal como apreciará un experto en la técnica, estos dispositivos, sistemas, kits y métodos novedosos pueden

proporcionar numerosas ventajas en un entorno clínico o de investigación. Por ejemplo, pueden usarse para proporcionar un procesamiento de biopsias inmediato, cerca del paciente sin la necesidad de enviar la muestra a un laboratorio lejano. También pueden usarse para normalizar y automatizar el procesamiento de biopsias de manera rentable. La presente descripción puede proporcionar una información molecular más detallada sobre las células que lo que permiten procedimientos patológicos actuales, lo que permite mayores subclasificaciones de células en una biopsia (por ejemplo, células cancerosas), usando opcionalmente nuevos biomarcadores *ex vivo* y pruebas de diagnóstico. Conjuntamente, las ventajas permiten un diagnóstico rápido en el punto de atención y la posterior creación de regímenes de tratamiento específicos del paciente más eficaces.

En el diagrama de flujo de la figura 12, se muestra un procedimiento de ejemplo, no limitativo para usar los dispositivos, sistemas y métodos, que se describen en más detalle a continuación. El procedimiento puede comenzar obteniendo una muestra de células agregadas tales como la etapa de aspiración con aguja fina (FNA) 1201 mostrada en la figura 12. La muestra se desagrega entonces usando las técnicas novedosas descritas en el presente documento y luego se dispersa 1203 en cámaras aisladas. Si la muestra contiene una mezcla de células de interés y otras células, la muestra puede purificarse opcionalmente para enriquecer 1205 el número de células de interés en la muestra retirando contaminantes y células que no son de interés. La muestra puede estimularse entonces opcionalmente *ex vivo* 1207 o mezclarse de otra forma con un reactivo de prueba y entonces se colocan alícuotas en nuevas cámaras aisladas 1209. Las alícuotas también pueden estimularse opcionalmente *ex vivo* o mezclarse de otra forma con un reactivo de prueba dependiendo del ensayo que esté realizándose. Las alícuotas se analizan entonces para detectar una propiedad de interés. Por ejemplo, pueden prepararse portaobjetos a partir de las alícuotas para análisis microscópico 1211 o pueden lisarse las células de las alícuotas y analizarse los ácidos nucleicos, ARN y ADN, 1213 y 1215, respectivamente. Los resultados del análisis se comunican entonces al investigador o médico que puede adoptar la acción apropiada, por ejemplo, establecer un régimen de tratamiento para un paciente del que se tomó la FNA. Además, tal como se ilustra en la figura 11, los métodos y dispositivos mejorados dados a conocer en el presente documento pueden permitir a un investigador o médico acceder a nueva información que se "pierde" durante las técnicas de procesamiento de células patológicas tradicionales.

I. DISPOSITIVOS, SISTEMAS Y KITS

A. Dispositivos

Se describe en el presente documento un dispositivo o una plataforma, que es útil, por ejemplo en los métodos de procesamiento y/o preparación de células vivas descritos en el presente documento. Este dispositivo también se denomina cartucho. Algunas realizaciones de los dispositivos se describen en más detalle a continuación y se representan en las figuras 1-8.

Tales cartuchos pueden contener una o más cámaras aisladas. Una cámara aislada es cualquier compartimento, sección u otro soporte de utilidad que pueda contener una muestra de células vivas o una muestra de células fijadas, procesadas y/o estabilizadas. Por ejemplo, el término cámara aislada incluye, pero no se limita a, pocillos, viales, tubos, portaobjetos (por ejemplo, de vidrio) y placas.

Las cámaras aisladas o los compartimentos son adecuados para una, algunas o todas de las siguientes funciones: (1) recibir muestras biológicas por medio de un septo u otra cámara sellada; (2) almacenar agujas de jeringas de manera contenida y segura; (3) almacenar reactivos líquidos disponibles para su retirada por medio del septo; (4) recibir y almacenar desechos por medio del septo; (5) alterar la muestra por medio de cizalladura de líquido y cizalladura mecánica; (6) contar las células y visualizar las células; (7) realizar separaciones basadas en perlas y (8) contener resinas sólidas.

Cada cartucho puede contener una o más cámaras aisladas dependiendo de su uso. Por ejemplo, un cartucho puede tener entre 1 y aproximadamente 200 cámaras aisladas, entre aproximadamente 1 y 100 cámaras aisladas, o entre aproximadamente 1 y 50 cámaras aisladas. Algunos cartuchos tienen aproximadamente 24, aproximadamente 48 o aproximadamente 96 cámaras aisladas.

Un cartucho tiene una o más de una primera cámara aislada y una o más de una segunda cámara aislada. Un cartucho puede tener una primera cámara aislada para contener una muestra de células. Un cartucho de este tipo también puede presentar una o más segundas cámaras aisladas que contienen las alícuotas dispersadas de la muestra de células. La segunda cámara aislada puede contener una cantidad predeterminada de un reactivo de prueba en la cámara antes de que se añada la alícuota de células dispersadas. La figura 2 ilustra cámaras aisladas a modo de ejemplo que pueden estar presentes para recibir y manipular una muestra.

También se describe en el presente documento un cartucho que tiene compartimentos (por ejemplo, cámaras aisladas) que pueden estar separados entre sí. Tal como se ilustra en la figura 7, los compartimentos pueden estar separados y la muestra en el interior puede usarse para diferentes pruebas analíticas. Por ejemplo, puede enviarse un compartimento para análisis de ADN, otro para análisis de ARN, otro para análisis microscópico y otro para análisis inmunohistoquímico. Por ejemplo, las segundas cámaras aisladas en un cartucho pueden estar separadas de la primera cámara aislada.

Los dispositivos pueden contener un elemento de calentamiento para mantener la temperatura del cartucho a una

temperatura deseada, por ejemplo, de entre aproximadamente 30°C y 40°C, de entre aproximadamente 36°C y aproximadamente 38°C; o cualquier otra temperatura deseada.

5 Los dispositivos pueden contener un código de barras u otros medios de identificación del cartucho y/o la fuente de la muestra de células en el dispositivo. El código de barras u otros medios de identificación del cartucho pueden usarse para facilitar la identificación de la muestra y/o para la seguridad del paciente. Tales medios de identificación pueden interactuar con sistemas de almacenamiento de datos basados en ordenador, sistemas y/o ensayos de procesamiento de células automatizados y asistentes digitales personales. En la figura 4, se representa un ejemplo de un cartucho que tiene un código de barras.

10 El dispositivo puede incluir un mecanismo de recuento de células, tal como se representa, por ejemplo en la figura 2F. Estos mecanismos pueden ser sistemas automatizados o sistemas manuales. Por ejemplo, el mecanismo de recuento de células puede ser un hemocitómetro o un instrumento Cellometer® (disponible de Nexcelom Biosciences, LLC) y un posible recuento de base óptica o digital. Tal como apreciará un experto en la técnica, se conocen bien en la técnica otros métodos de recuento de células y también pueden usarse.

15 Los cartuchos pueden tener uno o más módulos o cámaras aisladas que contienen resinas, reactivos, disolventes y otros materiales. Un módulo puede ser una única cámara aislada o un conjunto de una pluralidad de cámaras aisladas usadas para un fin particular. Por ejemplo, cuando están involucradas múltiples manipulaciones (por ejemplo, lisado y tinción) en una prueba particular, puede usarse más de una cámara aislada como parte de ese "módulo" de prueba. Por ejemplo, una o más cámaras aisladas pueden contener resinas con ácidos nucleicos, proteínas, polímeros naturales o sintéticos o moléculas pequeñas unidos. Una o más cámaras aisladas pueden contener líquidos, por ejemplo tampones, enzimas de biología molecular, moléculas biológicas incluyendo ácido nucleico o proteínas, o compuestos químicos de molécula pequeña. Una o más cámaras aisladas pueden contener reactivos secos para solubilizaciones en el cartucho, por ejemplo en las que los reactivos secos pueden incluir ácido nucleico, proteínas, polímeros naturales o sintéticos o moléculas pequeñas.

25 Una cámara u otro dispositivo de obtención de imágenes digitales forma parte del cartucho o puede usarse con un cartucho. Por consiguiente, los cartuchos pueden incluir un módulo de obtención de imágenes que permite la visualización de células y el recuento de células basado en imágenes digitales (véase la figura 2F) en muestras de volúmenes de entre 10 y 500 microlitros y dicho volumen se dispensa en la celda de obtención de imágenes mediante desplazamiento positivo o mediante acción capilar. El dispositivo de obtención de imágenes también puede usarse para tomar fotografías de la muestra, por ejemplo, componentes celulares dentro de la muestra tales como datos de localización de proteínas.

30 Los cartuchos pueden tener un módulo fluídico que hace pasar células a través de microconductos con diámetros de 10 a 500 micrómetros para crear tensiones de cizalladura de pared de 100 a 800 dinas/cm² usando volúmenes de entre 10 y 1000 microlitros.

35 Los cartuchos pueden tener una cámara aislada o un módulo de inmunodepleción. Una cámara aislada o un módulo de inmunodepleción de este tipo puede utilizar perlas magnéticas u otros métodos. Véanse, por ejemplo, los productos de perlas magnéticas disponibles de Dynal Biotech, Oslo, Noruega. Estos ejemplos se describen en más detalle en la sección de métodos.

40 Los cartuchos pueden tener uno o más módulos o cámaras aisladas que contienen o están diseñados para contener una muestra biológica que puede ser, por ejemplo, una biopsia de aspiración con aguja fina, biopsia central, muestra de líquido biológico tal como saliva, sangre, semen o líquido vaginal, tejido recogido de un organismo o muestra de cultivo celular. Un módulo de este tipo también puede denominarse primera cámara aislada y se representa, por ejemplo, en la figura 2A y en la figura 4.

45 Se describen en el presente documento cartuchos, por ejemplo adecuados para su uso en los métodos y dispositivos descritos en el presente documento, que tienen por ejemplo módulos individuales y autónomos, conteniendo los módulos medios adecuados para la manipulación de células y estando cada uno sellado por un septo u otro mecanismo de sellado, pudiendo dicho septo o mecanismo de sellado sortearse o perforarse mediante un tubo, por ejemplo, aguja, y resellarse tras la retirada del tubo. En algunas realizaciones, hay suficientes módulos o cámaras aisladas como para permitir un suministro y una retirada unificados de todos los reactivos líquidos, muestras de prueba biológicas, objetos punzocortantes (es decir, agujas), etc. dentro y fuera del cartucho o un dispositivo analítico que encierra el cartucho en el que el dispositivo analítico proporciona contención de peligros biológicos durante el análisis. Los módulos pueden contener varias cámaras aisladas con reactivos y dispositivos asociados para realizar pruebas o actividades específicas tales como recuento de células o ensayo de viabilidad. Los ejemplos descritos anteriormente se representan, por ejemplo, en las figuras 1, 2, 4, 6, 7 y 8.

55 Tal como se muestra en la figura 5, 501B, los cartuchos pueden tener portaobjetos apilados en, por ejemplo, una configuración en escalera 501A que permite que los portaobjetos se utilicen eficazmente para aceptar material celular material al que luego se accede posteriormente y se retira individualmente mediante medios manuales o robóticos. La figura 5 muestra una sección transversal que ilustra la configuración en escalera 501A/B. Por tanto, se describe en el presente documento un dispositivo que comprende un soporte que contiene una multiplicidad de

5 sustratos planos, por ejemplo, portaobjetos de vidrio, dispuestos en una configuración en escalera, en el que el soporte restringe el movimiento lateral y vertical de los sustratos. Los sustratos adecuados incluyen, pero no se limitan a, piezas rectangulares planas tales como portaobjetos de vidrio, placas de metal o dispositivos microfluídicos. Los sustratos pueden tener un grosor de entre 0,1 y 3 mm y/o dimensiones de 2-3 cm de ancho por 7-9 cm de largo. Tal como reconocerá un experto en la técnica, otros sustratos o cámaras aisladas pueden estar dispuestos de manera similar sobre los cartuchos.

10 El soporte sobre el cartucho tiene una parte inferior y una parte de tapa, conteniendo cada parte escalones para colocar e impedir el movimiento de una pila en escalera de sustratos individuales dentro del soporte o en relación con el soporte. Cuando se almacenan en el soporte, los sustratos pueden tener un extremo distal en el que la parte más inferior sobresale más allá de la pila (véase la figura 5 en 501B). Este extremo distal puede tener una o más características impresas, pocillos o depresiones. Estas características impresas pueden ser marcadores para identificar los sustratos una vez que se han usado o antes de su uso. El soporte tiene una tapa y el extremo distal del sustrato se expone para acceder al mismo a través de un septo o septos de la tapa. El soporte puede montarse y desmontarse en un bastidor, por ejemplo, un bastidor con una huella compatible con SBS. Opcionalmente, el soporte puede tener un orificio pequeño o pluralidad de orificios en la parte inferior.

15 La figura 5 ilustra una vista desde arriba de un soporte a modo de ejemplo. La pila de portaobjetos puede abordarse desde arriba según una separación de filas y columnas normalizada que hace que el sistema sea ideal para uso manual o automatizado. El soporte puede tener una tapa con septos por encima de cada sustrato para abordar posiciones por encima de cada sustrato independientemente. Por ejemplo, el soporte puede tener una cámara sellable con junta de estanqueidad o junta tórica por encima de cada posición abordable de cada sustrato. Estas cámaras selladas con junta de estanqueidad o junta tórica pueden ser de cualquier forma deseada, por ejemplo, circular o rectangular o cuadrada.

20 El posicionamiento del soporte y los sustratos de manera predeterminada puede permitir el suministro múltiple de muestra de fluido de volúmenes que oscilan entre 1 nanolitro y 0,5 mililitros al sustrato a través del uso de una pipeta, aguja de jeringa o herramienta de precisión. El soporte restringe el desplazamiento lateral o vertical del sustrato durante el suministro de fluido y restringe el movimiento del sustrato durante el suministro de fluido. El soporte permite la rotación vertical pero restringe el movimiento lateral de los sustratos. Esta flexibilidad puede permitir un suministro de múltiples fluidos automatizado o manual a y su retirada de cada cámara aislada usando una amplia gama de métodos y sistemas.

25 El soporte puede desensamblarse retirándose la parte de tapa y la parte inferior puede montarse sobre un estante que coloca un saliente a través del orificio de la parte inferior del soporte. Los sustratos pueden presentarse de forma única mientras están sobre el saliente del estante para su agarre secuencial por la mano humana o una herramienta de agarre robótica. Esto permite la retirada secuencial de sustratos, por ejemplo, el portaobjetos inferior en primer lugar y el portaobjetos superior en último lugar, para impedir que se raspen los sustratos sobre muestras depositadas sobre cada muestra permitiendo de ese modo un transporte estable de material celular basado en portaobjetos. En las figuras 6 y 8, se dan a conocer vistas desensambladas de cartuchos.

30 Las muestras fluidicas pueden suministrarse a los sustratos en un sistema automatizado o manualmente. Las muestras fluidicas se suministran secuencialmente a los sustratos en un orden predeterminado. Las muestras fluidicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones, suspensiones o mezclas que contienen polimeros. Por ejemplo, la muestra fluidica puede ser, pero no se limita a, materiales quimicos o biologicos, por ejemplo, moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas, proteínas, ácido nucleico, células, partículas, disolventes volátiles y no volátiles, polimeros o fijadores.

35 Se describen además en el presente documento placas de pocillos útiles en los cartuchos. Actualmente, existe la necesidad de una tecnología de placas de pocillos que permita que los componentes (tubos abiertos, tubos sellados, jeringas, puntas de pipeta, etc.) se bloqueen en su posición de modo que no se salgan de la posición si la placa se sujeta de lado o boca abajo. Además, la tecnología de placas de pocillos permite que el componente bloqueado se retire mediante una herramienta de pipeta convencional (cartesiana), se utilice y se devuelva a una posición bloqueada, sin requerir siquiera un eyector de puntas en la herramienta de pipeta. Se describe además en el presente documento una placa de pocillos que comprende una superficie plana con una multiplicidad de pocillos que se fabrica de modo que dos posiciones adyacentes (denominado "pocillo doble") en la placa de pocillos están conectadas por un espacio intermedio que permite el tránsito lateral de un componente.

40 El componente puede ser un tubo abierto, tubo sellado, tubo con septos, tubos transparentes, cualquier recipiente, jeringa, aguja, cuchilla o punta de pipeta. El componente contiene una pieza rígida de material de forma cuadrada, circular u otra de grosor adecuado para pasar a través de un mecanismo de cierre y se adapta a la forma del mecanismo de cierre de un pocillo de bloqueo.

45 En algunos ejemplos de la placa de pocillos dobles, la primera posición adyacente del pocillo doble (denominada "pocillo de bloqueo") contiene lengüetas pequeñas que permiten que los componentes se bloqueen en su posición y resistan el movimiento, especialmente la retirada del componente en la dirección vertical cuando la placa está orientada hacia arriba. Estas placas de pocillos dobles también pueden tener un pocillo de bloqueo que contiene una

junta de estanqueidad elástica que se comprime parcialmente cuando se bloquea un componente en el pocillo de bloqueo y esta junta de estanqueidad impide el movimiento del componente bloqueado.

5 El componente contiene un "accesorio" abordable por una herramienta (por ejemplo, una pipeta o jeringa) en el que el accesorio (por ejemplo, un cierre de tipo Luer) permite un ajuste ceñido y hermético con la herramienta. La herramienta puede montar el componente que está bloqueado en el pocillo de bloqueo y empujar sobre el componente para comprimir adicionalmente la junta de estanqueidad permitiendo de ese modo que el componente se aloje en una posición que permite el tránsito lateral dentro del espacio intermedio del pocillo doble desde la primera posición (pocillo de bloqueo) hasta la segunda posición del pocillo doble, denominada "pocillo de liberación". El componente puede desplazarse libremente fuera y dentro del pocillo de liberación cuando se mueve verticalmente mediante la herramienta. La herramienta también puede suministrar un componente completamente dentro del pocillo de bloqueo y, cuando la placa de pocillos se ancla a una superficie, la herramienta puede moverse verticalmente lejos de la placa de pocillos, desmontando de ese modo el componente mientras que el componente está bloqueado en el pocillo de bloqueo.

15 La herramienta y la placa pueden montarse sobre una sistema de pórtico controlado por ordenador que permite el movimiento de la herramienta y/o placa en coordenadas cartesianas (x, y, z) permitiendo de ese modo que la herramienta suministre los componentes al pocillo de bloqueo y deje entonces los componentes en el pocillo de bloqueo, monte los componentes en el pocillo de bloqueo y los mueva al pocillo de liberación, retire los componentes del pocillo de liberación y los libere de la placa de pocillos. Una configuración de este tipo también permite que la herramienta suministre los componentes al pocillo de liberación y deje los componentes en el pocillo de liberación por medio de un eyector de puntas.

20 Algunos sistemas controlados por ordenador que usan la herramienta y la placa pueden configurarse para que no requieran el uso de movimiento angular (eje theta) impidiendo de ese modo la reorientación por rotación posicional del componente con respecto a la placa de pocillos mientras que el componente está en la placa de pocillos o se retira de la placa de pocillos.

25 Los pocillos dobles pueden usarse para permitir que fluya fluido a través de una trayectoria predeterminada que se ha diseñado para retirar contaminantes de la muestra. En la figura 2, por ejemplo, se ilustra un sistema de pocillos dobles de este tipo en los pocillos C y D.

B. SISTEMAS

30 Se describen también en el presente documento sistemas que utilizan los cartuchos y métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un sistema puede incluir uno o más de los cartuchos de la invención, o bien individualmente o bien como parte de un kit, y un dispositivo analítico (también denominado en el presente documento aparato) que puede interactuar con el cartucho para obtener al menos un resultado analítico. Por ejemplo, el sistema puede usarse en el punto de atención para obtener un diagnóstico médico para un paciente.

35 Por consiguiente, se describe en el presente documento un dispositivo analítico para realizar operaciones con un cartucho que contiene módulos individuales (por ejemplo, compartimentos aislados) en el que el dispositivo comprende uno o más soportes para una o más jeringas, teniendo las jeringas agujas huecas y estando orientadas por encima de una plataforma sobre la que se ubica el cartucho de manera que las agujas pueden dirigirse a módulos individuales del cartucho usando un sistema de coordenadas cartesianas (x, y, z) mediante un control de movimiento controlado por ordenador para aplicar succión y dispensar el contenido a los módulos del cartucho, teniendo cada uno de los módulos un septo que puede penetrarse mediante las agujas, pero que por lo demás aísla el contenido de los módulos del entorno. En las figuras 1, 4 y 8, se representan ejemplos de estos cartuchos. El soporte puede recoger una jeringa o herramienta proporcionada por el cartucho.

45 El dispositivo analítico puede tener medios para la recepción de un cartucho tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una ranura, abertura, orificio u otra zona que pueda recibir un cartucho. Una vez que se ha colocado un cartucho en los medios para la recepción, se cierra una compuerta para sellar los medios para la recepción y de ese modo se encierra de ese modo el cartucho completamente dentro del dispositivo analítico. Este cierre de la compuerta puede realizarse manual o automáticamente. Estas versiones completamente encerradas pueden ser especialmente útiles en la prevención de posibles peligros biológicos debidos a derrames o liberación de otra forma al laboratorio o entorno clínico.

50 Los sistemas para usar el dispositivo analítico y cartucho no requieren ni usan una instalación de vacío; instalación de servicio de aire; instalación de gas natural; y pueden estar libres de todas las tuberías de reactivos (fluido de proceso, reactivos analíticos y corrientes de desecho) y frascos adjuntos. Es decir, el dispositivo es completamente autónomo.

55 Los cartuchos usados en un sistema de este tipo, o usados independientemente, también pueden ser autónomos. Esto significa que el cartucho se carga previamente con todas las herramientas necesarias (por ejemplo, puntas de pipeta) y reactivos (por ejemplo, un reactivo de prueba, colorante u otro compuesto) requeridos para realizar un ensayo deseado o bien manualmente o bien usando un sistema automatizado. Por ejemplo, el cartucho podría cargarse previamente con un panel de agentes terapéuticos contra el cáncer (por ejemplo, cada uno en una cámara

aislada tal como un pocillo en una placa) y todas las herramientas necesarias para desagregar y dispersar una muestra en estos pocillos.

Los sistemas pueden incluir una capacidad de obtención de imágenes interna para abordar un módulo de un cartucho. Este sistema puede usarse para generar datos que entonces se envían a un usuario u otro dispositivo.

5 El dispositivo analítico también puede incluir componentes necesarios para la incubación térmica para conservar la viabilidad celular mientras que se ejecutan las pruebas en la muestra. La parte de incubación de un dispositivo analítico de este tipo puede contener uno o más cartuchos, opcionalmente en un orden predeterminado (por ejemplo, orden cronológico basándose en el tiempo de extracción de las muestras).

10 Cualquiera de los dispositivos anteriores también puede acoplar identificadores de la muestra a módulos del cartucho y transmitir información de muestra y procesar la información por medio de líneas de comunicación a otros dispositivos o puede presentar un resultado para que lo examine un usuario.

C. KITS

15 Se describen además en el presente documento kits que contienen un dispositivo tal como se describe en el presente documento. Los kits de ejemplo incluyen uno o más cartuchos descritos en el presente documento envasados en un recipiente. Los kits pueden incluir además instrucciones de uso impresas, reactivos y tampones, sondas moleculares, uno o más reactivos de prueba tal como se comenta a continuación, herramientas de desagregación o distribución tales como pipeteadores o agujas, y otros artículos útiles en la realización de los métodos descritos a continuación.

20 Estos kits pueden esterilizarse usando métodos conocidos en la técnica y envasarse de manera que se conserve la esterilización. Estos kits pueden comercializarse como kits individuales o en envases múltiples. Los kits también pueden diseñarse de manera que sean resistentes a la manipulación indebida o diseñarse para indicar si se ha producido manipulación indebida.

25 Un kit puede incluir un cartucho para el análisis tal como se describe en el presente documento que puede usarse manualmente en vez de a través del uso de un aparato automatizado. En tales casos, los reactivos y el equipo requeridos para realizar la prueba o el propósito del cartucho pueden proporcionarse como parte del kit. El equipo, por ejemplo agujas de jeringa, pipetas, etc., pueden estar precargadas en el cartucho o pueden estar fuera del cartucho y proporcionarse como parte del kit. El equipo puede suministrarse por el usuario y no como parte del kit. De manera similar, los reactivos de prueba que se usan con el kit pueden estar precargados en cámaras aisladas particulares del cartucho o envasadas fuera del cartucho para su aplicación por el usuario. Los kits pueden envasarse como, por ejemplo, un único cartucho para una única prueba, un único cartucho cargado o preparado para múltiples pruebas, o múltiples cartuchos para múltiples pruebas.

30 Opcionalmente, el kit también contiene directrices para el uso apropiado del cartucho y otros artículos necesarios, por ejemplo, reactivos, como parte de un ensayo o método tal como los descritos en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede contener una notificación o instrucciones impresas. Tales instrucciones impresas pueden estar en un formulario prescrito por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para su administración a seres humanos para diagnosticar o tratar un estado que podría tratarse usando información derivada de los ensayos, métodos y dispositivos descritos en el presente documento. El kit comprende además material impreso, que, por ejemplo, proporciona información sobre el uso del kit para procesar células o un dispositivo de medios de registro previo que, por ejemplo, proporciona información sobre el uso del kit para procesar células.

35 "Material impreso" puede ser, por ejemplo, uno de un libro, cuadernillo, folleto o prospecto. El material impreso puede describir ensayos y/o protocolos experimentales para procesar células según los presentes métodos. Los posibles formatos incluyen, pero no se limitan a, instrucciones paso a paso, una lista enumerada por puntos, una lista de preguntas frecuentes (FAQ, *frequently asked questions*) o un diagrama. Adicionalmente, la información que va a transmitirse puede ilustrarse de forma no textual usando imágenes, gráficos u otros símbolos.

40 Un "dispositivo de medios de registro previo" puede ser, por ejemplo, un dispositivo de medios visuales, tal como un casete de cinta de video, un DVD (disco de vídeo digital), una tira de película, una película de 35 mm o cualquier otro dispositivo de medios visuales. Alternativamente, el dispositivo de medios de registro previo puede ser una aplicación de software interactiva, tal como un CD-ROM (disco compacto-memoria de sólo lectura) o disco flexible. Alternativamente, el dispositivo de medios de registro previo puede ser, por ejemplo, un dispositivo de medios de audio, tal como una grabación, un casete de audio o disco compacto de audio. La información contenida en el dispositivo de medios de registro previo puede describir ensayos experimentales y/o protocolos para procesar células según los presentes métodos.

55 II. MÉTODOS

La presente invención se refiere a métodos novedosos de procesamiento de muestras celulares, en particular

5 células agregadas o tumores sólidos que pueden usarse en un contexto clínico o de investigación. Estos métodos incluyen desagregar y dispersar una disolución acuosa que contiene células cancerosas vivas obtenidas a partir de un sujeto en al menos una alícuota de prueba en una primera cámara aislada; opcionalmente purificar o manipular la muestra para aumentar el porcentaje de células diana en relación con otros tipos de células contaminantes retirando las células contaminantes; distribuir las células cancerosas vivas purificadas en una o más segundas cámaras aisladas para su análisis, manipulación o estimulación; y someter a análisis celulares y/o moleculares las células distribuidas. Las células distribuidas pueden ser células vivas o células muertas, dependiendo del desenlace deseado y el ensayo celular de interés.

10 Otros métodos incluyen métodos para procesar o preparar células cancerosas a partir de un tumor sólido que comprende: a. desagregar y dispersar células cancerosas vivas obtenidas a partir de un tumor sólido en al menos una alícuota de prueba en al menos una primera cámara aislada; opcionalmente purificar o manipular las células cancerosas vivas para retirar contaminantes; distribuir las células cancerosas purificadas vivas, purificadas en una o más segundas cámaras aisladas para su análisis; y someter a análisis celular y/o molecular las células.

15 Los métodos de la presente invención permiten que se procesen rápidamente células vivas. Las células pueden procesarse en un estado vivo con estrés o activación celular mínimos (por ejemplo, estrés ambiental, estrés inducido por temperatura, estrés metabólico o estrés inducido químicamente). El término "estrés o activación celular mínimo" se define por cambios mínimos en el ruido de fondo de rutas de estrés celular y señalización celular en comparación con la estimulación. Por ejemplo, tal como se observa en la figura 17, una comparación de la inducción de FOS (o c-fos) en células antes y después de la desagregación y/o dispersión puede mostrar una inducción mínima (3-5 veces) de FOS u otros genes de respuesta temprana o indicadores de estrés biológico en comparación con muestras estimuladas (aumento de 20-30 veces).

20 Otra ventaja de los métodos es que pueden usar números muy bajos de células en la muestra original. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el número total de células agregadas o células de tumores sólidos procesadas es de entre aproximadamente 1×10^3 y 1×10^7 .

25 Los métodos de la presente invención también permiten un rápido procesamiento de las muestras. La estabilización de las células vivas distribuidas se completa en el plazo de aproximadamente una hora, aproximadamente dos horas, aproximadamente tres horas o aproximadamente cuatro horas desde la obtención de la muestra a partir del sujeto. Este tiempo de procesamiento sorprendentemente corto elimina la necesidad de cultivo celular al mismo tiempo que se mantienen altas tasas de viabilidad celular, por ejemplo, por encima de aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%. La tasa de viabilidad celular es de aproximadamente el 70% o aproximadamente el 75%. El término "aproximadamente" cuando se usa conjuntamente con un número, por ejemplo un porcentaje, significa más o menos el 10% del número. Por ejemplo, el término "aproximadamente el 60%" incluye entre el 54% y el 66%.

A. Obtención de la muestra

35 La muestra usada en los métodos y dispositivos descritos en el presente documento puede obtenerse de una variedad de modos. La muestra pueden ser células vivas tomadas de un sujeto, tal como un mamífero (por ejemplo, un ser humano) u otro organismo vivo. Por ejemplo, la muestra puede ser una biopsia tomada de un paciente humano en un entorno clínico para su análisis que eventualmente se usa para ayudar a determinar el diagnóstico clínico y el ciclo de tratamiento adecuados.

40 La muestra también puede ser cualquier grupo de células o célula individual, agregadas o desagregadas, que sea de interés en un entorno clínico o de investigación. Por ejemplo, tumores sólidos así como células individuales tales como linfomas o células que se han desagregado usando otros medios distintos de los descritos en el presente documento, tales como, usando tripsina. Estas muestras pueden ser de líneas celulares existentes, xenoinjertos o muestras de pacientes que se han examinado por motivos distintos de proporcionar un diagnóstico clínico. Tales muestras pueden analizarse para caracterizar adicionalmente las células y sus respuestas a reactivos de prueba específicos. Estas aplicaciones pueden ser útiles como parte de los ensayos de selección y desarrollo de fármacos para identificar nuevos compuestos o mejorar la administración de compuestos existentes.

45 Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse con cualquier tipo de células agregadas o células tumorales. Por ejemplo, pueden someter a prueba y procesar carcinomas o sarcomas. Los cánceres de ejemplo que pueden someterse a prueba con los presentes métodos incluyen, pero no se limitan a, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer cerebral, cáncer de piel y cáncer de vejiga. Estos cánceres pueden ser de un ser humano, otro mamífero o un xenoinjerto de células cancerosas humanas extraídas de un mamífero no humano (por ejemplo, un ratón).

55 La muestra de tejido es una parte de un tumor sólido o un tumor completo. Una muestra de tejido de este tipo que contiene células tumorales para su uso en la presente invención puede obtenerse mediante cualquier método tal como se conoce en la técnica, por ejemplo, tomando una biopsia de un paciente. Las biopsias adecuadas incluyen, pero no se limitan a, biopsias por incisión, biopsias centrales, biopsias con sacabocados y biopsias de aspiración

con aguja fina, así como biopsias por escisión. En algunas realizaciones, la biopsia se obtiene mediante aspiración con aguja fina (FNA) de un tumor.

La biopsia de aspiración con aguja fina (FNA) se realiza con una aguja fina unida algunas veces a una jeringa y otras veces usada independientemente. La biopsia de aspiración o FNA puede emplearse para obtener una muestra cancerosa. La biopsia de FNA puede ser una biopsia percutánea (a través de la piel) o alternativamente a través de la luz de un órgano tal como el bronquio, esófago, estómago o intestino. La biopsia de FNA se logra normalmente con una aguja de calibre fino (calibre 21 o más fino, por ejemplo, calibre 22 o calibre 25). En primer lugar, se limpia la zona y luego se adormece habitualmente con un anestésico local. Se coloca la aguja en la región del órgano o tejido de interés. Una vez que se coloca la aguja, puede crearse un vacío con la jeringa, o alternativamente puede utilizarse acción capilar dentro de la aguja sola, y se realizan múltiples movimientos dentro y fuera de la aguja. Las células de las que van a tomarse muestran se llevan a la luz de la aguja y algunas veces el cubo de la aguja a través de una acción de microextracción del bisel de la aguja a medida que pasa a través del tejido. Se producen habitualmente de tres a seis muestras separadas. Sitios de cáncer metastásico tales como ganglios linfáticos e hígado son buenos candidatos para biopsias de FNA. Los procedimientos de FNA se realizan normalmente usando obtención de imágenes por ultrasonidos o tomografía computarizada (TC).

Una biopsia con aguja central (o biopsia central) se realiza insertando una aguja hueca pequeña a través de la piel y dentro del órgano. Entonces se hace avanzar la aguja dentro de las capas de células para retirar una muestra o núcleo. La aguja puede estar diseñada con una punta cortante para ayudar a retirar la muestra de tejido. La biopsia central se realiza a menudo con el uso de una pistola accionada por resorte para ayudar a retirar la muestra de tejido. La biopsia central se realiza normalmente con guiado mediante imágenes tal como obtención de imágenes por TC, ultrasonidos o mamografía. La aguja se coloca o bien a mano o bien con la ayuda de un dispositivo de toma de muestras. Se realizan a menudo múltiples inserciones para obtener tejido suficiente, y se toman múltiples muestras. La biopsia central está asistida algunas veces mediante succión con un dispositivo de vacío (biopsia asistida por vacío). Este método permite la retirada de múltiples muestras con la inserción de una aguja sólo. A diferencia de la biopsia central, la sonda de biopsia asistida por vacío se inserta tan sólo una vez en el tejido a través de una diminuta incisión en la piel. Se toman entonces múltiples muestras usando una rotación de la abertura (orificio) de la aguja de toma de muestras y con la ayuda de succión. Por tanto, puede emplearse la biopsia con aguja central o biopsia con aguja asistida por vacío para obtener una muestra de tejido.

La biopsia endoscópica es un tipo común de biopsia que puede emplearse para obtener una muestra. La biopsia endoscópica se realiza a través de un endoscopio (un cable de fibra óptica para observar el interior del cuerpo) que se inserta en el cuerpo junto con instrumentos de toma de muestras. El endoscopio permite la visualización directa de una zona en el revestimiento del órgano de interés; y la recogida o desprendimiento de pedazos diminutos de tejido con pinzas unidas a un cable largo que discurre por el interior del endoscopio de la muestra. La biopsia endoscópica puede realizarse, por ejemplo, en el tracto gastrointestinal (endoscopia del tubo digestivo), la vejiga urinaria (citoscopia), la cavidad abdominal (laparoscopia), la cavidad articular (artroscopia), la parte media del tórax (mediastinoscopia) o la tráquea y el sistema bronquial (laringoscopia y broncoscopia), o bien a través de un orificio corporal natural o bien a través de una pequeña incisión quirúrgica. La biopsia de aspiración con aguja fina guiada por ultrasonido endoscópico puede realizarse también en el pulmón o ganglios linfáticos mediastínicos, páncreas o hígado usando un enfoque transesofágico, transgástrico o transduodenal.

Puede emplearse biopsia superficial para obtener una muestra de cáncer. Esta técnica implica la toma de muestras o el raspado de la superficie de un tejido u órgano para retirar células. La biopsia superficial se realiza a menudo para retirar un pequeño trozo de piel.

B. Dispersión y desagregación de células

La muestra obtenida para el procesamiento puede prepararse para su análisis separando las células entre sí (si están agregadas) y luego dispersando las células separadas en alícuotas de prueba dentro de los cartuchos descritos en el presente documento o en otro recipiente adecuado. Este procedimiento puede consistir en múltiples etapas que incluyen dispersión y ensayos de recuento/viabilidad.

En comparación con muestras de tumores extirpados quirúrgicamente, las muestras usadas en los métodos pueden contener números relativamente pequeños de células (por ejemplo, células tumorales), que, en ausencia de los métodos dados a conocer en el presente documento, pueden en algunos casos limitar la utilización de estas muestras pequeñas en muchas tecnologías de diagnóstico molecular actuales. Además, las muestras de FNA de tumores sólidos o células de tumores sólidos obtenidas usando otros métodos pueden contener aglutinaciones extremadamente grandes de células (>500 células), lo que impide una distribución uniforme de la muestra en múltiples compartimentos de prueba.

Desagregar y dispersar tales células al mismo tiempo que no se destruyen ni se activan excesivamente rutas de respuesta al estrés dentro de las células es un procedimiento delicado que requiere técnicas y métodos precisos. Tal como se usa en el presente documento, desagregación significa separar células o proporcionar una muestra de células aproximadamente homogénea de tal modo que una muestra que contiene las células puede dispersarse en múltiples muestras relativamente uniformes. Por ejemplo, en células dependientes de anclaje tales como endotelio,

fuerzas de cizalladura laminares unidireccionales sostenidas a niveles arteriales (de 10 a 25 dinas/cm²) pueden provocar cambios rápidos en el metabolismo (producción de NO y prostaciclina) así como cambios rápidos en la expresión génica con ARNm de FOS y proteína FOS potenciados en menos de una hora. Varias otras líneas celulares tales como CHO y HELA también presentan inducción de FOS tras la exposición sostenida a tensión de cizalladura unidireccional. Estos estudios utilizan normalmente cámaras de flujo en las que se exponen células a tensiones de cizalladura durante de minutos a horas a días para alterar el fenotipo. Véase, por ejemplo, Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. Science. 17 de marzo de 1989; 243(4897):1483-5. A diferencia de los estudios de cizalladura de fluidos, la perturbación mecánica (estiramiento del sustrato o deformación inducida) puede activar canales iónicos activados por estiramiento y puede provocar la movilización de calcio. Tensiones de cizalladura turbulentas son normalmente más perjudiciales que las tensiones de cizalladura laminares porque las interacciones con películas que colapsan de burbujas de oxígeno que explotan son particularmente citolíticas. Aditivos tales como Pluronic F68 o suero bovino son citoprotectores, pero actúan parcialmente por medio de efectos tensioactivos que impiden que las células se asocien con burbujas de aire.

Los presentes inventores han hallado sorprendentemente que usando cantidades predeterminadas de tensión de cizalladura de fluido laminar pueden alterarse eficazmente agregados de células sin destruir las células y desencadenando sólo una respuesta al estrés mínima o ninguna respuesta al estrés en las células. Esta desagregación puede realizarse, por ejemplo, extrayendo las células en una aguja o un tubo de un tamaño predeterminado y expulsando las células, por ejemplo al interior de un pocillo, y repitiéndolo según sea necesario. El tiempo de exposición a la tensión de cizalladura laminar se minimiza para reducir la activación por cizalladura de células durante las alteraciones mecánicas de fluido de las muestras.

Las condiciones apropiadas para la desagregación de una muestra pueden calcularse para identificar el equipo y protocolo necesarios. El estado de agregación en cada instante de un sistema celular está definido por su distribución de tamaño de población. Un sistema puede ser monodisperso (por ejemplo, conteniendo todos los singletes o agregados números de células pequeños, por ejemplo todos de 20 meros o menos) o poldisperso con agregados que oscilan entre singletes y un intervalo de k meros, en el que k es un número grande mayor de, por ejemplo, 20. En líneas de cultivo celular, los agregados son homotípicos. Sin embargo, las FNA son heterotípicas porque contienen múltiples tipos de células. La matemática de los procedimientos de agregación y fragmentación que evolucionan con el tiempo está bien desarrollada. Dependiendo de la complejidad, las ecuaciones de equilibrio de población pueden resolverse analíticamente (agregación homotípica simple), numéricamente (agregación homotípica compleja) o mediante la simulación de Monte Carlo (agregación/fragmentación heterotípica). Para la alteración de FNA, el procedimiento fundamental está dictado por el núcleo de fragmentación F que depende de los campos de flujo prevalentes, el tamaño de agregado y las condiciones de tampón. Para una población de tamaños que experimenta fragmentación (componente individual, rompiéndose cada partícula en dos partículas más pequeñas), el equilibrio de fragmentación puede expresarse como:

$$\frac{dc_k(t)}{dt} = -c_k(t) \sum_{i=1}^{k-1} F_{i,k-i} + 2 \sum_{j=k+1}^{\infty} F_{k,j-k} c_j(t)$$

donde $c_k(t)$ es la concentración de partículas de tamaño k (o k meros) a tiempo t y a_k es la tasa de rotura neta de k meros y b_{jk} es el número promedio de i meros producidos tras la rotura de un k mero. Por tanto, $F_{ij} = a_{i+j} b_{ij} / 2$ proporciona la tasa neta a la que los $(i+j)$ meros se rompen para dar i meros y j meros. El núcleo de fragmentación F depende espacialmente en flujo tubular (alto cerca de la pared, cero en el centro) y también depende de la razón del tamaño de agregado con respecto al diámetro de tubo. En las manipulaciones tras la biopsia, las FNA estarán altamente diluidas (volumen de células/volumen de muestra $\ll 1$) de modo que la dinámica de suspensión que implica migración radial a las paredes de las partículas más pequeñas no es importante. La fragmentación de un agregado puede oscilar entre fisura binaria y trituración pura (pérdida de singletes del agregado). No se conocen núcleos de fragmentación para agregados tumorales en FNA. Tal como apreciará un experto en la técnica, las tasas de fragmentación empíricas para agrupaciones en flujo de cizalladura son relaciones de ley de potencias basadas en la tasa de cizalladura promedio G_{prom} y el radio hidrodinámico del agregado o radio de colisión R_{hid} . Por ejemplo, una forma común es: $a_i = A * (G_{prom})^\gamma (R_{hid})^\gamma$ determinándose A e γ experimentalmente y $\gamma = 2$. Para un agregado tumoral de i células en el que cada célula tiene un radio R_o , entonces $R_{hid} = R_o (i)^{1/D_f}$ donde D_f es la dimensión fractal (D_f ~ de 1,7 a 2,5).

Las FNA, y otros agregados celulares, pueden ser objetos complejos con múltiples tipos de células y diversos constituyentes de la matriz. Al considerar la alteración de FNA, la fragmentación de las muestras de tejido grandes derivadas del paciente para dar una subpoblación es principalmente una cuestión de alteración de uniones entre células tumorales y en segundo lugar alteración de la adhesión dependiente de integrina entre la célula tumoral y la matriz subyacente.

Desagregación inducida por cizalladura de muestras de biopsia, por ejemplo, FNA, en tubos: Un método de desagregación de células es a través del uso de tensión de cizalladura. Tal como se mencionó anteriormente, se prefiere tensión de cizalladura laminar. Puede generarse tensión de cizalladura laminar en tubos.

5 Para el flujo de cizalladura laminar en un tubo (número de Reynolds < 2100), las tensiones de cizalladura son máximas cerca de la pared del tubo y son cero en el centro del tubo donde el fluido simplemente está trasladándose aguas abajo. La tensión de cizalladura de pared t_p y el tiempo de tránsito $t_{tránsito}$ pueden definirse como: t_p (dinas/cm²) = $4 \mu Q / (\pi R^3)$ y $t_{tránsito} = (L A)/Q$ para la velocidad de flujo volumétrico Q a través de un tubo de área de la sección transversal $A = \pi R^2$ donde: $Q = v_{prom} A$ para $Q [=]cm^3/s$, $v_{prom} [=]cm/s$ y $A [=]cm^2$. El tiempo de tránsito promedio a lo largo de la longitud de los tubos L se define a partir de $v_{prom} = L/t_{tránsito}$ de manera que $t_{tránsito} = L/v_{prom} = L A/Q$. La viscosidad del agua es de 0,01 poises a temperatura ambiente. Aditivos tales como glicerol, Pluronic F68, dextrano, polietilenglicol (PEG) pueden potenciar todos ellos la viscosidad de la fase de fluido. A geometría y velocidad de flujo constantes, el aumento de la viscosidad aumentará las fuerzas de cizalladura. Los efectos de longitud de entrada son bastante bajos en tubos de diámetro pequeño. Para una longitud de jeringa de 1" y calibres (G) de aguja y tampón de perfusión acuoso (1 cP) usados comúnmente, se facilitan en la tabla 1 las tensiones de cizalladura de pared (dpc, dinas/cm²) y los tiempos de tránsito.

Aguja	ID	Radio	Área	Tensión de cizalladura (dpc)	Velocidad prom. (mils)	Tiempo de tránsito (en s)
Calibre	Pulgadas	cm	cm ²	Q=1,0 ml/s	Q=1,0 ml/s	Jeringa de 1 pulgada (Q=1,0 ml/s)
10	0,109	1,346E-01	5,693E-02	5,219	17,58	144,6115
11	0,094	1,194E-01	4,477E-02	7,484	22,34	113,7226
12	0,085	1,080E-01	3,661E-02	10,121	27,32	92,9884
13	0,071	9,017E-02	2,554E-02	17,367	39,15	64,8795
14	0,063	8,001E-02	2,011E-02	24,859	49,72	51,0825
15	0,054	6,858E-02	1,478E-02	39,475	67,86	37,5300
18	0,047	5,969E-02	1,119E-02	59,870	89,34	28,4306
17	0,042	5,334E-02	8,938E-03	83,898	111,88	22,7033
18	0,033	4,191E-02	5,518E-03	172,965	181,22	14,0158
19	0,027	3,429E-02	3,694E-03	315,797	270,72	9,3825
20	0,023	2,921E-02	2,680E-03	510,876	373,07	6,8084
21	0,0195	2,477E-02	1,927E-03	839,292	519,01	4,940
22	0,0155	1,969E-02	1,217E-03	1669,184	821,45	3,0921
23	0,0125	1,588E-02	7,917E-04	3182,506	1263,06	2,0110
24	0,0115	1,461E-02	6,701E-04	4087,011	1492,27	1,7021
25	0,0095	1,207E-02	4,573E-04	7249,841	2186,73	1,1616
28	0,0095	1,207E-02	4,573E-04	7249,841	2186,73	1,1616
27	0,0075	9,525E-03	2,850E-04	14733,826	35138,49	0,7240
28	0,0065	8,255E-03	2,141E-04	22633,893	4671,07	0,5438
29	0,0065	8,255E-03	2,141E-04	22633,893	4671,07	0,5438
30	0,0055	6,985E-03	1,533E-04	37360,377	6524,05	0,3893
31	0,0045	5,715E-03	1,026E-04	68212,157	9745,80	0,2606
32	0,0035	4,445E-03	6,207E-05	144975,692	16110,41	0,1577
33	0,0035	4,445E-03	6,207E-05	144975,692	16110,41	0,1577

Tabla 1: Relación del calibre de aguja, la tensión de cizalladura de pared (dpc, dinas/cm²) y el tiempo de tránsito (ms) para una aguja de 1" profundida con tampón acuoso a 1 ml/s (viscosidad = 1 cP).

20 El flujo tubular laminar es un ejemplo de flujo extensional moderado. Los flujos incidentes tales como un tubo dirigido a una superficie plana cercana son altamente extensionales. La suspensión celular experimenta las fuerzas extensionales durante periodos de tiempo fugaces en la salida del tubo antes de entrar en un entorno de bajo cizalladura. La magnitud de las fuerzas extensionales se controla fácilmente mediante el diámetro del tubo, la velocidad de flujo y las distancias desde la superficie plana. La micromanipulación y el control del movimiento de rutina pueden controlar las distancias con una precisión con una tolerancia de 10 micrómetros. Además, la entrada de fluido en una aguja o la salida de fluido desde una aguja pueden crear fuertes flujos de alargamiento. Mediante el uso de diámetros internos (calibre) y longitudes variables, es posible distinguir la desagregación debida a exposición a tensión de cizalladura de pared del provocado por la entrada o salida de la aguja.

30 Basándose en la fuerza calculada y el equipo necesario, las células de la muestra de tejido pueden hacerse pasar a través de un tubo que tiene un diámetro de 10 a 500 micrómetros usando volúmenes de entre 10 y 2000 microlitros para crear tensiones de cizalladura de pared de 100-800 dinas/cm². En algunas realizaciones, las células se hacen pasar a través de una aguja de calibre 22 o calibre 18. En algunas realizaciones, las células se exponen a tensiones de cizalladura de pared laminares de aproximadamente 100 a aproximadamente 800 dinas/cm², tensiones de

cizalladura de pared laminares de aproximadamente 300 - aproximadamente 500 dinas/cm²; o tensiones de cizalladura de pared laminares de aproximadamente 350 - aproximadamente 450 dinas/cm². Las células pueden exponerse a la tensión de cizalladura de pared laminar durante entre aproximadamente 10 ms y aproximadamente 500 ms o más tiempo, dependiendo de la cantidad de fuerza necesaria y el tipo de célula.

5 La viscosidad de los medios se ajusta, con el fin de proporcionar la fuerza de cizalladura apropiada.

La etapa de desagregación puede repetirse según sea necesario hasta que se haya producido una muestra adecuada para el análisis. Al menos aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o más de aproximadamente el 90% de las células se dispersan en aglutinaciones de 1-100 células. Las aglutinaciones también pueden ser grupos de 5-100 células, 10-100 células, 10-25 células o 5-25 células. Preferiblemente, las aglutinaciones tienen menos de 15 células, por ejemplo, 1-10 células por aglutinación.

10

La etapa de desagregación puede implicar también añadir un compuesto para ayudar en la desagregación o para impedir la activación de una respuesta al estrés en las células. Por ejemplo, puede añadirse cualquiera de los siguientes a las células durante la etapa de desagregación: un antioxidante fisiológicamente aceptable; un agente mucolítico; un agente que puede reducir enlaces disulfuro, por ejemplo, N-acetil-L-cisteína o ditiotreitól; un agente quelante fisiológicamente aceptable, por ejemplo, EDTA; y/o uno o más agentes tensioactivos protectores de membrana tales como un tensioactivo no iónico, por ejemplo polietilenglicol, un ácido graso polietoxilado o un copolímero de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno, por ejemplo Pluronic F-68 (BASF).

15

El procedimiento de dispersión también puede implicar suspender las células o las aglutinaciones de células en una solución salina isotónica libre de suero, por ejemplo, cloruro de sodio a aproximadamente el 0,9% p/v en agua estéril, que comprende opcionalmente además sales y tampones fisiológicamente aceptables; por ejemplo, una solución salina seleccionada de solución de Ringer con lactato, solución de Ringer con acetato, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con TRIS, solución de sal equilibrada de Hank, solución de sal equilibrada de Earle, citrato salino convencional, solución salina tamponada con HEPES.

20

Tal como apreciará un experto en la técnica, el procedimiento de desagregación celular puede realizarse manualmente, por ejemplo por una persona usando un pipeteador o una aguja, o usando un procedimiento automatizado tal como un dispositivo de procesamiento fluido automatizado impulsado por aire o fluido. Los diversos ejemplos abarcan procedimientos de desagregación tanto manuales como automatizados.

25

La muestra de tejido se desagrega y se dispersa al mismo tiempo que no se activan rutas de respuesta, incluyendo pero sin limitarse a rutas de respuesta al estrés y de transducción de señales celulares, en comparación con la estimulación con ligando, por ejemplo en donde la dispersión no activa la expresión de FOS en comparación con la estimulación con EGF.

30

C. Enriquecimiento/purificación de muestras

Las células agregadas pueden estar compuestas por múltiples tipos de células y a menudo sólo muy pocos o uno de esos tipos de células es la diana para el examen y análisis. En estos casos, las células pueden desagregarse en aglutinaciones más pequeñas y/o células individuales y luego se purifica la mezcla para retirar contaminantes, incluyendo células que no son de interés, para purificar la muestra y enriquecerla proporcionando un porcentaje superior de las células de interés que en la muestra celular mezclada original. Tal como se usa en el presente documento, "purificar" o "enriquecer" significa aumentar la razón del número de células diana (por ejemplo, células tumorales u otra célula que esté analizándose) con respecto al número de células no diana o partes de células que podrían interferir de otra forma en el análisis.

35

Por ejemplo, las muestras de biopsia de tumores sólidos están compuestas por una mezcla de células que incluye tanto las células de interés (por ejemplo, células tumorales) como elementos celulares normales contaminantes (células hematopoyéticas, hepatocitos, vasculatura, etc.). En un ejemplo, los elementos contaminantes se retiran usando anticuerpos específicos frente a los elementos contaminantes o usando anticuerpos específicos frente a las células diana, dependiendo del protocolo. Los anticuerpos pueden estar unidos a un sustrato, por ejemplo, una superficie de plástico, por ejemplo, la pared de una placa, o perlas de plástico o recubiertas con plástico, por ejemplo, perlas magnéticas, o bien directamente, o bien a través de un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo, para retirar los materiales contaminantes de las células de interés.

45

D. Distribución de las células

Una vez que las células se han desagregado y purificado opcionalmente (sólo si es necesario), la muestra de células se distribuye en una o más cámaras aisladas (por ejemplo, una o más de las segundas cámaras aisladas comentadas anteriormente) dentro de un cartucho tal como se describe en el presente documento, u otro recipiente adecuado.

50

Si se desea, las células de interés pueden dispersarse adicionalmente usando técnicas tal como se describió en la sección B anteriormente, y luego se distribuyen en alícuotas para su exposición a reactivos de prueba y/u otros análisis y pruebas. Las alícuotas se distribuyen entre algunos o todos los pocillos en un cartucho personalizado. Las

55

alícuotas se exponen a reactivos de prueba deseados, por ejemplo a uno o más ligandos para estimular la proliferación celular, y la transducción de señales.

5 La alícuota distribuida en la segunda cámara aislada u otro sustrato para las pruebas puede variar dependiendo del número de células necesarias y otras condiciones experimentales conocidas por un experto en la técnica. La alícuota de prueba tiene un volumen de menos de 2 ml, menos de 200 μ l, o de entre 1 μ l y 200 μ l. Tal como apreciará un experto en la técnica, el volumen puede variarse fuera de estos intervalos de ejemplo, si es necesario, siempre que esté disponible un número de células adecuado en la suspensión para las pruebas.

10 Al menos una cámara aislada que ha recibido una alícuota de prueba se designa como control. Este control puede volver a someterse a ensayo para determinar la viabilidad y el nivel de estrés, someterse a procedimientos de recuento celular o recibir sustancias de control o reactivos adicionales para proporcionar un control positivo o negativo para el análisis de datos de las otras cámaras.

15 Las células distribuidas pueden suspenderse en cualquier medio que sea adecuado para el tipo de célula. Por ejemplo, las alícuotas de prueba de las células distribuidas pueden estar en un medio mínimo de nutrientes libre de suero. El medio mínimo de nutrientes libre de suero puede tener aminoácidos esenciales, sales (por ejemplo, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio y dihidrogenofosfato de sodio), glucosa y vitaminas (por ejemplo, ácido fólico, nicotinamida, riboflavina, B-12); y cualquier otro componente necesario para el procesamiento o análisis apropiado de las células. Los medios de nutrientes libres de suero adecuados incluyen medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco/Vogt (DMEM) o RPMI.

20 Las alícuotas de prueba se distribuyen en pocillos en una placa de plástico, por ejemplo una placa de 96 pocillos, en la que las paredes de los pocillos están recubiertas con un aceite o hidrogel fisiológicamente aceptable, por ejemplo, polietilenglicol, dextrano, alginato o silicona.

E. Pruebas y reactivos de prueba

25 Las alícuotas de prueba pueden exponerse a una variedad de reactivos de prueba o bien en el cartucho o bien tras separar una o más de las cámaras aisladas del cartucho. Una ventaja de los métodos y dispositivos del presente documento es que el reactivo de prueba puede añadirse en el punto de atención y/o puede venir precargado en pocillos específicos del cartucho. Esto permite las pruebas de biomarcadores *ex vivo*, opcionalmente en el punto de atención, usando células vivas. Estos métodos y dispositivos pueden usarse con reactivos de prueba específicos para manipular muestras *ex vivo* para facilitar el desarrollo de biomarcadores predictivos novedosos, monitorizar y determinar la sensibilidad celular a agentes farmacéuticos específicos y otros usos que apreciará un experto en la técnica.

30 Por ejemplo, una muestra de un tumor sólido de un paciente puede desagregarse, distribuirse y luego someterse a prueba frente a un panel de agentes terapéuticos disponibles actualmente contra el cáncer en el punto de atención. Las muestras pueden entonces estabilizarse y/o fijarse si es necesario y analizarse. Dependiendo de los resultados para cada reactivo de prueba, el médico puede determinar rápidamente qué agente terapéutico será el más eficaz sobre el tumor del paciente individual en el punto de atención. Esta medicina personalizada proporciona numerosos beneficios, en particular, el uso de agentes terapéuticos y regímenes contra el cáncer dirigidos de manera rápida, rentable.

35 Realizaciones de la invención se refieren a analizar las células distribuidas (por ejemplo, células cancerosas) administrando al menos un agente para producir un efecto cuantitativo o cualitativo medible sobre un biomolécula diana o un biomarcador diana *ex vivo*. El efecto cuantitativo o cualitativo puede ser la activación o inhibición de una ruta celular. Las rutas celulares a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica. Por ejemplo, el efecto cuantitativo o cualitativo puede ser una medición de un efecto agonista o antagonista sobre un receptor acoplado a proteínas G o un receptor tirosina cinasa, tal como, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las rutas posteriores.

40 El efecto cuantitativo o cualitativo medido puede ser el nivel de expresión de un gen, tal como, un miembro de la familia de genes de expresión precoz o temprana retardada. Los miembros de la familia de genes de expresión precoz o temprana retardada adecuados incluyen, pero no se limitan a, FOS, JUN y DUSP 1-28.

45 Los efectos de la presencia o ausencia de un reactivo de prueba también pueden determinarse detectando un biomarcador *ex vivo*, por ejemplo, una proteína modificada postraduccionalmente, iones o enzimas.

50 Los reactivos de prueba adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: un agente farmacéutico, un compuesto químico, un agente para estimular una célula, un polipéptido, un polinucleótido, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento Fc, ARN, miARN, ARNip y una fosfoproteína. Tal como se comentó anteriormente, la administración de un reactivo puede seguirse midiendo un efecto cuantitativo o cualitativo sobre una biomolécula o un biomarcador diana *ex vivo* de la célula dispersada o distribuida.

55 Para determinados métodos analíticos, el reactivo de prueba puede ser un agente detectable. El agente detectable

puede usarse individualmente o conjugado o conectado de otra forma a otro compuesto (por ejemplo, un agente detectable conjugado con un anticuerpo). Los agentes detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, una enzima, un material fluorescente, material luminiscente, material bioluminiscente, material radiactivo, metal emisor de positrones usando una tomografía por emisión de positrones o un ion de metal paramagnético no radiactivo.

- 5 Otros reactivos de prueba adecuados incluyen ligandos estimuladores de células tumorales, tales como, un factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, insulina, VEGF), o una hormona, por ejemplo, un estrógeno o un compuesto estrogénico.

10 Para aplicaciones contra tumores sólidos u otras aplicaciones contra el cáncer de los presentes métodos y dispositivos, los reactivos de prueba pueden incluir un agente farmacéutico dirigido tal como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales antitumorales, por ejemplo trastuzumab (Herceptin[®]), cetuximab (Erbix[®]), bevacizumab (Avastin[®]) y rituximab (Rituxan[®] o Mabthera[®]), e inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, gefitinib (Iressa[®]) o erlotinib (Tarceva[®]), o agentes quimioterápicos citotóxicos, tales como, por ejemplo taxanos (Taxotere[®]), antimetabolitos (fluorouracilo), agentes alquilantes, agentes de platino o antraciclinas. Estos agentes farmacéuticos a modo de ejemplo pueden usarse individualmente, en cualquier combinación con otro agente farmacéutico dado a conocer en el presente documento, o en combinación con otro compuesto.

15 Tras administrar un reactivo de prueba, puede determinarse si el reactivo de prueba afecta a la expresión de uno o más marcadores, en donde la presencia, ausencia o el grado relativo de tal expresión es indicativo de la susceptibilidad de las células a un agente farmacéutico seleccionado. Estos marcadores pueden incluir una amplia gama de biomarcadores *ex vivo* tales como ARNm, un microARN, ADNc, una proteína, una fosfoproteína, una modificación postraduccional de una proteína, o una modificación de histona o empaquetamiento de ADN. Por ejemplo, el marcador puede ser ARNm o ADNc para un gen de respuesta temprana (por ejemplo, FOS o JUN) asociado con susceptibilidad a un agente farmacéutico. La presencia, ausencia o el grado relativo de expresión de combinaciones de marcadores en presencia de un reactivo de prueba puede ser indicativo de la susceptibilidad de las células a un reactivo de prueba seleccionado, tal como un agente farmacéutico.

25 F. Preparación y estabilización de muestras

Tal como se describe en el presente documento y se ilustra en las figuras, las células procesadas usando la presente invención pueden prepararse y estabilizarse de varios modos para permitir que se realicen una amplia gama de análisis celulares con las mismas. Por ejemplo, las células pueden prepararse para el análisis de ácidos nucleicos, análisis de proteínas y/o analizarse usando sondas celulares vivas.

30 Para el análisis de ácidos nucleicos, puede añadirse a las células un reactivo estabilizante tal como RNAlater[®], RNA Protect Cell Reagent[®] (ambos disponibles de Qiagen) o etanol. Las células estabilizadas pueden opcionalmente entonces lisarse o extraerse el ácido nucleico de interés de otra forma. El ácido nucleico extraído y purificado puede analizarse entonces, por ejemplo, usando técnicas de PCR.

35 Tal como se describió anteriormente, los métodos descritos en el presente documento producen ácidos nucleicos para su análisis adicional. Para estas muestras, tras la dispersión y el enriquecimiento opcional, los ácidos nucleicos pueden estabilizarse o extraerse (opcionalmente) para producir ácidos nucleicos en alta calidad y cantidad. Véanse, por ejemplo, el ejemplo 10 a continuación y las figuras 13 y 14. Esto puede realizarse, por ejemplo, lisando las células deseadas tras su exposición a un reactivo de prueba y luego obteniendo ADNc usando transcriptasa inversa y cebadores de ADN. Los cebadores de ADN pueden comprender un cebador no específico complementario a poli A, por ejemplo oligo(dT)₁₂₋₁₈ o un cebador específico complementario a un transcrito de ARNm de interés. Tal como apreciará un experto en la técnica, las células pueden lisarse usando una variedad de métodos, tales como, medios químicos o mecánicos.

40 Opcionalmente, las células pueden estabilizarse con reactivos para detectar y/o conservar la información de biomarcadores, por ejemplo, usando transcriptasa inversa y un cebador de ADN para obtener transcritos de ADNc, preparando ARN, ADN y proteína para el análisis molecular posterior.

45 Para el análisis de proteínas, pueden usarse o bien células completas o bien células lisadas. Pueden fijarse células completas intactas y estabilizarse con un polímero, tal como uno en la tabla 2 a continuación, de modo que la muestra se adhiere a la cámara aislada, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio. Estas muestras pueden someterse entonces a análisis, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico (IHC). Pueden usarse células lisadas o rotas de otra forma en ensayos tales como inmunotransferencias de tipo Western y pueden no requerir estabilización o fijación.

50 La preparación de portaobjetos para revisión morfológica por un patólogo y el análisis de proteínas mediante IHC pueden ser una salida de los métodos descritos en el presente documento. Por consiguiente, las células también pueden prepararse, opcionalmente usando polímeros, sobre portaobjetos de vidrio para el análisis de la morfología y/o inmunohistoquímica. Por ejemplo, la mezcla dada a conocer en la tabla 2 puede usarse según el protocolo de ejemplo en la tabla 3. Véase también Maksem, J. A., V. Dhanwada, *et al.* (2006). "Testing automated liquid-based cytology samples with a manual liquid-based cytology method using residual cell suspensions from 500 ThinPrep cases". *Diagn. Cytopathol* 34(6): 391-6.

Disolución de polímero

Agarosa	0,18 g
PEG	4,8 g
Reactivo de alcohol	76,8 ml
Poli-L-lisina (al 0,1%)	0,25 ml
Nonidet P40****	0,05 ml
Total	240 ml

Tabla 2

	Protocolo de ejemplo
1	Disolver 4,8 g de PEG en 15 ml de agua desionizada, calentar mientras se agita
2	Disolver 0,18 g de agarosa en 15 ml de agua desionizada calentando la disolución hasta ebullición
3	mientras se mantiene un mezclado vigoroso hasta que la disolución es ópticamente transparente
4	Añadir inmediatamente la disolución de agarosa caliente a la disolución de PEG
5	Diluir la disolución con 133,2 ml de agua (caliente) y enfriar hasta temperatura ambiente
6	Añadir 76,8 ml de reactivo de alcohol a la disolución con mezclado
7	Ajustar el volumen final hasta 240 ml con agua desionizada
8	Añadir 250 ul de disolución de poli-L-lisina
9	Añadir 50 ul de IGEPAL CA-630
10	filtrar con estameña, almacenar a temperatura ambiente durante al menos 72 h antes de su uso

Tabla 3

- 5 El análisis con sonda celular viva puede implicar añadir una sonda molecular (tal como MitoTracker® tal como se describe en los ejemplos) en cualquier punto en el método de procesamiento de las células cuando las células están vivas. Esta adición de la sonda celular viva debe realizarse antes de fijar o dejar de otra forma que las células mueran. Por ejemplo, una sonda de este tipo puede añadirse antes o después de la estabilización celular pero antes de la fijación celular.
- 10 Las células pueden estabilizarse y fijarse mediante cualquier medio adecuado que permitirá el análisis molecular y la detección de marcadores posteriores. Generalmente, no se prefieren fijadores de reticulación tales como formalina pero pueden estar presentes en pequeñas cantidades que no interferirán en el análisis posterior. Cuando el biomarcador es la expresión de un gen o genes particulares, en una realización las células se lisan y se exponen a transcriptasa inversa y cebadores adecuados, para generar transcritos de ADNc de transcritos de ARNm en las células. Esto facilita el análisis posterior, ya que el ADNc está menos sujeto a degradación que el ARNm.
- 15 Se procesan 1×10^4 células o más para estabilizar cualquiera de los siguientes: ARN, ADN, proteína y/o fosfoproteínas.
- 20 Las células pueden fijarse tras el procesamiento. Puede usarse cualquier medio de fijación adecuado, por ejemplo, técnicas de secado al aire, añadir un compuesto tal como alcohol, por ejemplo, un fijador que comprende un alcohol inferior, por ejemplo metanol o etanol, añadir formalina, añadir un inhibidor de ARNasa, añadir agarosa, añadir polietilenglicol, añadir poli-L-lisina o añadir uno o más quelantes o antioxidantes. El fijador comprende agarosa, polietilenglicol, octilfenoxi-polietilenglicol, poli-L-lisina, reactivo de alcohol y agua.
- 25 Se da a conocer un método para preparar células de tejidos sólidos a partir de un sujeto, por ejemplo, células de tumores sólidos a partir de un animal o sujeto humano que tiene un tumor sólido, por ejemplo, para la determinación de la sensibilidad de las células a un agente farmacéutico dirigido seleccionado. Un método de ejemplo puede incluir las etapas de: (a) obtener tejido sólido que comprende las células deseadas a partir del sujeto; (b) dispersar (por ejemplo, usando fuerzas de cizalladura) el tejido en células vivas individuales y/o agregados de no más de 100 células vivas, por ejemplo, de 10 a 100 células; (c) enriquecer la muestra, por ejemplo retirando materiales contaminantes de las células vivas; (d) distribuir las células vivas en alícuotas de prueba en cámaras aisladas; (e) exponer las células vivas a uno o más reactivos de prueba; y (f) tratar las células con un fijador y/o agente estabilizante (por ejemplo, un agente que estabiliza ARN, ADN, proteínas y/o fosfoproteínas) para fijar las células tumorales y/o el marcador para su análisis adicional; en el que la fijación de las células tumorales y/o el marcador se completa en el plazo de cuatro horas desde la retirada del tejido del sujeto de manera automatizada o manual.
- 30 Se da a conocer un método de someter a prueba células en el que se retiran células de tumores sólidos de un mamífero (por ejemplo, un paciente humano), y aunque la mayoría de las células, por ejemplo, al menos el 65% de las células, por ejemplo, al menos el 75% de las células son viables y no se han replicado fuera del cuerpo, exponer todas o una porción de las células *ex vivo* a uno o más reactivos de prueba y estabilizar las células, opcionalmente con un fijador (por ejemplo, un polímero) que puede conservar la información de biomarcadores incluyendo ADN, ARN, proteínas y/o fosfoproteínas celulares. Estos biomarcadores pueden someterse a prueba usando análisis
- 35

moleculares conocidos por un experto en la técnica o usando las pruebas de biomarcadores *ex vivo* novedosas dadas a conocer en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Procesamiento de células vivas

5 Se ha demostrado la importancia del procesamiento de células vivas usando la sonda molecular de células vivas, MitoTracker (disponible de Invitrogen, Carlsbad, CA). MitoTracker se localiza en las mitocondrias cuando se aplica a células vivas mediante difusión pasiva a través de la membrana plasmática. Se fijaron las células vivas para estabilizar la localización de MitoTracker y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. A diferencia de los métodos de procesamiento de biopsias disponibles actualmente, la utilización de los métodos descritos en el presente documento permite el estudio de células vivas con sondas moleculares. Esto se ilustra en las figuras 20 y 21, en las que se demostró claramente la localización citoplasmática específica de las mitocondrias (fluorescencia granular, lado izquierdo - 20A y 21A) cuando se aplicó la sonda a células vivas, pero no proporcionaba información cuando se aplicó a células que se fijaron usando métodos de la técnica anterior (lado derecho, 20B y 21B).

Ejemplo 2 - Estudios de desagregación de MCF-7 y HCT-116

15 Se usaron MCF-7 (células de carcinoma de mama humano - n.º de la ATCC HTB-22) y HCT-116 (células de carcinoma de colon humano - n.º de la ATCC CCL-247) para examinar el impacto de fuerzas de cizalladura sobre el tamaño de agrupación, la viabilidad y la activación celular en un dispositivo de pipeteo semiautomatizado. En resumen, se hicieron crecer células MCF-7 y HCT-116 hasta el 80% de confluencia en cultivo tisular, luego se retiraron de las placas mediante raspado suave con una varilla de vidrio con punta de caucho y se suspendieron en medio de crecimiento para imitar el número de células y el tamaño de fragmento en una muestra de FNA típica. Se hizo pasar una alícuota de la suspensión de células a través de un aparato de pipeteo automatizado (Harvard Pipetter, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts) con una aguja 22G cuatro veces (extraer/infundir a 4,14 ml/min para cada pase) dando como resultado una exposición a tensión de cizalladura de pared que osciló entre 100-800 dinas/cm² y un tiempo de exposición total para cada célula o agregado de 4 tránsitos x 14 ms/tránsito = 56 ms. Se sometieron a citocentrifugación muestras representativas de cada una sobre un portaobjetos de vidrio, se fijaron con etanol al 95% y se tiñeron con la tinción de Papanicolaou. Se obtuvieron microfotografías de zonas representativas (x200 aumentos). Obsérvese el tamaño de agrupación de células decreciente con las fuerzas de cizalladura crecientes. En la figura 22, se ilustran estos resultados.

Ejemplo 3 - Distribución del tamaño de agrupación

30 Tras usar el método del ejemplo 2, se cuantificó entonces el tamaño de agrupación promedio a través del uso de un contador de células basado en obtención de imágenes sin flujo que mide la concentración celular y las distribuciones de tamaño celular (Cellometer[®], Nexcelom, Lawrence, MA). A 100 dinas/cm², el tamaño de agrupación promedio de células MCF-7 era de 97±3 µm y el de células HCT era de 51±6 µm (figura 15). Estos datos proporcionan un intervalo de fuerzas de cizalladura reproducibles, óptimas necesarias para dispersar agregados de células vivas.

35 Ejemplo 4 - Análisis de viabilidad a partir de la dispersión

Tras usar el método del ejemplo 2, también se examinó la viabilidad mediante el ensayo de exclusión de azul tripano a fuerzas de cizalladura comparables del pipeteador semiautomatizado. Se concluyó que las fuerzas de cizalladura mayores de 800 dinas/cm² daban como resultado una disminución de más del 40% en la viabilidad considerada demasiado grave para el procesamiento y las manipulaciones de células vivas. Véase la figura 16 para una representación gráfica de los resultados obtenidos.

Ejemplo 5 - Análisis de activación a partir de la dispersión

45 Una medición funcional de la activación celular incluye la inducción de ARNm de FOS determinada mediante RT-PCR cuantitativa. FOS es un gen de respuesta temprana asociado con la ruta de EGFR. En un experimento, se hicieron crecer células MCF-7 en condiciones de crecimiento normales en placas de 6 pocillos hasta el 80% de confluencia. Se rasparon suavemente las células y se expusieron a fuerzas de cizalladura crecientes (0-800 dinas/cm² a través del pipeteador Harvard) además de tiempos de incubación crecientes (0-45 minutos) en presencia o ausencia de 100 ng/ml de ligando EGF (Sigma) antes de la extracción de ARN. La inducción de ARNm de FOS alcanza un máximo a los 30-45 minutos y regresa a los niveles basales en aproximadamente 60 minutos. También se estimula la inducción de FOS como resultado de la incubación con ligando EGF. De manera importante, los resultados preliminares indican que las fuerzas de cizalladura generadas sobre una plataforma semiautomatizada de 100-800 dinas/cm² de dispersión no dan como resultado una activación celular significativa en comparación con el estímulo de EGF. Véanse las figuras 17 y 18 para una representación gráfica de los resultados obtenidos.

EJEMPLO 6: Aparato

55 La figura 1 muestra una vista esquemática de un cartucho de ejemplo para su uso, por ejemplo, en un aparato, que

proporciona una plataforma para integrar la función de realizar la desagregación de tejido, la función de contar células, la función de pruebas de susceptibilidad a fármacos de la expresión génica y la función de fijar una muestra para su análisis adicional. Las figuras 1-22 ilustran características particulares descritas en el presente documento. Los expertos en la técnica reconocerán cómo funcionan las diversas características cuando se consideren las figuras conjuntamente con la presente descripción.

El aparato comprende como sus componentes principales: un cartucho de almacenamiento 1, que puede insertarse en un aparato o usarse para el procesamiento manual, teniendo el cartucho una pluralidad de recipientes pequeños, por ejemplo, en un formato de placa de 96 pocillos 2, retirables montados sobre el cartucho, y una pluralidad de recipientes 3 para la recepción inicial, la dispersión y retirada de materiales contaminantes de las muestras. Los recipientes 3 pueden servir para diferentes funciones, tal como se representa esquemáticamente en la figura 2 y se describió anteriormente en el presente documento. El cartucho tiene una etiqueta 4, que puede presentar un código de barras para facilitar la identificación de la muestra. Cada uno de los recipientes comprende un pocillo y un sello que garantiza el confinamiento biológico del contenido y puede perforarse mediante una aguja, aunque puede resellarse tras la retirada de la aguja. Se recoge una muestra de tejido de un paciente, normalmente una biopsia de aspiración usándose una aguja fina 5 por parte de un médico, que deposita el tejido de muestra en el recipiente de recepción 3 en el cartucho 1.

El cartucho 1 se desliza entonces dentro del aparato y la compuerta de cierre sella el aparato, de modo que el cartucho 1 se sella biológicamente del entorno exterior y se sella frente a la liberación de cualquier muestra de tejido biológicamente peligrosa. En un ejemplo alternativo, el cartucho es una plataforma que contiene reactivos particulares y puede procesarse manualmente.

El cartucho 1 puede tener uno o más receptáculos 6 para almacenar y desechar materiales de partida para su uso en la realización de la manipulación de la muestra de tejido. Estos materiales de partida incluyen reactivos y cabezas de aguja. La cabeza de aguja consiste en una aguja que tiene una abertura y una punta y un anillo dentro de la aguja en conexión de fluido con la abertura y una jeringa. El aparato es autónomo con la excepción de corriente eléctrica, que puede suministrarse por medio de un cable, si es necesario.

Los cartuchos pueden incluir un recipiente de recepción 2 que alberga un conjunto de procesamiento, normalmente para mezclar la muestra de tejido en el mismo. El recipiente de recepción 3 está preenvasado con una disolución de desagregación de solución salina tamponada; que comprende además opcionalmente quelantes, antioxidantes y modificadores de la viscosidad, con la restricción de que la disolución de desagregación debe evitar el uso de proteasas.

El recipiente de recepción 3 consiste en una cubierta de sello para el pocillo. Esta disposición de conjunto de procesamiento y pocillo autónomo minimiza la exposición del operario humano a peligros biológicos. Una extensión de enganche sobresale a través de la cubierta de sello.

El aparato está equipado con un elemento operativo, que puede recoger selectivamente una cabeza de aguja del pocillo de almacenamiento 6 en el cartucho 1, para manejar una jeringa de la cabeza de aguja, y para manejar determinados dispositivos en el aparato, tales como el conjunto de procesamiento en el recipiente de recepción.

En la primera operación dentro del aparato, el elemento operativo recupera una cabeza de aguja del pocillo de almacenamiento 6, lo desplaza a una posición en relación con el recipiente de recepción 3 en la que el médico ha depositado el tejido de muestra y que está preenvasado con una disolución de desagregación, tal como tampones, quelantes y antioxidante, perfora el sello en el recipiente de recepción 3 con la cabeza de aguja y sumerge la punta de la cabeza de aguja en la mezcla de disolución homogénea, extrae una porción de la muestra del recipiente de recepción 3 dentro de la jeringa de la cabeza de aguja, desplaza la punta de la cabeza de aguja a una posición predeterminada dentro del recipiente de recepción y dispensa la muestra extraída en el mismo o el segundo recipiente de recepción 3 para desagregar la muestra de tejido para dar una disolución homogénea de células tumorales intactas y materiales contaminantes. Se repite esta etapa tantas veces como sea necesario para lograr el nivel de desagregación predeterminado de la muestra de tejido. Véase la figura 3, por ejemplo, 309.

El elemento operativo (u operario si se manipula manualmente) recupera una nueva cabeza de aguja del pocillo de almacenamiento de cartucho 6, lo desplaza a una posición en relación con los recipientes de recepción 3, perfora el sello en el recipiente de recepción 3 seleccionado con la cabeza de aguja y sumerge la punta de la cabeza de aguja en la mezcla de disolución homogénea, extrae una porción de la muestra del recipiente de recepción dentro de la jeringa de la cabeza de aguja, retira la aguja del recipiente de recepción, la desplaza a una posición en relación con un recipiente de matriz, perfora el sello en el recipiente de matriz con la cabeza de aguja y deposita la porción de muestra de esta jeringa dentro del recipiente de matriz 3. Véase también la figura 2. El recipiente de matriz 3 consiste en una cámara de carga ubicada por encima de un lecho de perlas de resina que está soportado por encima de una cámara de recogida en la parte inferior del recipiente de matriz. El lecho de resina está dotado de un tapón que se extiende desde la superficie superior del lecho hasta la superficie inferior del lecho. El tapón está construido de un material que permite su perforación mediante una cabeza de aguja en la superficie superior del lecho y permite que la aguja se extienda a través de la superficie inferior y dentro de la cámara de recogida. Véase también la figura 2. Alternativamente, el lecho de resina está dotado de un conducto que se extiende desde cerca de

la parte superior de la cámara de carga a través del lecho de resina hasta cerca de la parte inferior de la cámara de recogida. En funcionamiento, la disolución de muestra se depositaría por encima del lecho de resina, se alimentaría por gravedad y también se extraería a través del lecho de resina que retira los contaminantes de la disolución y los recoge en la cámara de recogida. La parte superior del conducto está situada para impedir que cualquier disolución sortee el lecho de resina antes de recogerse en la cámara de recogida.

Se comprueba la muestra para garantizar números adecuados de células dispersadas en la muestra. El elemento operativo recupera una cabeza de aguja del pocillo de almacenamiento de cartucho 6, lo desplaza a una posición en relación con el recipiente de recepción, perfora el sello en el recipiente de recepción con la cabeza de aguja y sumerge la punta de la cabeza de aguja en la mezcla de disolución homogénea, extrae una porción predeterminada de la muestra del recipiente de recepción 3 dentro de la jeringa de la cabeza de aguja, retira la cabeza de aguja del recipiente de recepción 3, lo desplaza a una posición en relación con un módulo de recuento de células y deposita la porción predeterminada de la muestra en el módulo de recuento. Entonces se extrae la cabeza de aguja del recipiente de recuento y se desecha en un recipiente de desecho en el cartucho.

El módulo de recuento, que puede ser uno de los módulos de recepción 3 en el cartucho, está preenvasado con un colorante seco en el interior de la cámara de contención del recipiente de recuento. Dentro del recipiente de recuento, la porción de muestra para recuento que se ha depositado en la cámara de contención disuelve el colorante, que a su vez tiñe las células tumorales. La porción de muestra predeterminada se canaliza al interior del tubo de recuento, que se explora ópticamente para el recuento de células mediante un dispositivo de exploración. La porción de muestra para recuento se recoge por debajo del tubo de recuento en un pocillo de contención. El dispositivo de exploración óptico transmite el recuento a un indicador que determina si el recuento cumple o supera el tamaño de recuento predeterminado indicando una muestra de biopsia satisfactoria. Los resultados del análisis pueden presentarse entonces en una pantalla de presentación visual y/o imprimirse por una impresora. Los resultados orientan entonces inmediatamente al médico en cuanto a si es necesaria una biopsia adicional. Siempre que la muestra es adecuada, se exime al paciente.

Una vez que se dispersan las células y se retiran los contaminantes, se dividen las células en alícuotas que van a colocarse en una matriz de prueba 2, normalmente un formato de placa de 96 pocillos. Normalmente, los pocillos se han llenado previamente con los medios deseados (solución salina tamponada y reactivos de prueba). El elemento operativo recoge otra aguja del cartucho, retira la cantidad deseada de células dispersadas y descontaminadas del recipiente de recepción 3, las desplaza a una posición en relación con una serie de pocillos de muestra sellados 2, perfora secuencialmente el sello en cada uno de los pocillos, deposita una cantidad predeterminada de la porción de muestra en cada uno de los pocillos y retira la cabeza de aguja. Se desecha la cabeza de aguja en el recipiente de desecho 6.

Preferiblemente, los pocillos 2 están preenvasados con diversas dosis de diversos agentes farmacéuticos para someter a prueba la susceptibilidad de las células tumorales a cada una de las dosificaciones y los agentes. Las condiciones para mantener los pocillos deben estar próximas a las condiciones fisiológicas. El pH del medio en los pocillos debe estar próximo al pH fisiológico, preferiblemente entre pH 6-8, más preferiblemente entre aproximadamente pH 7 y 7,8, siendo lo más preferido pH 7,4. Las temperaturas fisiológicas oscilan entre aproximadamente 30°C y 40°C. Las células se mantienen preferiblemente a temperaturas de entre aproximadamente 35°C y aproximadamente 37°C. De manera similar, pueden cultivarse células en niveles de O₂ que están comparativamente reducidos en relación con las concentraciones de O₂ en el aire, de manera que la concentración de O₂ es comparable a los niveles fisiológicos (1-6%), en vez del 20% de O₂ en el aire. Dados los cortos tiempos de incubación, no es necesario generalmente oxigenar las células.

Tras la incubación con los agentes durante un periodo de tiempo predeterminado, se trata cada pocillo con un agente fijador que fija las células y el agente indicador para su análisis posterior. Este tratamiento se logra con el elemento operativo, una nueva cabeza de aguja y un vial de agente fijador.

También pueden crioconservarse células de tumores sólidos hasta que sean necesarias, mediante cualquier método conocido en la técnica. Las células pueden suspenderse en una disolución isotónica, preferiblemente un medio de cultivo celular, que contiene un crioconservante particular. Tales crioconservantes incluyen dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol y similares. Estos crioconservantes se usan a una concentración del 5-15%, preferiblemente del 8-10%. Se congelan las células gradualmente a una temperatura de -10°C a -150°C, preferiblemente de -20°C a -100°C, y más preferiblemente de -150°C.

Sin embargo, queda claro que pueden hacerse modificaciones y/o adiciones en el aparato 10 y el método tal como se ha descrito hasta ahora. Por ejemplo, el recipiente de recuento 46 y el dispositivo de exploración óptico 56 pueden utilizarse en muestras tomadas directamente del recipiente de recepción 14 antes del funcionamiento del conjunto de procesamiento 34.

EJEMPLO 7: Estudios de desagregación

Se hacen crecer células de carcinoma de mama humano MCF-7 (n.º de la ATCC HTB-22) hasta el 80% de confluencia en cultivo tisular, luego se retiran de las placas mediante raspado suave con una varilla de vidrio con

punta de caucho y se suspenden en medio de crecimiento. Se hace pasar una alícuota de la suspensión de células a través de una aguja 18G dos veces (extraer/infundir a 1 ml/s para cada pase) dando como resultado una exposición a tensión de cizalladura de pared de 172 dinas/cm^2 y un tiempo de exposición total para cada célula o agregado de 4 tránsitos $\times 14 \text{ ms/tránsito} = 56 \text{ ms}$. Se hace pasar una segunda alícuota a través de una aguja 18G cinco veces (tiempo de exposición de 10 tránsitos $\times 14 \text{ ms/tránsito} = 140 \text{ ms}$). Se someten a citocentrifugación muestras representativas de cada una sobre portaobjetos de vidrio, se fijan con etanol al 95% y se tiñen con la tinción de Papanicolaou. Se obtienen microfotografías de zonas representativas ($\times 200$ aumentos). Para comparación, se obtiene otra imagen de una biopsia de aspiración con aguja fina (FNA) guiada por ultrasonidos de un ganglio linfático agrandado que se encuentra que contiene cáncer de mama metastásico. Otra imagen de esta misma muestra humana mostró varios grupos de células de carcinoma de mama en un fondo de numerosos linfocitos MCF-7 raspados y MCF-7 procesados con 2 ciclos de extracción/infusión o 5 ciclos a través de una aguja 18G (1") a 1 ml/sec. Obsérvese que 5 ciclos de extracción/infusión en la muestra C son suficientes para dar como resultado lisis y núcleos liberados, una condición que no se desea.

En el experimento anterior, una exposición de 2 ciclos de extracción e infusión de células MCF-7 representa una estimación preliminar de una condición operativa, en ausencia de EDTA, para dispersar la monocapa de MCF-7 raspada. Esta condición experimental proporciona una exposición a cizalladura integrada de t_p (4 tránsitos) = $172 \text{ dinas/cm}^2 \times 0,056 \text{ s} = 9,6 \text{ dinas-s/cm}^2$.

EJEMPLO 8: Expresión de FOS relativa como marcador temprano para la susceptibilidad a bloqueantes de EGFR

Al menos 35 fármacos contra el cáncer dirigidos que tienen como objetivo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) están aprobados o en ensayos clínicos. Desafortunadamente, no se conocen biomarcadores que predigan la sensibilidad del tumor a antagonistas de EGFR para la mayoría de los cánceres. Puede evaluarse la variación en la expresión del gen de respuesta temprana FOS como efecto distal de la inhibición de EGFR y determinarse su relación con los efectos antitumorales de los efectos inhibidores del crecimiento y moduladores de FOS de gefitinib y erlotinib en líneas celulares de cáncer humano (A431, CAL27, HN11, HuCCT1 y Hep2). A continuación, pueden realizarse xenoinjertos de estas líneas celulares en ratones y tratarse durante 14 días con gefitinib (A431 y HuCCT1) o erlotinib (CAL27, HN11 y Hep2). Se realiza una biopsia de aspiración con aguja fina de los tumores al inicio y tras 14 días de terapia para la evaluación de FOS. Además, puede someterse a prueba la posibilidad de analizar este marcador en cinco muestras tumorales por parejas a partir de un ensayo clínico de gefitinib en pacientes con tumores sólidos. En cultivo, gefitinib y erlotinib disminuyen los niveles de ARNm de FOS en las líneas celulares susceptibles A431, CAL27 y HN11. Gefitinib o erlotinib suprimen el aumento en la expresión de FOS *in vivo* en tumores de A431, CAL27 y HN11 sensibles a EGFR pero no en cepas resistentes. En resumen, variaciones en la expresión de FOS reflejan las acciones farmacológicas de inhibidores de EGFR con modelos *in vitro* e *in vivo*. Véase, por ejemplo, Jimeno A, Kulesza P, Kincaid E, Bouaroud N, Chan A, Forastiere A, Brahmer J, Clark DP, Hidalgo M: C-fos Assessment as a Marker of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Effect, Cancer Res 2006, 66:2385-2390.

EJEMPLO 9: Optimización de las condiciones para una dispersión rápida pero suave de FNA

Selección de MCF-7 como análogo de células de tumor de mama en FNA

Se han estudiado extensamente células de cáncer de mama humano MCF-7 como modelo para cáncer de mama hormonodependiente. Las células son una línea celular positiva para el receptor de estrógenos (ER) bien caracterizada y, por tanto, son un modelo *in vitro* útil de investigación del cáncer de mama. La línea celular epitelial estable se deriva de un cultivo primario de células de carcinoma de mama humano obtenidas a partir de un derrame pleural de una paciente femenina con enfermedad metastásica (Soule, 1973). Desde entonces, la línea celular MCF7 se ha convertido posiblemente en el modelo de cáncer de mama más ampliamente investigado con miles de citas como resultado de los atributos clínicos comparables. De manera similar al cáncer de mama positivo para ER hormonodependiente, las células MCF7 son inicialmente sensibles a antiestrógenos tales como tamoxifeno y fulvestrant. La línea celular MCF7 ha servido también como línea celular parental para derivaciones de otros numerosos modelos de cáncer de mama, que tienen desenlaces de ensayos clínicos de predicción repetida. Adicionalmente, derivados de la línea celular MCF7 han proporcionado conocimiento sobre los mecanismos de resistencia asociados con la terapia hormonal de primera línea.

Se hacen crecer células de carcinoma de mama humano MCF-7 (n.º de la ATCC HTB-22) en medio mínimo esencial mejorado modificado (Invitrogen, Carlsbad, CA), suero bovino fetal al 10% (Hyclone, Logan, UT) y disolución de penicilina/estreptomina al 1% (10.000 UI de cada una, Invitrogen). Tras un 80% de confluencia, se lavan las células una vez con 10 ml de DPBS y se retiran del matraz mediante raspado suave con un raspador celular de caucho. Se suspenden las células en 10 ml de medio de crecimiento y se dividen en alícuotas duplicadas. Este protocolo se ha validado para producir agregados muy grandes que son un sustituto de agrupaciones de células tumorales presentes en FNA de cáncer de mama humano. Se obtienen imágenes de la primera alícuota (3 ml de células suspendidas) y se determina el tamaño mediante análisis de imágenes y un contador Coulter. Tras contarse el estado de tamaño inicial de la primera alícuota, se tripsiniza la muestra y se cuentan todas las células.

Selección de la línea celular de carcinoma de colon HCT-116 como análogo de FNA de carcinoma de colon

metastásico

5 La línea celular de carcinoma de colon humano HCT-116 (n.º de la ATCC CCL-247) se deriva inicialmente de un adenocarcinoma de colon de varón humano y se ha utilizado ampliamente en estudios posteriores. Su morfología se asemeja a la del carcinoma de colon metastásico y tiene características genéticas comunes con carcinomas de colon humanos, incluyendo una mutación en el codón 13 del protooncogén ras. Está incluida en el panel NCI-60 de líneas celulares de cáncer humano examinadas para determinar sensibilidad farmacéutica. Están disponibles extensos datos de expresión génica de microalineamientos de ADNc y datos de actividad farmacológica correlativos sobre esta línea celular (<http://discover.nci.nih.gov/>).

10 Cultivo de HCT-116: Se propagan células HCT-116 en medio modificado 5a de McCoy con suero bovino fetal al 10% y se incuban a 37°C más el 5% de CO₂. Se renueva el medio cada 2-3 días y se dividen las células cuando son confluentes a una razón de subcultivo de aproximadamente 1:8 usando una disolución de tripsina-EDTA.

15 Método de tinción de FOS: Se fijan agrupaciones de células incubando los portaobjetos en una disolución que contiene paraformaldehído al 2%, Triton X-100 al 0,5% a 4°C durante 15 minutos. Entonces se lavan los portaobjetos con BSA al 3%, Triton X-100 al 0,5% en PBS y se incuban con 50 µl de anticuerpo policlonal de oveja contra FOS (Cambridge Research Inc., Wilmington, DE) a una dilución de 1:20 (BSA al 3%, Triton al 0,5% en PBS) durante 2 h. Entonces se lavan los portaobjetos tres veces con 5 ml de BSA al 3%, Triton al 0,5% en disolución de PBS. Se incuban cada portaobjetos con 50 µl de conjugado de IgG de asno anti-oveja (H+L)-fluoresceína (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) (dilución 1:20) durante 1 h, se lava 4 veces con PBS y se obtienen imágenes.

Exclusión de azul trípano

20 Esta prueba sencilla mide la capacidad de las células para excluir el colorante si sus membranas están intactas. Dependiendo de la intensidad, las exposiciones a cizalladura pueden permeabilizar temporalmente las membranas o dañar permanentemente el plasmalema de las células. Tras experimentos de dispersión, se suspenderán las células en solución de sal equilibrada de Hank. Se añaden un total de 0,2 ml de suspensión a 0,8 ml de disolución de tinción (0,5 ml de disolución de azul trípano estéril al 0,4% (Sigma T-8154) en 0,3 ml de HBSS), se incuban durante 10 min y se cuentan 10 µl de la disolución con un hemocitómetro para obtener el número de células y el % de células muertas.

Tinción de células vivas/muertas

30 Aunque la exclusión de azul trípano es sencilla y precisa, el uso de colorantes fluorescentes se somete a prueba puesto que una determinación mediante fluorescencia de la viabilidad celular y el número de células se automatiza y minituariza más fácilmente. La tinción fluorescente de células vivas/muertas usa dos colorantes: calceína AM y homodímero de etidio (EtD-1). Calceína AM es un colorante no fluorescente, permeable en células. Se escinde para dar una forma fluorescente en células vivas por esterases intracelulares. El homodímero de etidio (EtD-1) se une al ADN y es una contratinción de cromosomas, pero no penetra en células vivas y puede usarse para detectar células muertas. Están disponibles kits convencionales de ActiveMotif.

35 Detección de apoptosis

40 Dependiendo de la intensidad de la exposición, las fuerzas de cizalladura de fluido pueden provocar necrosis o apoptosis. Para medir la apoptosis en células no fijadas a tiempos de 0,5 a 1 h tras la implementación de protocolos de desagregación, se usa el sustrato de caspasa 3, NucView-488, permeable en células disponible de Biotium, que se aprovecha de la alta actividad DEVDasa de caspasa 3. La caspasa 3 es un marcador de apoptosis común. El sustrato de caspasa 3, NucView™ 488, es un conjugado permeable en la membrana de un colorante de ADN fluorogénico y un sustrato DEVD. La escisión del colorante por la caspasa 3 intracelular libera el colorante de ADN para la tinción simultánea del núcleo.

45 Determinación de las tasas de fragmentación a partir de datos experimentales Se usa un algoritmo genético (GA, *genetic algorithm*) con el fin de realizar la regresión de núcleos de fragmentación dependientes del tamaño a partir de una serie temporal de distribuciones de tamaño medidas experimentalmente a t_1, t_2, t_3, t_4 y t_5 obtenidas tras cada ciclo de extracción/infusión del experimento. El GA evoluciona una población aleatoria inicial de modelos de núcleo según los principios de microevolución (selección cruzada, aleatoria, mediada por ajuste). Tras cada tránsito a través de una jeringa, se mide una distribución de tamaño en un tiempo discreto en la fragmentación. Para datos obtenidos a una tasa de cizalladura tubular promedio (G_{prom}), se realizará la regresión de la ecuación 1 (un conjunto de k ODE) mediante la evaluación del ajuste de "cromosomas" de prueba que contienen cada uno un conjunto de parámetros que pueden evolucionar $[A(i, G_{prom}), y, g]$ para $a_i = A * (G_{prom})^y (R_{hid})^g$ para cada agrupación de i células. Obsérvese que $A(i, G_{prom})$ depende del tampón y la línea celular.

55 Se someten monocapas raspadas de MCF-7 y HCT-116 a campos de cizalladura parabólicos en agujas de jeringa estériles (tensión de cizalladura de pared de desde 5 hasta 500 dinas/cm²) durante diversos tiempos de desde 10 ms hasta 100 s para evaluar características de dispersión. Se someten a prueba flujos extensionales por medio de flujos incidentes separaciones de hueco que oscilan entre 100 micrómetros y 1000 micrómetros. Se someten a prueba las células para determinar su viabilidad. Se obtienen distribuciones de tamaño con un contador Coulter. Se medirá la

activación celular con inmunotinción de FOS, un gen de respuesta temprana que puede regularse por incremento rápidamente mediante altos niveles de fuerzas de cizalladura. La inducción de FOS da como resultado una tinción nuclear intensa y puede puntuarse como el % de activación basándose en el recuento de núcleos. Se someten a prueba diversos tampones incluyendo los que contienen quelantes y modificadores de la viscosidad y protectores de células, con la restricción de evitar el uso de proteasas que destruyen posiblemente importantes proteínas de la superficie celular.

Se evalúan la tinción de FOS y la viabilidad en monocapas de MCF-7 y se comparan con las obtenidas para las monocapas raspadas (análogo de FNA) para establecer la activación inicial antes de la alteración por cizalladura. En cierto grado, esto imita la activación durante la adquisición de FNA antes de la dispersión. Para cada línea celular, los parámetros más importantes a determinar son la resistencia a la exposición a cizalladura mínima (tensión de cizalladura de pared) y el tiempo de exposición a cizalladura mínimo (tiempo de tránsito acumulado a través de la aguja) para desagregar la muestra. Se hará pasar una alícuota (de 0,2 a 3 ml de suspensión de células raspadas) a través de agujas de 15 a 21 G (longitud de 0,5 a 2 pulgadas) a velocidades de flujo de desde 0,1 hasta 5 ml/s usando de 1 a 10 ciclos con bomba de jeringa Harvard controlada por ordenador. Cada ciclo (extracción/infusión) de una jeringa de 10 ml se define como un ciclo. Se obtienen las agujas de Popper & Sons (www.popperandsons.com), un fabricante por encargo de componentes para sistemas de manipulación de líquidos automatizados. Se obtienen imágenes de las muestras tras cada ciclo. Mediante el uso de agujas de calibre diferente y longitudes de aguja diferentes y velocidades de flujo diferentes, pueden variarse independientemente la tensión de cizalladura de pared y el tiempo de exposición acumulado. La tensión de cizalladura de pared varía a escala linealmente con la velocidad de flujo Q pero varía a escala con la tercera potencia del radio.

Exposiciones a tensiones de cizalladura de pared laminares de 10 a 150 dinas/cm² durante tiempos de entre 10 ms y 500 ms son generalmente suficientes para controlar el estado de desagregación de la muestra para obtener agrupaciones de 5 a 10 células/agrupación. De 2 a 4 ciclos son generalmente óptimos para una dispersión fiable de las muestras raspadas. Para estudios de viabilidad celular y activación de FOS, se monitorizan las condiciones y la expresión de FOS inducida por cizalladura para alterar las monocapas raspadas de modo que < 15% de los núcleos son positivos para la expresión de FOS.

Efectos de entrada/salida

Se realizan experimentos para evaluar el papel de la dispersión durante la entrada y salida de la muestra de la jeringa (en donde pueden existir flujos de alargamiento sustanciales). Se comparan los resultados con una aguja del mismo calibre y la misma velocidad de flujo, pero longitudes de aguja diferentes (0,5 pulgadas frente a 1,0 pulgadas frente a 2,0 pulgadas) y números de ciclos diferentes de manera que pueden generarse muestras que estén expuestas a la misma tensión de cizalladura de pared y al mismo tiempo de exposición a cizalladura acumulado, pero a diferentes números de acontecimientos de entrada/salida. Generalmente, la entrada y salida de la muestra no provoca una desagregación significativa.

Para el análisis visual de la desagregación tras cada ciclo de extracción/infusión, se colocan muestras sobre hielo para su citocentrifugación inmediata. Se prepararán células para análisis microscópico centrifugando en primer lugar cada muestra a 2000 rpm en una centrífuga de sobremesa (Hettich Rotina 46S), resuspendiendo luego el sedimento celular concentrado, en 500 µl de una disolución de sal equilibrada (Normosol). Entonces se aplicarán las células a un portaobjetos de vidrio para microscopio usando una citocentrífuga a 750 rpm durante 3 minutos (ThermoShandon Cytospin 4). Se fijarán los portaobjetos inmediatamente en etanol al 95% y se teñirán con la tinción de Papanicolaou. Se obtienen imágenes digitales de zonas seleccionadas usando Adobe Photoshop (v. 5.5) y un microscopio óptico (Olympus BX40) equipado con una cámara digital (Kontron Elektronik Prog/Res/3012). Se someten las células a análisis de imágenes de recuento de partículas (NIH Image) y se comparan los resultados con el recuento de células obtenido para la alícuota original.

Sistemas de flujo incidente

Pueden obtenerse de manera fiable flujos incidentes dirigiendo el extremo de la aguja hacia una placa plana. Puesto que el chorro de fluido que sale de un tubo sumergido disminuye rápidamente en el espacio de unos pocos diámetros de tubo, es importante que la separación de hueco S varíe a escala con el calibre de la aguja (Ga) de manera que $S = k(\text{diámetro interno})$ son $k =$ de 0,5 a 5. La separación de hueco se controla con un micrómetro manual. Si se usan agujas de diámetro grande, la tensión de cizalladura de pared disminuye rápidamente (véase la tabla 1). Dirigiendo agujas de calibre pequeño (Ga = de 10 a 14) hacia pocillos de fondo plano y usando flujos menores (~0,1 ml/s), la tensión de cizalladura de pared del tubo puede mantenerse a <1 dinas/cm². En esta configuración, se produce desagregación mediante el control del flujo incidente. Los flujos incidentes permiten que las células experimenten estallidos de fuerzas de cizalladura de alargamiento durante periodos de tiempo muy cortos (microsegundos). Los flujos incidentes con agregados pueden ser más "no lineales" porque el umbral para la dispersión puede estar próximo al umbral. Estructuras tenaces (tejido estromal) en FNA pueden requerir un flujo incidente seguido por flujo tubular convencional. Esto puede lograrse fácilmente de manera automatizada mediante el uso de un motor paso a paso para controlar la posición de la aguja en relación con la parte inferior del recipiente.

Estudios de activación celular

Tras la primera tanda de estudios para determinar las condiciones fluidicas que alteran muestras celulares, se analizan las agrupaciones de células para determinar la integridad de membrana (tinción con azul tripano y tinción de células vivas/muertas), apoptosis celular (ensayo fluorogénico de caspasa 3 permeable en células) y activación celular (tinción de FOS). Como control positivo, ya se conocen condiciones para MCF-7 que provocan pérdida de viabilidad celular. Menos del 5% de los núcleos son positivos para FOS en monocapas raspadas. Condiciones de cizalladura para alterar monocapas raspadas para dar agrupaciones pequeñas en las que los núcleos positivos para FOS son < 15%. Para estudios de apoptosis, se permite que las células se incuben durante de 0,5 a 1 h tras la dispersión para evaluar la aparición de apoptosis tras la dispersión.

Modificaciones del tampón

El tampón de dispersión puede modificarse para potenciar la dispersión de la muestra y minimizar la activación celular. La quelación de calcio extracelular con EDTA facilita la separación de uniones que mantienen las células juntas. Se somete a prueba la exposición a EDTA (5 mM, pH 7,4) seguida por recalcificación como estimulante celular por sí mismo. La generación de oxígeno reactivo durante la dispersión de monocapas raspadas también puede dar como resultado activación celular. N-Acetil-L-cisteína (NAC, 5 mM) puede reducir la inducción de FOS durante la dispersión celular. Finalmente, Pluronic F68 al 0,2 % (p/v) es un aditivo de polímero que ha presentado actividad crioprotectora por medio de interacciones con la membrana celular en otros sistemas de membrana.

EJEMPLO 10: Cantidades de células

Para células HCT-116 y MCF-7 dispersadas como en los ejemplos anteriores usando 400 dinas/cm², se estabilizaron los ácidos nucleicos usando Cell Protect. Se extrajeron el ADN y ARN usando técnicas de extracción de Qiagen. Se determinó el número de células necesarias para obtener niveles de ARN y ADN adecuados para el análisis. Se evaluó el ARN de las células usando la evaluación de la integridad del ARN (RIN), densidad óptica a 260/280 y µg totales de ARN. Este experimento confirma, por ejemplo, que un tamaño de muestra de más de 100.000 células es adecuado para el análisis de ADN y ARN:

Entrada	Salida				
	Número de células	ARN		ADN	
RIN		260/280	ug	260/280	ug
10.000	4,95±1,77	1,19±0,21	0,53±0,06	11,71±18,23	0,15±0,42
100.000	5,80±0,85	1,46±0,10	1,08±0,15	0,82±2,62	0,39±0,10
1.000.000	9,43±0,64	1,98±0,02	8,83±3,78	2,15±0,18	4,59±1,07
10.000.000	9,97±0,06	2,06±0,01	41,73±7,21	2,06±0,05	17,41±2,14

En las figuras 13 y 14, también se muestran gráficamente estos resultados.

EJEMPLO 11: Recuento de células

Para muestras dispersadas en el ejemplo anterior (MCF-7 y HCT-116), se somete a prueba el recuento de células y se valida con alícuotas de suspensión de células de 10 a 100 µl suministradas a cámaras de obtención de imágenes. Se comparan los recuentos en imágenes con las puntuaciones tanto del hemocitómetro como del contador Coulter. Para el análisis de aglutinaciones, se validan diversos algoritmos de procesamiento de imágenes usando muestras que están divididas en subconjuntos para su dispersión completa usando tripsina y recuento de células individuales. Puede usarse un contador Coulter para obtener la distribución de tamaño a través del uso de un canalizador.

Protocolo de recuento de núcleos y procesamiento de imágenes

La ventaja de la tinción de fluorescencia del núcleo es que los núcleos son objetos celulares particularmente grandes y diferenciados que se identifican fácilmente en cultivo en monocapa y células en suspensión. En la validación de los métodos de obtención de imágenes para el recuento de células en 1 etapa sin separación o aclarado, se someten a prueba colorantes que cumplen los siguientes criterios: (1) pueden aplicarse a células sin la necesidad de protocolos de fijación/lavado/tinción/lavado complejos; (2) se excitan fácilmente a longitudes de onda disponibles con láseres o diodos de bajo coste; (3) producen una alta relación señal-fondo; y (3) producen una tinción rápida de las células, incluyendo SYTO-11 y SYTO-16 (Invitrogen) permeables en la membrana. Los colorantes de UV (DAPI, Hoescht 33342) cumplen muchos de estos criterios pero requieren una fuente de UV, una desventaja en la fase II cuando los sistemas de obtención de imágenes deben minituarizarse y economizarse. Se incuban las células en SYTO11 10 mM (S7573, ex. a 508 nm/em. a 527 nm) o SYTO-16 10 uM (S7578, ex. a 488 nm/ em. a 527 nm) durante hasta 5 min antes de la obtención de imágenes en portaobjetos de cámara (Lab-Tek™ Chamber Slides™, Nunc; área de cultivo: 0,4 cm²/pocillo: volumen de trabajo en ul). Se obtienen imágenes digitales usando Adobe Photoshop (v. 5.5) y un microscopio (Olympus) equipado con una cámara digital (Kontron Elektronik Prog/Res/3012). Se puntúan las imágenes para los recuentos nucleares mediante tanto inspección visual como software de análisis de imágenes (NIH Image). Se comparan estas puntuaciones con las puntuaciones tanto del hemocitómetro como del contador Coulter. El objetivo es desarrollar un protocolo de recuento nuclear rápido y preciso en el que se añaden 100 ul de la suspensión celular a 10 ul de disolución de tinción y entonces se obtienen imágenes con excitación en el azul/emisión en el verde tras 5 min de incubación. Están disponibles varias variantes en la serie SYTO si las dos

elegidas no son adecuadas. De manera similar, puede someterse a prueba la tinción nuclear permeable CyTRAK Orange (Biostat Ltd.; ex. a 488 nm/ em. a 615 nm) para estas aplicaciones.

5 El recuento preciso de núcleos en agrupaciones pequeñas es considerablemente más difícil que el recuento de núcleos en monocapas de células o suspensiones de células individuales. La detección de bordes y los fondos más complicados pueden provocar errores en el software de análisis de imágenes. Para garantizar la precisión y sistematicidad, se realiza una comparación con los recuentos de células obtenidos mediante dispersión completa con tripsina/EDTA, para determinar qué imprecisión existe en función del tamaño de agrupación medio, la distribución de tamaño de agrupación y la densidad de agrupaciones/área de imagen. Si es necesario, se añaden patrones de tamaño e intensidad a la suspensión para el establecimiento del intervalo de señal, la sustracción del fondo, la obtención de umbrales, la detección de objetos y el recuento de partículas.

10 Cualquier encabezamiento usado en el presente documento se proporciona únicamente por motivos de organización y no se pretende que confiera ninguna división o significado a este documento, a menos que se indique específicamente.

REIVINDICACIONES

1. Método para procesar una muestra de tejido vivo de células agregadas a partir de un sujeto o células cancerosas a partir de un tumor sólido, que comprende:
 - 5 a) desagregar y dispersar una disolución acuosa que contiene células agregadas vivas obtenidas a partir de un sujeto o células cancerosas a partir de un tumor sólido en al menos una alícuota de prueba en una primera cámara aislada, en la que las células se dispersan usando una cantidad predeterminada de tensión de cizalladura mecánica, de desde 100 hasta 800 dinas/cm²;
 - b) opcionalmente purificar la alícuota para aumentar el porcentaje de células diana en relación con otros tipos de células contaminantes retirando las células contaminantes;
 - 10 c) distribuir las células vivas en una o más segundas cámaras aisladas para su análisis en ausencia de cultivo celular; y
 caracterizado por que el método comprende además la etapa de
 d) analizar las células distribuidas exponiendo las células a al menos un reactivo de prueba para producir un efecto cuantitativo o cualitativo medible sobre uno o más de una biomolécula diana o un biomarcador diana *ex vivo*, en donde el efecto se identifica mediante una medición de un efecto agonista o antagonista sobre una ruta celular;
 - 15 en el que las células se procesan en un estado vivo con estrés o activación celular mínimo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el número total de células procesadas es de desde 1000 hasta 10 x 10⁶.
- 20 3. Método según una de las reivindicaciones 1-2, en el que la muestra se obtiene usando una técnica de aspiración con aguja fina.
4. Método según una de las reivindicaciones 1-3, en el que la estabilización de las células vivas distribuidas se completa en el plazo de cuatro horas desde la obtención de la muestra a partir del sujeto.
- 25 5. Método según una de las reivindicaciones 1-4, en el que el efecto cuantitativo o cualitativo es: la activación o inhibición de una ruta celular seleccionada del grupo que consiste en una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica; una medición de un efecto agonista o antagonista sobre un receptor acoplado a proteínas G o un receptor tirosina cinasa, tal como un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); o el nivel de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en una familia de genes de expresión precoz o temprana retardada.
- 30 6. Método según una de las reivindicaciones 1-5, en el que el biomarcador *ex vivo* se selecciona del grupo que consiste en iones, enzimas, lípidos y proteínas modificadas postraduccionalmente.
- 35 7. Método según una de las reivindicaciones 1-6, en el que el reactivo de prueba se selecciona del grupo que consiste en un agente farmacéutico, un agente para estimular una célula, un polipéptido, un polinucleótido, un anticuerpo, un fragmento Fab, un fragmento Fc, ARN, ARNip y una fosfoproteína; seguido por medir un efecto cuantitativo o cualitativo sobre una biomolécula diana o un biomarcador diana *ex vivo* de la célula dispersada o distribuida.
- 40 8. Método según una de las reivindicaciones 1-6, en el que el reactivo de prueba comprende un agente detectable seleccionado del grupo que consiste en: una enzima, un material fluorescente, material luminiscente, material bioluminiscente, material radiactivo, metal emisor de positrones usando una tomografía por emisión de positrones y un ion de metal paramagnético no radiactivo.
9. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que el reactivo de prueba está precargado en al menos una de las cámaras aisladas antes de que las células cancerosas vivas purificadas se distribuyan en la una o más cámaras aisladas.
- 45 10. Método según la reivindicación 1, en el que la purificación comprende inmunodepleción.
11. Método según una de las reivindicaciones 1-10, en el que la etapa de distribución se realiza manualmente o usando un sistema automatizado.
- 50 12. Método según una de las reivindicaciones 1-11, en el que la etapa de desagregación comprende hacer pasar un fluido que comprende células cancerosas de un tumor sólido a través de una punta de pipeta o aguja de un tamaño predeterminado con una fuerza predeterminada de desde 100 hasta 800 dinas/cm².

13. Método según la reivindicación 1, en el que las células distribuidas tienen más del 75% de viabilidad en comparación con el número de células viables en el fluido antes de la distribución.

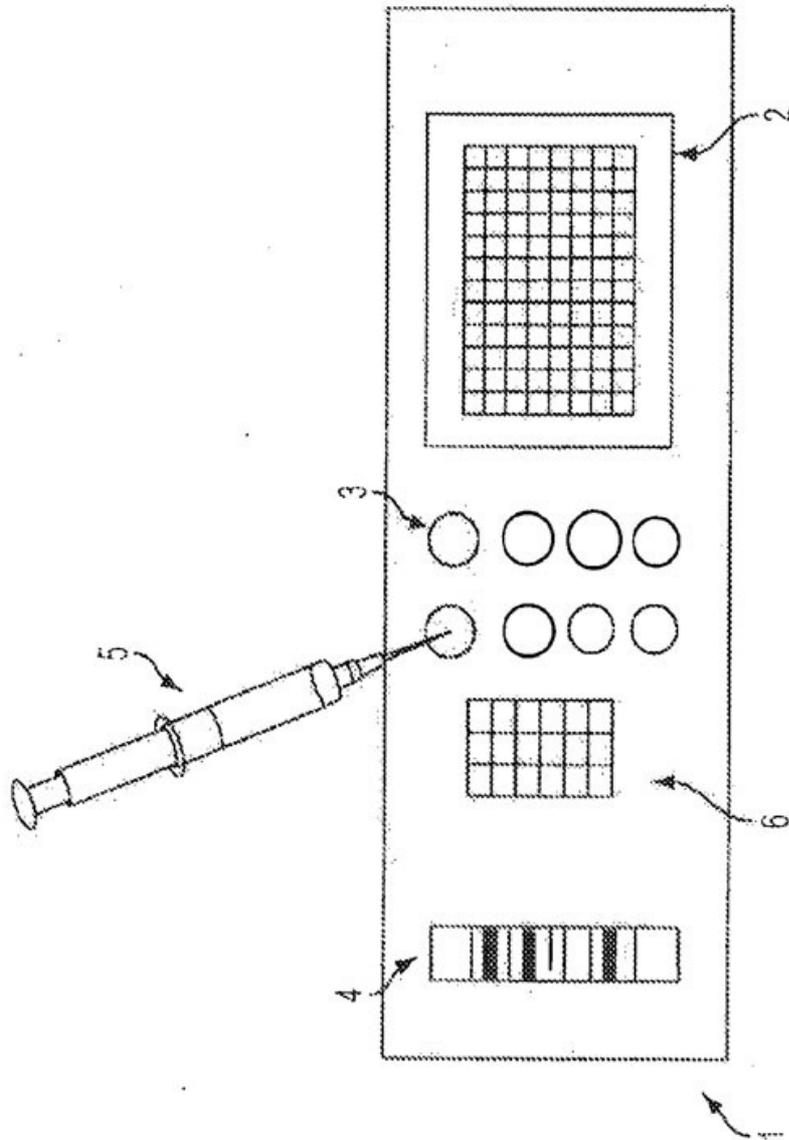


FIG. 1

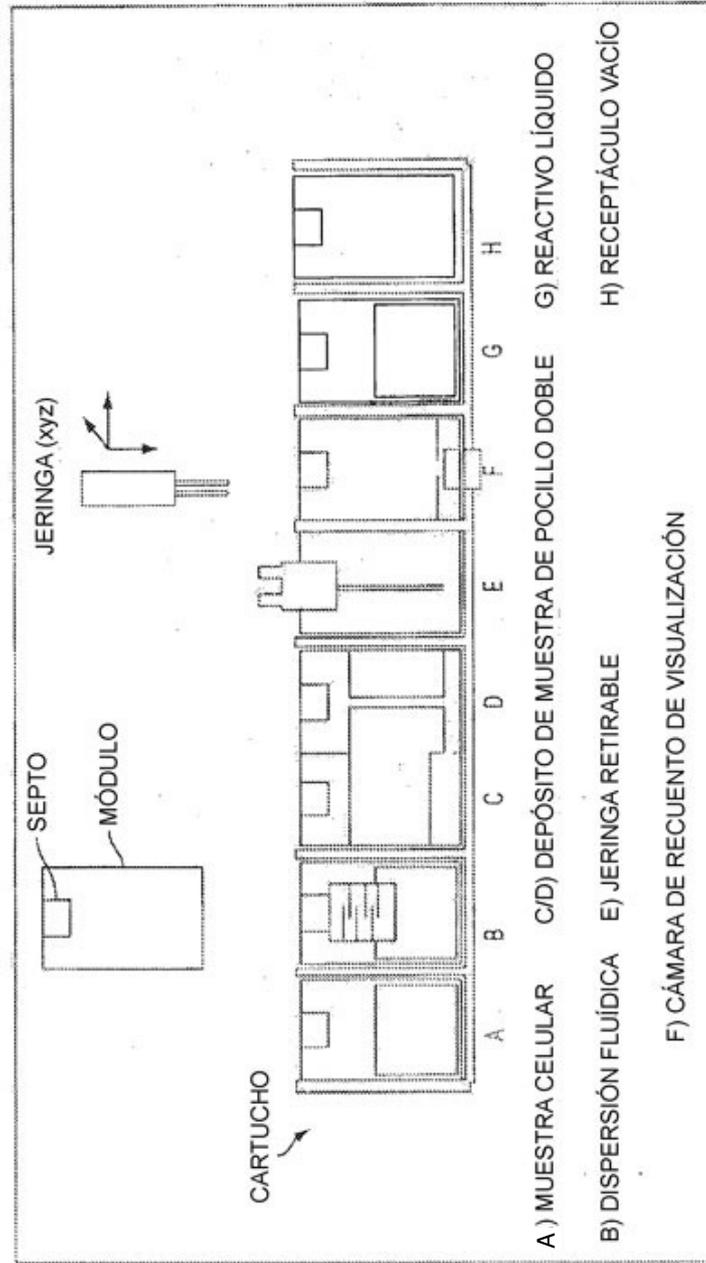


FIG. 2

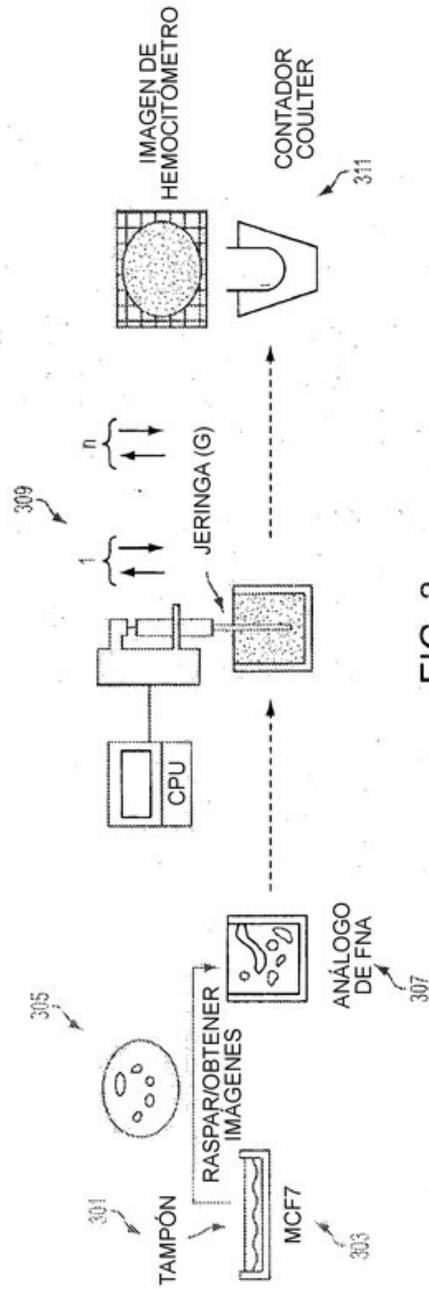


FIG. 3

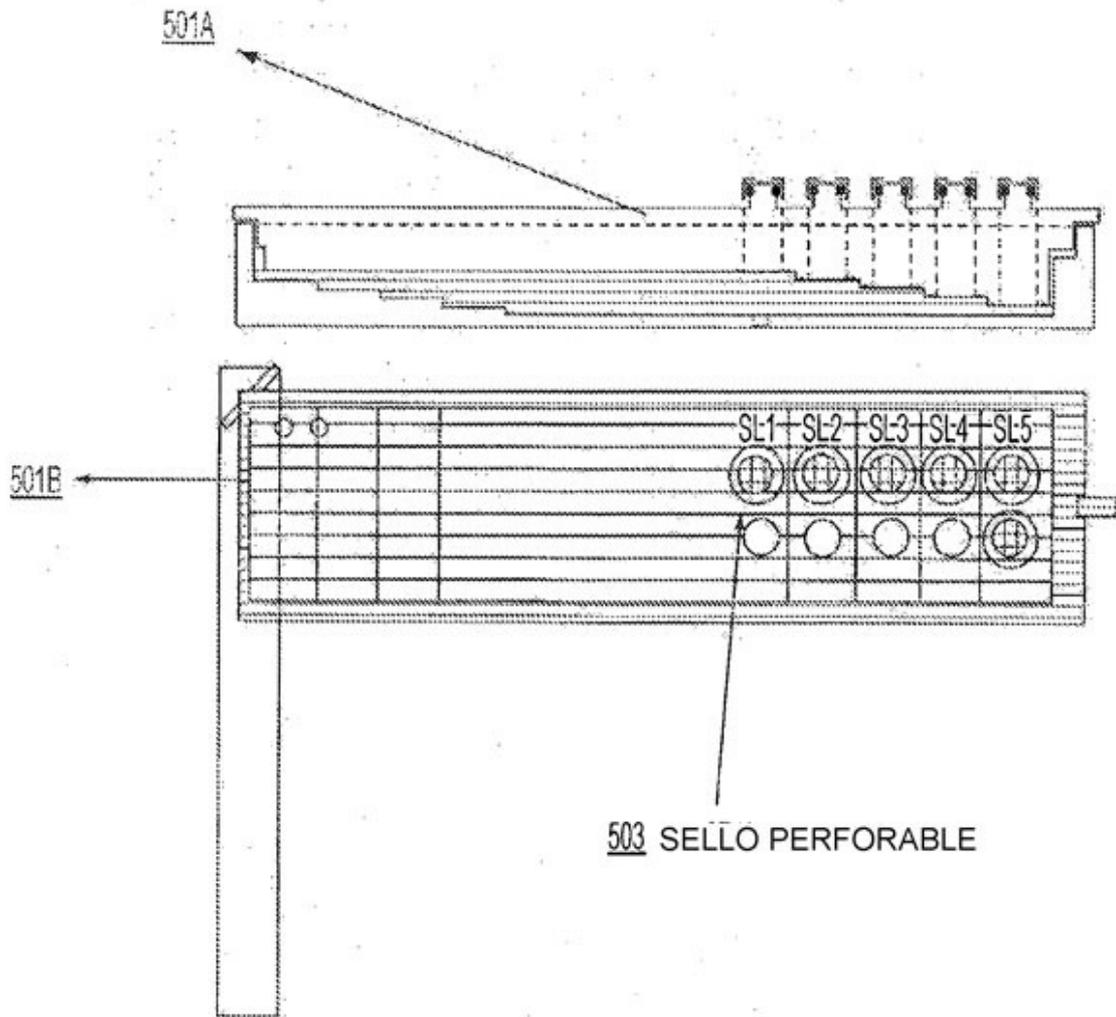


FIG. 5

ELEMENTOS DE DISEÑO DEL CARTUJO

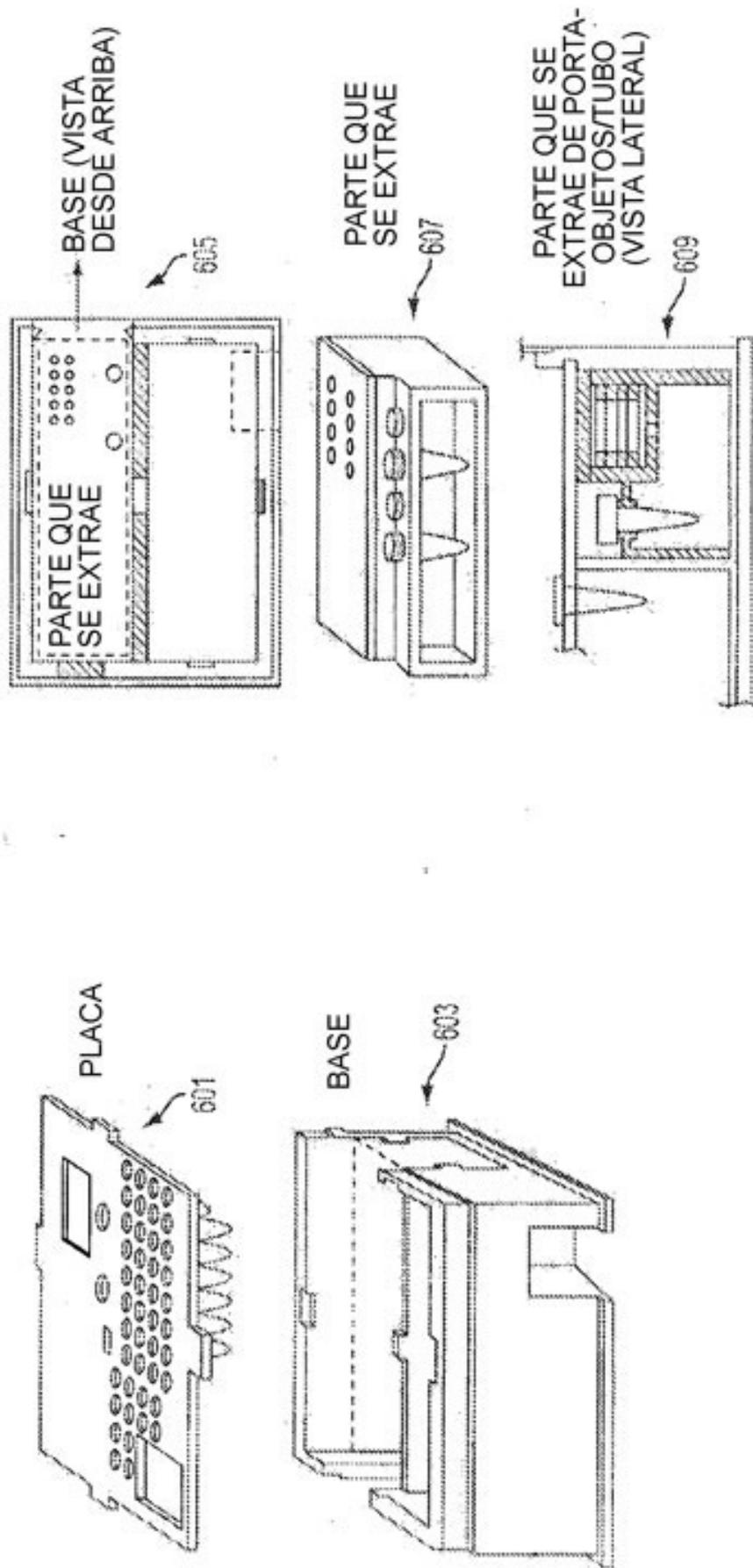


FIG. 6

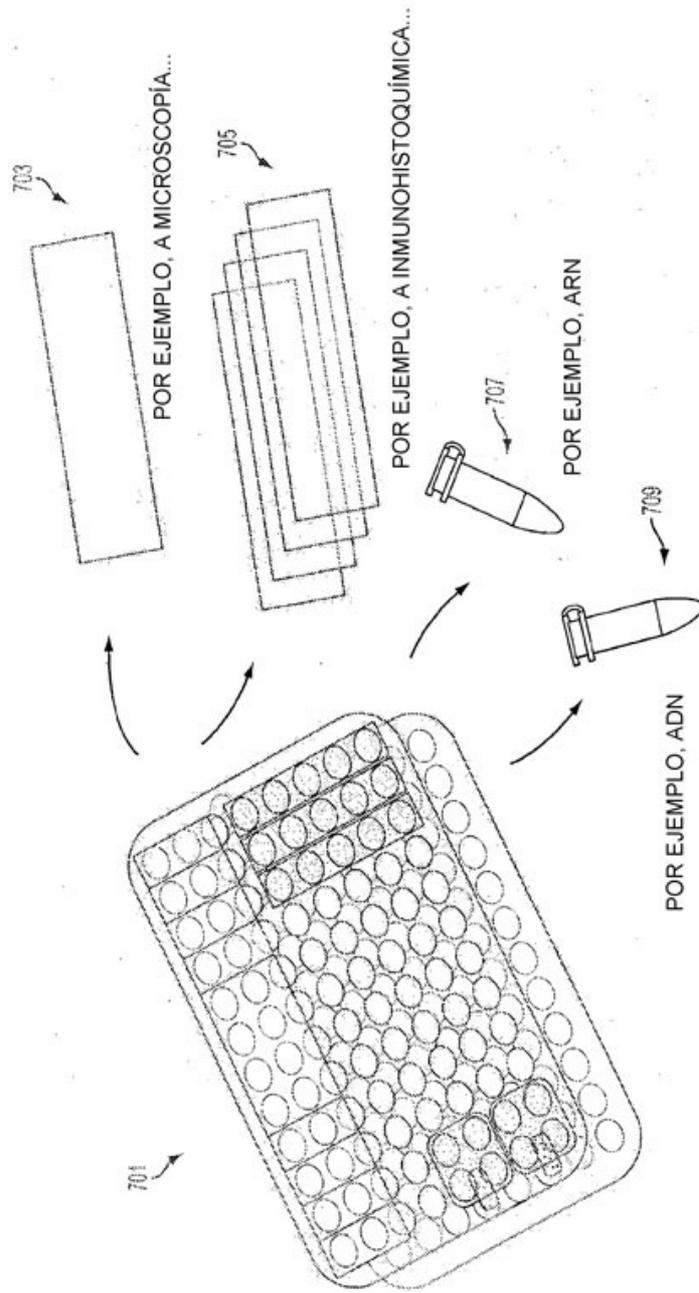


FIG. 7

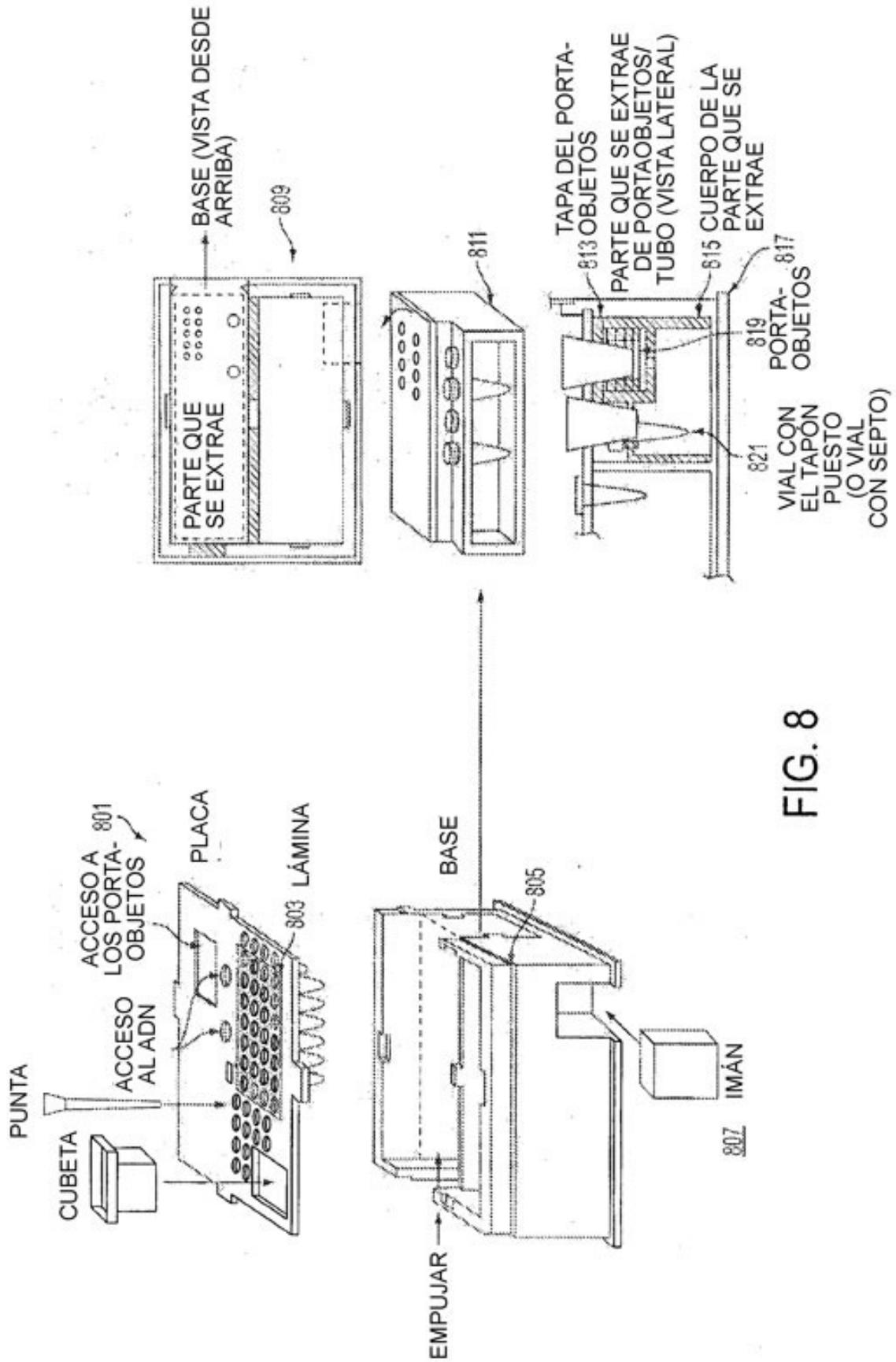


FIG. 8

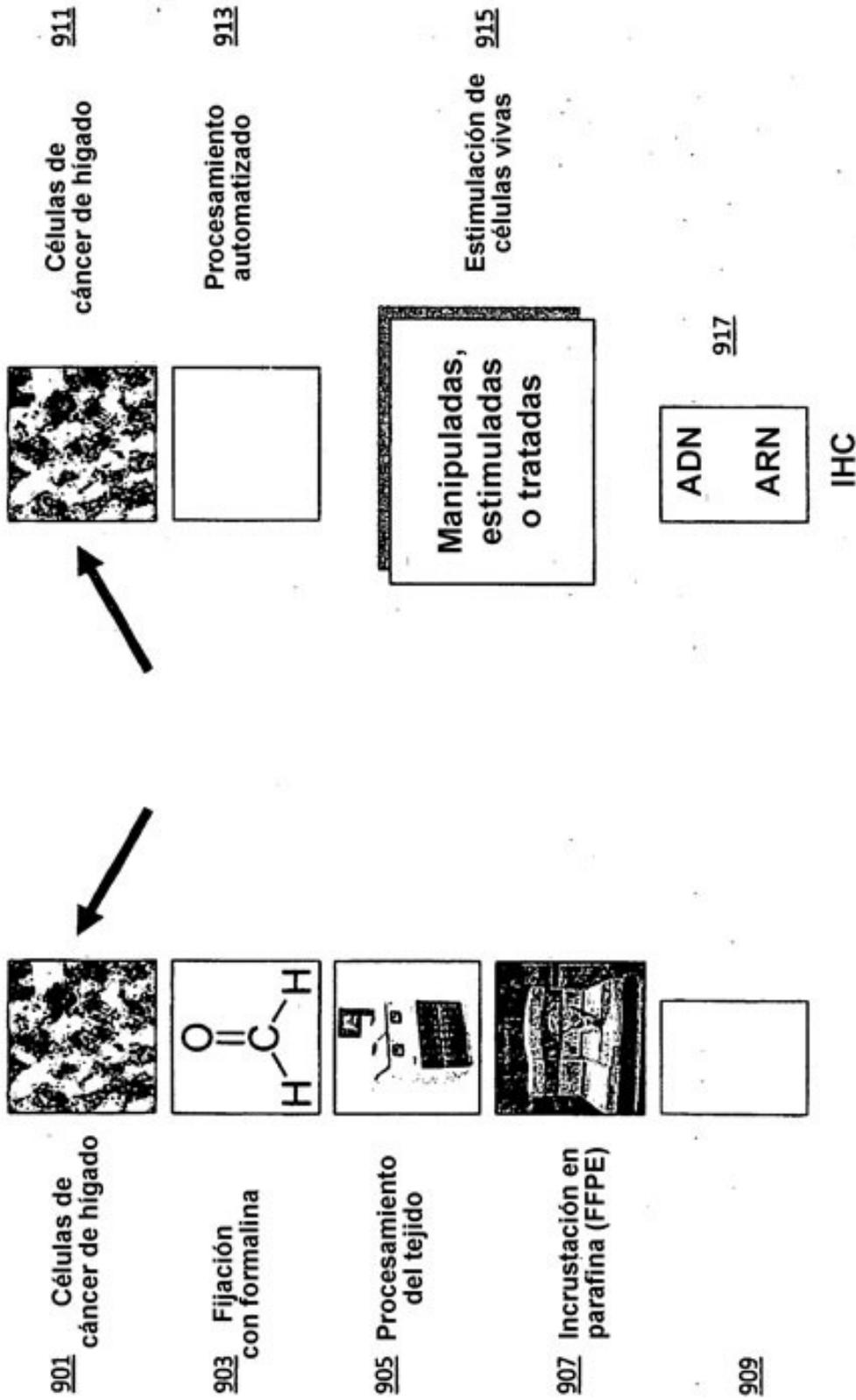


FIG. 9

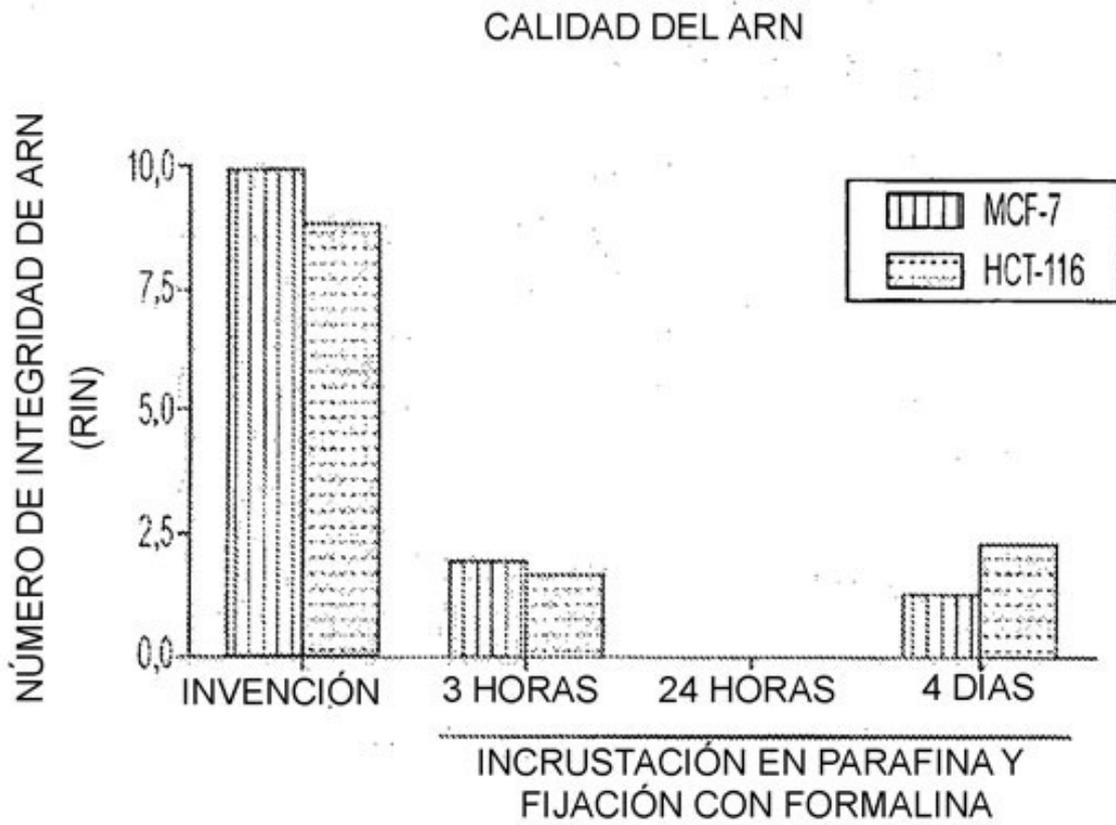


FIG. 10

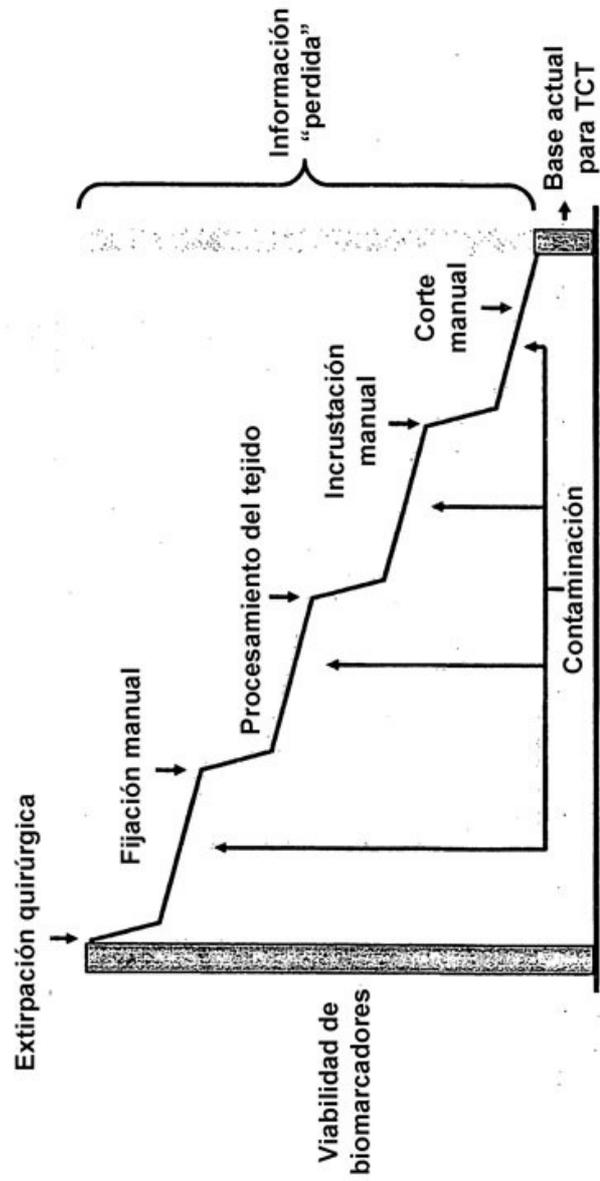


FIG. 11

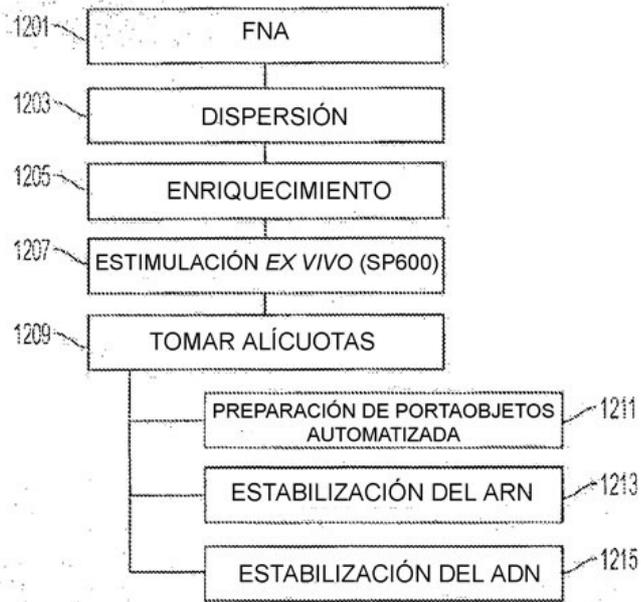


FIG. 12

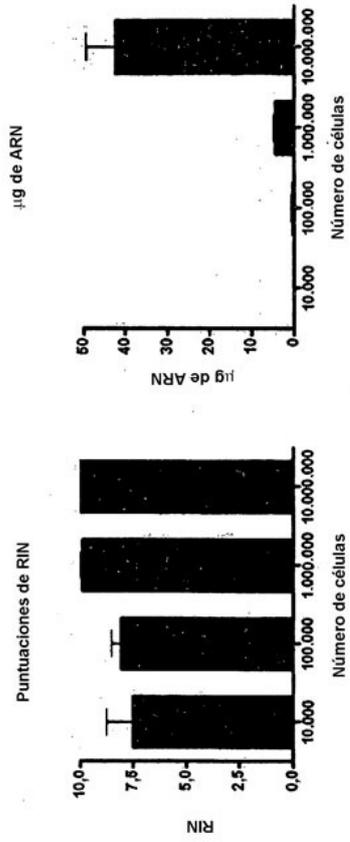


FIG 13A

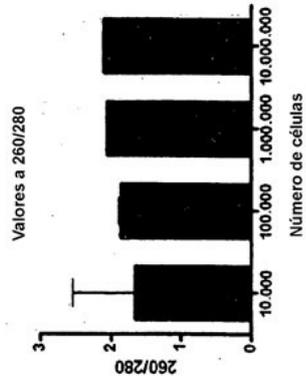


FIG 13B

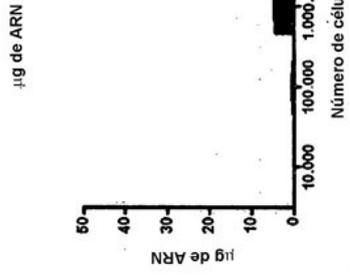


FIG 13C

FIG. 13

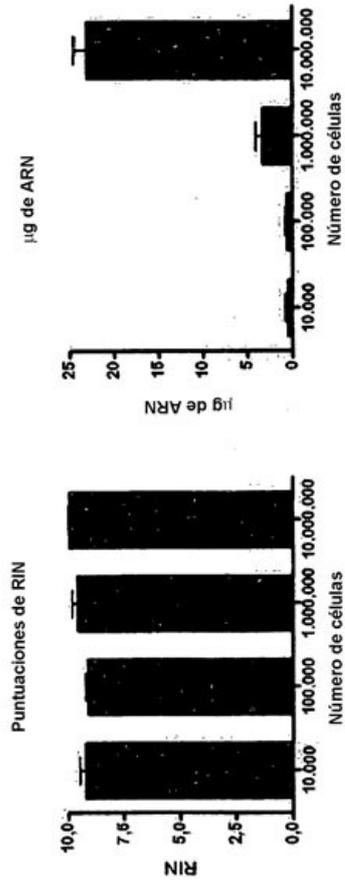


FIG 14B

FIG 14A

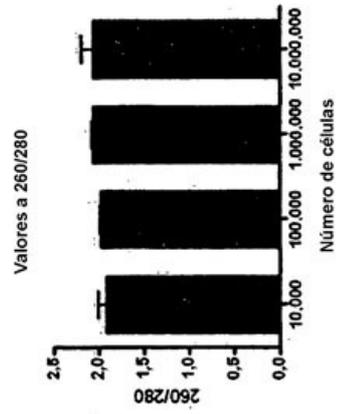


FIG 14C

FIG. 14

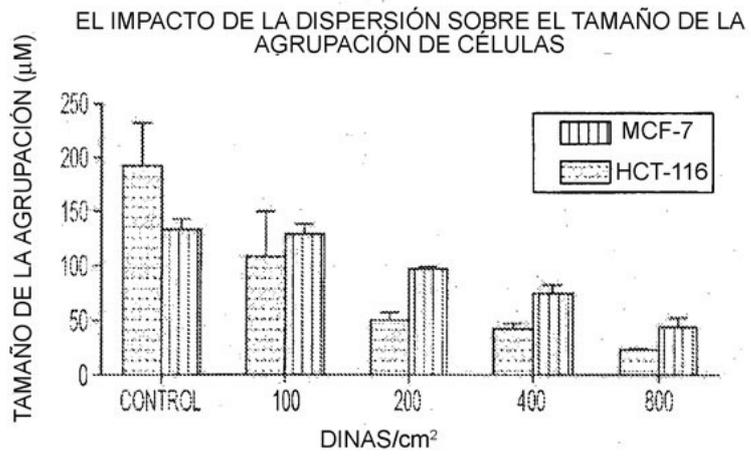


FIG. 15

EL IMPACTO DE LA DISPERSIÓN SOBRE LA VIABILIDAD

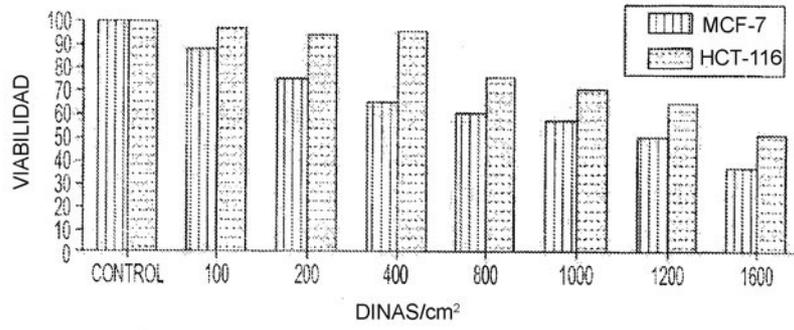


FIG. 16

INDUCCIÓN DE CÍFOS A PARTIR DE LA DISPERSIÓN Y ESTIMULACIÓN CON EGF EN CÉLULAS MCF-7

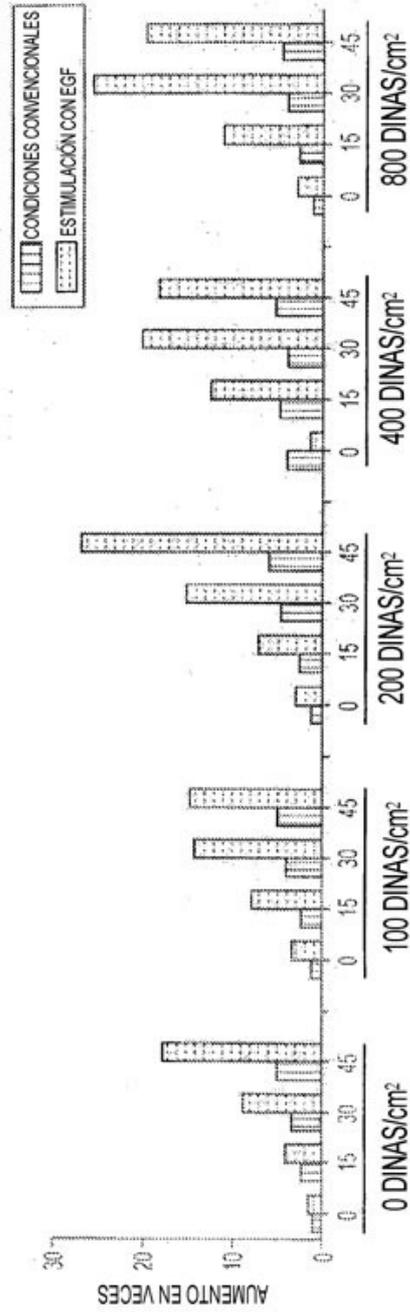


FIG. 17

INDUCCIÓN DE CÍFOS A PARTIR DE LA DISPERSIÓN Y ESTIMULACIÓN CON EGF DE CÉLULAS HCT-116

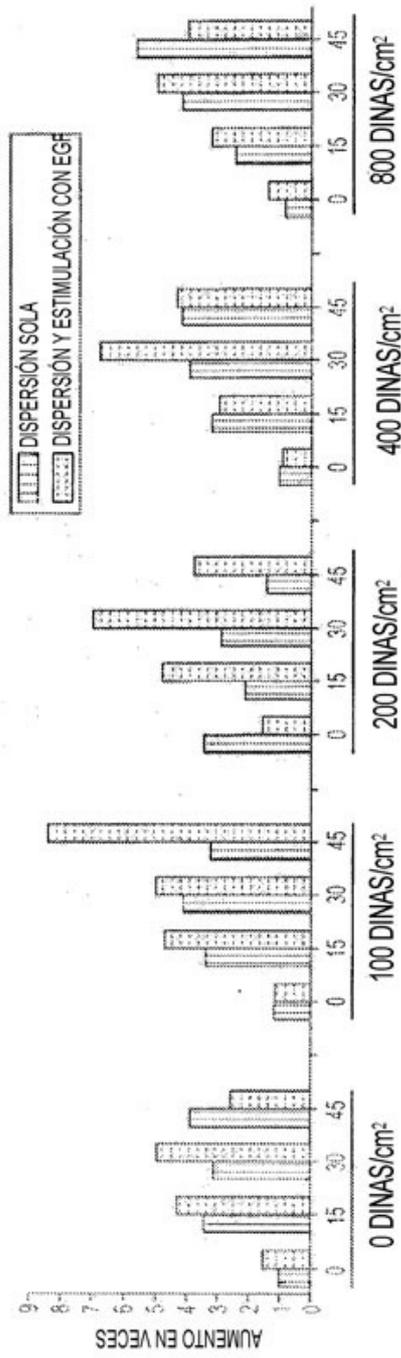


FIG. 18

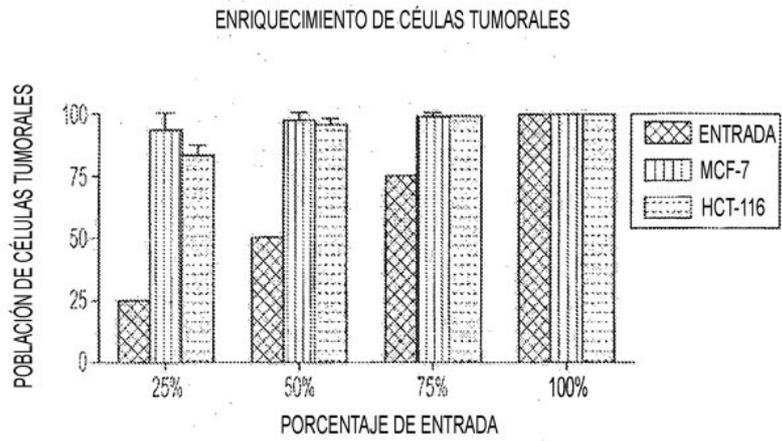


FIG. 19



FIG. 20B



FIG. 20A



FIG. 21B



FIG. 21A

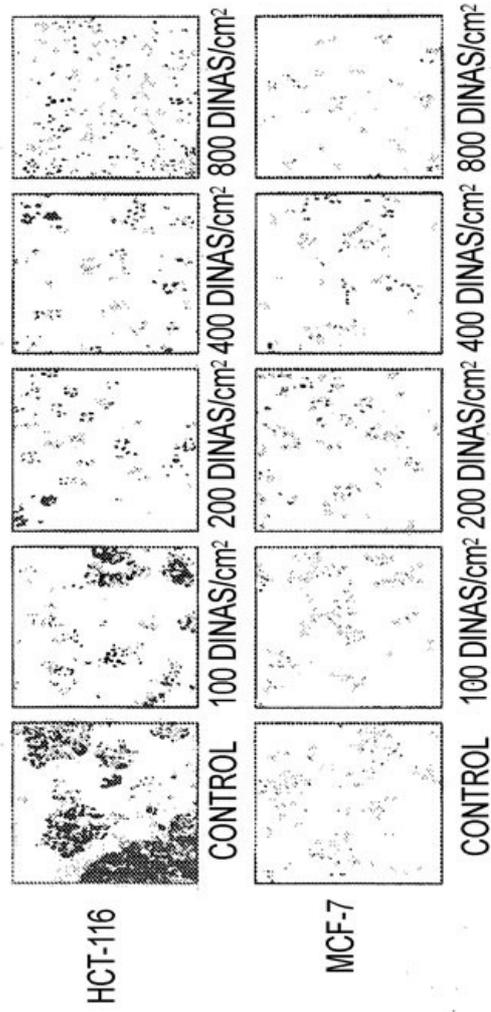


FIG. 22