

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 837**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2011 E 11705620 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2542689**

54 Título: **Procedimiento de aislamiento de células diana**

30 Prioridad:

**02.03.2010 EP 10155178**

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

**29.09.2015**

73 Titular/es:

**XANTEC BIOANALYTICS GMBH (100.0%)  
Merowingerplatz 1a  
40225 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:

**DANKBAR, NICO;  
BRANDT, BURKHARD y  
GEDIG, ERK TJALLING**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 546 837 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

Procedimiento de aislamiento de células diana

La presente invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento y / o aislamiento de células diana en una muestra, en la que la muestra comprende glóbulos rojos y / o plaquetas, comprendiendo dicho procedimiento (a) filtrar la muestra a través de un elemento de filtro que tiene un tamaño de poro o de malla entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , (b) poner en contacto las células retenidas por el elemento de filtro en la etapa (a) con una superficie de separación, en el que dicha superficie de separación está recubierta con un hidrogel y comprende moléculas de afinidad que se unen selectivamente a las células diana, (c) incubar las células y la superficie de separación en condiciones que permiten la unión de las moléculas de afinidad a las células diana; y (d) separar la superficie de separación de cualquier célula y material no unidos.

**Antecedentes de la invención**

En estudios clínicos se ha demostrado que las células tumorales diseminadas (CTD), es decir, las células tumorales que son detectables en sangre periférica o en la médula ósea de un paciente de cáncer, proporcionan valor informativo en términos de pronóstico de un paciente de cáncer, así como la evaluación del resultado terapéutico. Aparte de esto, estas células en muchos casos tienen la capacidad de indicar la existencia de un tumor en una fase temprana de la enfermedad.

Por ejemplo, los estudios con pacientes con cáncer de mama revelaron que la detección de células tumorales diseminadas en la sangre de los pacientes se correlacionaba significativamente con una supervivencia libre de progresión y una supervivencia global reducidas (Gaforio y col., (2003) Int. J. Cancer, 107(6):984-90; Statho-poulou y col., (2002) J. Clin. Oncol., 20(16):3404-12). Se obtuvieron resultados similares a partir de estudios realizados en otros tipos de cáncer (Koch y col., (2005) Ann. Surg., 241(2):199-205; Kinele y col., (2003) Ann. Surg., 238(3):324-30). De acuerdo con lo anterior, la monitorización precisa de las células tumorales diseminadas que están presentes en la sangre o en la médula ósea de pacientes con cáncer proporciona parámetros útiles para la optimización de la terapia y para predecir la evolución de la enfermedad.

Además, la diseminación hematogena de las células tumorales de un tumor primario también se supone que desempeña un papel en el desarrollo de metástasis (Eccles S.A. y Welch D.R. (2007), Lancet, 369, 1742-1757). La formación de metástasis en lugar de la progresión del propio tumor primario es la principal causa de muerte en las enfermedades tumorales. Por lo tanto, la detección de los primeros signos de formación de metástasis es crucial para el régimen de tratamiento que debe aplicarse a un paciente de cáncer.

En la actualidad, la detección y el aislamiento de las células tumorales diseminadas se realiza rutinariamente mediante el uso de perlas magnéticas que comprenden anticuerpos que se unen a antígenos de superficie definidos de las células tumorales. Estas perlas modificadas se incuban con una muestra de sangre de un individuo para unirse específicamente a las células tumorales que están presentes en la muestra. Sin embargo, las actuales técnicas disponibles se asocian con un alto grado de adhesión celular no específica a las perlas, así como una baja tasa de detección de células tumorales. Se sabe que, debido al elevado número de células no diana, en particular glóbulos rojos, en la muestra, no se puede garantizar en los procedimientos utilizados rutinariamente que cada célula tumoral en una muestra puede interaccionar con la superficie presentadora al anticuerpo de una perla para un tiempo suficientemente largo de manera que se produce la unión entre el anticuerpo inmovilizado y la célula diana. Por el contrario, un número significativo de células tumorales en una muestra no entrará en contacto con sus moléculas de captura correspondientes.

Por esta razón, en la técnica anterior se hicieron intentos para eliminar los glóbulos rojos con el fin de enriquecer las células tumorales en la muestra. Por ejemplo, se usó una centrifugación en gradiente de densidad utilizando medios de gradiente de densidad específicos (tales como Ficoll, Nycodens, Nycoprep, y similares). Los medios empleados para este propósito tienen densidades comprendidas entre la densidad de los glóbulos rojos y las células nucleadas. Tras la centrifugación, los glóbulos rojos y las células nucleadas sanguíneas se enriquecen en diferentes fases de los medios y se pueden separar uno de otro mediante pipeteado. Este enfoque tiene la desventaja particular de que es laborioso y requiere personal altamente experimentado para realizar la separación. Además, las células tumorales diseminadas pueden exhibir una gama amplia de densidad que significa que parte de estas células puede no estar disponible para la posterior etapa de unión por afinidad. El uso de medios de gradiente de densidad también requiere varias etapas de lavado de las células tumorales que se asocian con varios efectos adversos, tales como la tensión de cizallamiento y la adsorción no específica de las células a la pared de los tubos de reacción, los cuales pueden tener como resultado una pérdida de células diana. Se ha demostrado que el enriquecimiento de células tumorales mediante centrifugación en gradiente de densidad da como resultado regularmente una pérdida de casi dos tercios de las células tumorales presentes en la muestra (Choesmel y col., (2004), 101, 693-703). Adicionalmente, la centrifugación en gradiente de densidad no permite el procesamiento de grandes volúmenes de la muestra, lo que es una clara desventaja a la hora de considerar que las células tumorales diseminadas están presentes en la sangre o la médula ósea a concentraciones extremadamente bajas.

En un enfoque alternativo al que se utiliza actualmente, los glóbulos rojos se lisan mediante la adición a la muestra de sangre de tampón de lisis, tal como cloruro amónico. Mediante la adición de tampón de lisis, las membranas de los glóbulos rojos se rompen, lo que tiene como resultado la muerte celular y la liberación de los componentes intracelulares. Sin embargo, se ha demostrado que el uso de tampones de lisis regularmente también rompe una porción considerable de las células tumorales diseminadas presentes en la muestra. Adicionalmente, se puede suponer que el uso de estos tampones afectará negativamente el metabolismo de las células diana, lo que podría ser desventajoso para otras etapas de procesamiento (por ejemplo, el cultivo de las células aisladas). El abordaje "Metacell" de Brandt y Gedig (2009) usa etapas de preselección e hidrogeles recubiertos.

A la luz de los problemas mencionados anteriormente, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado para enriquecer y / o aislar células diana que están presentes en una muestra biológica junto con glóbulos rojos y / o plaquetas, teniendo dicho procedimiento una alta tasa de recuperación y, al mismo tiempo implica un tratamiento suave de las células diana de modo que solo unas pocas células diana se rompen durante el proceso. En particular, el proceso no debe imponer una extensa tensión mecánica o química sobre las células diana. También es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento que permite una unión altamente específica de las células diana en las muestras de sangre a las superficies de separación, procedimiento que se caracteriza por una adhesión no específica reducida de las células no diana, tales como glóbulos rojos, a dichas superficies. Estos objetos y otras ventajas se consiguen mediante los procedimientos definidos en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente invención se ha encontrado que un procedimiento combinado que comprende la filtración de una muestra que contiene glóbulos rojos y / o plaquetas (tales como una muestra de sangre entera) a través de un elemento de filtro que tiene un tamaño de poro particularmente pequeño y la posterior separación de las células diana en la fracción retenida a través de superficies de separación a la que las células diana se unen específicamente, tiene como resultado una tasa de recuperación extremadamente alta. En los ejemplos de la presente invención, se pudo recuperar casi el 100 % de las células diana marcadas sometidas al procedimiento de la invención. La adhesión no específica de los glóbulos rojos, las plaquetas o los leucocitos a las superficies de separación, lo que podría interferir con la etapa de unión por afinidad, se reduce considerablemente mediante la etapa inicial de filtración. Asimismo, se ha encontrado que los leucocitos que se han separado mediante la etapa de filtrado de acuerdo con la invención, muestran una afinidad de unión no específica menor por un factor de 2 a la superficie de separación en comparación con un leucocito en una muestra de referencia en la que se habían deplecionado los glóbulos rojos por centrifugación en gradiente de densidad (véase la Figura 2). De acuerdo con lo anterior, la recuperación de las células diana mediante la separación de superficie (también denominada *panning*) es mucho mayor que la que puede conseguirse mediante los procedimientos de la técnica anterior.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención divulga un procedimiento para el enriquecimiento y / o aislamiento de las células diana en una muestra, en la que la muestra comprende glóbulos rojos y / o plaquetas, que comprende

(a) filtrar la muestra a través de un elemento de filtro que tiene poros, orificios o aberturas con un tamaño de entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ ;

(b) poner en contacto las células retenidas por el elemento de filtro en la etapa (a) con una superficie de separación, en el que dicha superficie de separación es un recubrimiento de hidrogel sobre un material soporte y comprende moléculas de afinidad que se unen selectivamente a la célula diana;

(c) incubar las células y la superficie de separación en condiciones que permitan la unión de las moléculas de afinidad a las células diana; y

(d) separar la superficie de separación de cualquier célula no unida y el material.

El procedimiento de la invención puede aplicarse a cualquier muestra que comprende glóbulos rojos y / o plaquetas. Preferentemente, la muestra comprende un fluido corporal o un extracto de tejido de un individuo. Preferentemente, el individuo del cual deriva la muestra es un vertebrado, y más preferentemente, un mamífero. En una realización particularmente preferida, la muestra procede de un ser humano. La muestra será normalmente una suspensión celular. La muestra puede comprender o consistir en sangre (por ejemplo, sangre entera) o componentes de la sangre, orina, derrame pleural, ascitis, lavado broncoalveolar, aspirado de pezón de la glándula mamaria femenina o médula ósea. En un aspecto preferido, la muestra que comprende las células diana es una muestra de sangre o de médula ósea, por ejemplo, una muestra de un individuo humano que comprende, o que consiste principalmente en, sangre o médula ósea, respectivamente. La muestra puede obtenerse por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica anterior. Por ejemplo, si la muestra es una muestra de sangre humana, puede extraerse mediante venopunción. Los procedimientos para obtener médula ósea, por ejemplo, médula ósea humana, son también bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la médula ósea roja mezclada con sangre puede recolectarse de la cresta del ilion o del esternón, una intervención que se lleva a cabo generalmente mediante cirugía mínimamente invasiva. Como alternativa, la muestra biológica puede ser ascitis, es decir, fluido de cavidad peritoneal, derrame pleural, aspirados de los pezones de mama femenina, orina y otros fluidos corporales.

5 Cuando la muestra que se va a usar en el procedimiento de acuerdo con la invención tiene una viscosidad particularmente elevada, puede ser deseable diluirla antes de, o simultáneamente con, la aplicación de la muestra al elemento de filtro. Para este propósito, se puede usar cualquier tampón fisiológicamente aceptable que no interfiera con la unión posterior de las células diana a la superficie de separación por afinidad. Los tampones adecuados para la dilución de las muestras son tampones isoosmoláricos que amortiguan en un pH fisiológico, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hank, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con HEPES, tampón MES y similares. El pH del tampón fisiológico está preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente 9,0, más preferentemente entre aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente 8,0, y lo más preferentemente entre aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente 7,5, por ejemplo 7,4.

10 Una ventaja particular del procedimiento de la presente invención es que se pueden procesar volúmenes considerablemente altos de una muestra. Por ejemplo, un volumen de muestra de al menos 5 ml o más, por ejemplo, 8 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 35 ml, 40 ml, 45 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml o incluso 100 ml, 150 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml o más pueden ser sometidos a la etapa de filtración antes de que la fracción retenida se ponga en contacto después con la superficie de separación. De esta manera, la etapa de filtración se puede usar para concentrar la fracción retenida, lo que lleva a la reducción del tiempo de procesamiento de la muestra y el aumento del rendimiento global del procedimiento. Por el contrario, los procedimientos disponibles en la actualidad se basan en el uso de perlas magnéticas que se añaden a una muestra que se sospecha que comprende células diana. En estos procedimientos, con las perlas magnéticas solamente se pueden incubar pequeños volúmenes de entre 2-5 ml del fluido de muestra, porque de lo contrario la probabilidad de un contacto entre las células diana y los anticuerpos en la superficie de las partículas disminuye de forma significativa, lo que conduce a tasas de recuperación bajas. La etapa de filtración inicial enriquece las células diana y, al mismo tiempo, elimina un número considerable de glóbulos rojos y / o plaquetas que, de otro modo, interferirían con la posterior unión de las células diana a las moléculas de afinidad sobre la superficie de separación.

15 En una primera etapa del procedimiento de la invención, la muestra se filtra a través de un elemento de filtro que tiene poros, orificios o aberturas con un tamaño de entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ . Mediante el uso del elemento de filtro, se extraen los glóbulos rojos y / o plaquetas de la muestra que, de otro modo, podrían interferir con la unión de las células diana, por ejemplo, células tumorales diseminadas, a sus moléculas de afinidad correspondientes en la superficie de separación. Los glóbulos rojos (eritrocitos) son células de la sangre no nucleadas tienen un diámetro medio de 5-8  $\mu\text{m}$ , que son responsables por el transporte de oxígeno en la sangre. Se ha encontrado que debido a la alta deformabilidad de estas células, los elementos de filtro con un tamaño de poro de tan solo 0,5  $\mu\text{m}$  pueden usarse de manera efectiva para la eliminación de la gran mayoría de estas células. Los glóbulos rojos tienen una forma aplanada y pueden formar estructuras tubulares que son capaces de pasar a través de aberturas que tienen un tamaño que es significativamente inferior al diámetro medio de los glóbulos rojos en su estado aplanado relajado.

20 Del mismo modo, las plaquetas son células sin núcleo que por lo general tienen un diámetro medio de entre 1-2  $\mu\text{m}$  y un cierto grado de deformabilidad, lo que significa que también son capaces de pasar a través de los poros de los elementos de filtro que tienen el tamaño de poro mencionado anteriormente. Por el contrario, las células nucleadas, tales como leucocitos o células tumorales, son generalmente mayores de 5  $\mu\text{m}$  y tienen una capacidad limitada para deformarse. Esas células quedarán retenidas por el elemento de filtro contemplado para el uso en el procedimiento de la invención. Como se muestra en el ejemplo 6 más adelante, fue posible fácilmente mediante selección del elemento de filtro adecuado separar las células tumorales y los leucocitos de la mayoría de los glóbulos rojos y las plaquetas en una muestra de sangre entera humana, sin ninguna pérdida considerable de células tumorales.

25 La filtración en la etapa (a) del procedimiento anterior elimina una parte considerable de los glóbulos rojos presentes en la muestra. Preferentemente, el proceso de filtración elimina aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 95 % o incluso hasta aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de los eritrocitos que están presentes en la muestra. El proceso de filtración en la etapa (a) es también adecuado para eliminar una porción considerable de las plaquetas presentes en la muestra. Preferentemente, el proceso de filtración elimina aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 95 % o incluso hasta aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de las plaquetas que están presentes en la muestra. Las células nucleadas, tales como leucocitos o células tumorales, son retenidas por el elemento de filtro, de modo que la filtración se puede usar para enriquecer la fracción de estas células con respecto a los glóbulos rojos o plaquetas, respectivamente.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "elemento de filtro" se refiere a un medio o material que comprende poros distribuidos regular o irregularmente que permiten el paso a través del elemento de filtro de células o compuestos por debajo de un cierto umbral de tamaño o diámetro, al tiempo que retiene otras células, agregados o compuestos que tienen un tamaño o diámetro superior al umbral de tamaño o diámetro. El elemento de filtro para uso en la práctica del presente procedimiento puede incluir todo tipo de medios o materiales de filtro utilizados habitualmente y puede tener cualquier forma y tamaño. Por ejemplo, el elemento de filtro, que preferentemente tiene forma de lámina, puede consistir en o comprender una o más telas tejidas o no tejidas, una o más láminas

- perforadas, una o más tamices o mallas, uno o más materiales microporosos, una o más membranas o una combinación de dos o más de tales materiales. Tal como se utiliza habitualmente en la tecnología de filtro, el término "poro" denota agujeros, orificios y aberturas proporcionados en todos los materiales anteriores. Así, por ejemplo, en el caso de una malla de alambre o tela tejida, los poros son las mallas individuales o aberturas de malla con el tamaño de poro el tamaño de la malla, y en el caso de un tamiz, los poros son las aberturas individuales del tamiz. Se prefiere que el elemento de filtro comprenda o consista en una sola capa de uno de estos materiales o comprenda o consista en al menos dos capas de estos materiales. Por ejemplo, el elemento de filtro puede comprender o consistir en una o más membranas o filtros de membrana, tales como los que se utilizan habitualmente para el filtrado de materia particulada de un fluido líquido o gaseoso.
- 10 En cualquier caso, de acuerdo con la invención, el tamaño de poro del elemento de filtro está entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, el tamaño de poro del elemento de filtro está entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ . En este sentido, el tamaño de un poro particular, se entiende en el presente documento como el diámetro mínimo a través de ese poro. En otras palabras, el tamaño de poro como se usa en el presente documento es idéntico al diámetro del cuerpo esférico más grande que todavía es capaz de pasar a través del poro.
- 15 En particular, el elemento de filtro puede comprender o consistir en una tela tejida o no tejida. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "tela no tejida" se refiere a una estructura similar a una red, en la que orientados al azar las fibras, filamentos o hilos están entrelazados de una manera no alineada o aleatoria. Los filtros no tejidos pueden estar compuestos por cualquier material que no interfiera sustancialmente con el objeto de separar los glóbulos rojos y las plaquetas de las células diana. En particular, el material no debe ser tal que se produzca cualquier adhesión sustancial de los glóbulos rojos o plaquetas, lo que impediría un paso eficaz de estas células a través del elemento de filtro. Del mismo modo, el material no debe permitir ninguna adhesión inespecífica sustancial de las células diana, por ejemplo, las células tumorales diseminadas, al material de filtro, que pueda impedir la posterior transferencia de las células diana a la superficie de separación. Los elementos de filtro hechos de telas no tejidas que permiten la separación de células son bien conocidos en la técnica y pueden consistir en diversos materiales, tales como celulosa o derivados de celulosa, incluyendo, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Otros materiales de uso habitual para los filtros no tejidos incluyen policarbonato, almidón de hidroxietilo, polisulfonas, poliétersulfonas, poliamidas, poliétercetona, polieterimidada, poliarienos, éteres de polifenileno, fluoruro de polivinilideno (PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE) y similares, así como cristal. Los materiales de filtro no tejidos se pueden fabricar mediante varios procesos conocidos, por ejemplo, soplado por fusión, hilatura, tendido al aire, conformado en húmedo y procedimientos de formación de red por cardado. La producción de telas no tejidas se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4.340.563 y 3.849.241. Filtros no tejidos adecuados también están disponibles de varios proveedores diferentes, por ejemplo, de Carl Roth (Karlsruhe, Alemania), Schleicher y Schuell (Dassel, Alemania) y Satorius (Göttingen, Alemania).
- 35 En una realización preferida particular, el elemento de filtro usado en los procedimientos de la invención comprende o consiste en una tela tejida. Tal como se utiliza en el presente documento, una "tela tejida" se refiere a un material que se ha preparado por un proceso de tejido, es decir, mediante el entrelazado de fibras, filamentos o hilos de la urdimbre y la trama. Las fibras, filamentos o hilos de la urdimbre y la trama se cruzan, preferentemente en ángulos esencialmente rectos, en giros por encima o por debajo de cada uno. Esto se traduce preferentemente en un textil con aberturas de malla cuadradas o rectangulares que tienen un tamaño de malla definido que se puede utilizar para separar partículas con un tamaño definido. De acuerdo con la invención, el tamaño de poro o de malla del elemento de filtro tejido es de entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5  $\mu\text{m}$ , en el que el tamaño de una malla o abertura concreta se entiende en el presente documento que es el diámetro mínimo a través de esa malla o abertura. En otras palabras, el tamaño de malla o abertura como se usa en el presente documento es idéntico al diámetro del cuerpo esférico más grande que todavía es capaz de pasar a través de la malla o abertura. Las telas tejidas adecuadas para su uso en los presentes procedimientos incluyen telas de tamizado, como las utilizadas habitualmente en tamices de seda o procedimientos de impresión offset. La tela tejida para su uso en el presente procedimiento puede, en particular, comprender o consistir en poliamida, poliamidas aromáticas, polietileno, polipropileno, poliéster, polifluorocarbono, poliacrilonitrilo, poliuretano, poliacrilato, nylon, sulfuro de polifenileno, politetrafluoroetileno, polibencimidazol, y similares. Los filtros tejidos adecuados se pueden adquirir de diferentes proveedores, por ejemplo, la poliamida textil monofilamento 6.6. monofilamento de Schwegmann Filtrations-Technik GmbH, Gelsdorf, Alemania; PA1/1-PA 5/1 de Franz-Eckert GmbH, Waldkirch, Alemania; Sefar Nitex 03-1/1 o Sefar Nitex 03-5/1 o Sefar Petex 07-5/1 de Sefar AG, Heiden, Suiza.
- 55 Los elementos de filtro tejidos o no tejidos, además, pueden estar recubiertos con capas bioinertes que suprimen cualquier interacción con las células presentes en la muestra. Estas capas bioinertes pueden comprender, por ejemplo, proteínas bloqueantes adecuadas tales como BSA o caseína o un recubrimiento hidrófilo tal como un hidrogel, o una capa oxidada hidrófila que se puede preparar mediante oxidación (en plasma) de elementos de filtro orgánicos.
- 60 Otros elementos de filtro preferidos que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención incluyen microtamices hechos mediante grabado de materiales basados en obleas de silicio, tales como nitrato de silicio. Los tamices se preparan mediante procedimientos de semiconductores avanzados que proporcionan una capa de separación muy delgada y poros de tamaño uniforme. Mediante el uso de esta tecnología se pueden preparar poros

y aberturas que tienen un diámetro de 0,35 µm. Los elementos de filtro adecuados se pueden adquirir mediante, por ejemplo, fluXXion B.V., (Eindhoven, Países Bajos) o mediante Aquamarijn Micro Filtration B.V. (Zutphen, Países Bajos) con el nombre comercial microsieve®.

- 5 Otros elementos de filtro adecuados incluyen estructuras poliméricas preparadas mediante un proceso de moldeo con separación de fases. Esta tecnología utiliza una mezcla de un polímero en un sistema de disolvente / no disolvente para formar una estructura tridimensional sobre un molde. Mediante la selección de la combinación adecuada de polímero disolvente/no disolvente se pueden producir estructuras microporosas con tamaños de poro en el intervalo de 0,5 µm a 1 µm. Los elementos de filtro moldeados que se basan en esta tecnología incluyen los proporcionados mediante Aquamarijn Micro Filtration B.V. (Zutphen, Países Bajos).
- 10 La muestra o la muestra diluida se pueden filtrar a través del elemento de filtro simplemente proporcionando una diferencia de presión entre los dos lados del elemento de filtro, siendo la presión mayor en el lado de la presión al que se proporciona la muestra y a la que se forma la fracción retenida. Por ejemplo, dicha diferencia de presión se puede crear ventajosamente mediante la utilización adecuada de gravedad o mediante la utilización adecuada de diferencias en la presión hidrostática. Dependiendo de la configuración específica seleccionada para la etapa de filtración y en función de los parámetros del elemento de filtro (en particular, el tamaño de poro o de malla del elemento de filtro), el experto será capaz de ajustar la presión que debe aplicarse para la realización de la muestra a través del elemento de filtro. En pocas palabras, la presión debe ser lo suficientemente alta para eliminar eficazmente los glóbulos rojos y / o las plaquetas que están presentes en la muestra forzándolos a atravesar el elemento de filtro. Por otro lado, la presión debe ser lo suficientemente baja como para no dañar a las células diana ni empujarlas a través del elemento de filtro. El elemento de filtro se puede utilizar de diversas formas, siempre que el elemento de filtro seleccionado se pueda adaptar en el proceso de filtración específica. Por ejemplo, si se utiliza un conjunto de dos cámaras como se define a continuación y se ilustra en las figuras 8-9, un elemento de filtro que comprende una o más láminas planas se utiliza preferentemente entre las dos cámaras. También se pueden usar otras formas del elemento de filtro, por ejemplo, los elementos en forma de embudo o depresiones en forma de v.
- 25 Como alternativa, la etapa de filtrado del procedimiento de la invención también se puede lograr simplemente sobre la base de la difusión. Por ejemplo, se puede elegir una configuración cuando la muestra que comprende las plaquetas y / o los glóbulos rojos está separada por el elemento de filtro de una solución tampón que está desprovista de las plaquetas y / o glóbulos rojos. El tampón puede ser, por ejemplo, cualquiera de los tampones mencionados anteriormente en el contexto de dilución de la muestra. Si se incubaron durante un período de tiempo suficiente, las plaquetas y / o glóbulos rojos presentes en la muestra atravesarán el elemento de filtro para crear un equilibrio entre las diferentes concentraciones en la muestra y el tampón. Este proceso de difusión dirigido puede mantenerse y estar soportado mediante la eliminación continua de cualquiera de plaquetas y / o glóbulos rojos que atraviesan el elemento de filtro de dicho tampón (por ejemplo, mediante la sustitución de del tampón). En realizaciones en las que el filtrado se logra mediante difusión pura, también es posible utilizar elementos de filtro en forma de bolsas selladas que incluyen la muestra con las células diana. Los elementos de filtro sellados se pueden sumergir en un medio tampón adecuado (por ejemplo, PBS) que está desprovisto de glóbulos rojos y plaquetas. Los glóbulos rojos y / o las plaquetas en el elemento de filtro similar a una bolsa penetran gradualmente en el medio circundante. Preferentemente, las células que entran en el medio se eliminan, por ejemplo, mediante la sustitución repetida o continua del medio que contiene las células sanguíneas por medio fresco. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de una bomba peristáltica a un caudal de 5 ml / min.
- 30
- 35
- 40

45 Para prefiltración, se puede usar un elemento de filtro que tiene un tamaño de poro de 10-30 µm en el proceso de filtrado de acuerdo con la invención, en particular si la muestra biológica es una muestra de sangre. El elemento de filtro para la prefiltración se utiliza para eliminar los agregados de células que pueden formarse por agregación de leucocitos y plaquetas o por la interacción de fibrina, fibrinógeno y otros componentes de la sangre. Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención pueden incluir una etapa que precede a la etapa (a) del procedimiento anterior, en el que la muestra se filtra a través de un elemento de prefiltro que tiene un tamaño de poro o de malla de entre 10 y 30 µm. El elemento de prefiltro puede comprender o consistir en los materiales mencionados anteriormente junto con el elemento de filtro.

50 Las células diana que el presente procedimiento busca enriquecer y / o aislar son, preferentemente, células que se producen a concentraciones bajas en la muestra. De acuerdo con una realización preferida particular, las células diana son células tumorales, preferentemente células tumorales diseminadas y, más preferentemente, células tumorales diseminadas humanas. Las células tumorales diseminadas son células cancerosas que se han desprendido del tumor primario y circulan en la sangre periférica ose enriquecen en la médula ósea. Estas células están presentes en la sangre o la médula ósea a concentraciones muy bajas, por lo que su detección y aislamiento generalmente es complicado. Por ejemplo, las células tumorales circulantes en la sangre normalmente están presentes a una concentración de aproximadamente 1 en de  $10^6$  a  $10^8$  leucocitos. Por el contrario, la concentración de glóbulos rojos está en el intervalo de  $4-6 \times 10^9$  células por ml de sangre humana. Las plaquetas están presentes en la sangre a una concentración de aproximadamente  $1,5-3,0 \times 10^6$  células por ml de sangre. El alto número de glóbulos rojos y plaquetas en la sangre tiene el efecto adverso de que la unión de las células diana, tales como células tumorales que flotan en el torrente sanguíneo, a través de moléculas de unión específicas (por ejemplo, anticuerpos) en una superficie de separación, por ejemplo, una partícula magnética o una superficie de soporte

55

60

recubierta, a menudo es ineficaz, porque la mayoría de las células diana no interactúan suficientemente con sus moléculas de unión correspondientes para proporcionar una unión a la matriz de separación.

Las células tumorales diseminadas que se quieren detectar mediante el procedimiento de la presente invención pueden originarse a partir de un tumor primario de cualquier tipo de cáncer, por ejemplo, de los siguientes tumores primarios: cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer bronquial, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, cánceres hematológicos, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de útero, cáncer de huesos, cáncer de esófago, cáncer de laringe, cáncer nasofaríngeo, cáncer orofaríngeo, cáncer testicular, cáncer de vulva, hepatoma, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, linfomas, sarcomas, cáncer de vesícula biliar, cáncer de células germinales, mieloma múltiple, cáncer del intestino delgado, cáncer de timo, y similares. Preferentemente, el tipo de cáncer del que derivan las células tumorales diseminadas es un carcinoma, es decir, un tumor de origen epitelial, más preferentemente un carcinoma de mama, de colon, de pulmón o de próstata.

Además de las células tumorales, otros tipos de células que rara vez están presentes en la sangre o la médula ósea pueden ser células diana, tales como células plasmáticas, subtipos raros de linfocitos, por ejemplo, células de memoria, células blastocistos, células fetales, células de la placenta, y similares.

Después de separar las células diana a partir de glóbulos rojos y / o plaquetas, las células que han sido retenidas por el elemento de filtro se transfieren a, o se ponen en contacto con, una superficie de separación. Se puede usar cualquier procedimiento que es adecuado para establecer un contacto entre las células en la fracción retenida y la superficie de separación. Por ejemplo, cuando la superficie de separación es un portaobjetos recubierto, las células diana se pueden resuspender en un pequeño volumen de tampón (si es necesario) y se transfieren mediante pipeteado sobre la superficie de deslizamiento. El tampón puede ser, por ejemplo, cualquiera de los tampones mencionados anteriormente en el contexto de dilución de la muestra. La alícuota que contiene la fracción retenida normalmente tendrá un volumen de entre 0,5 y 8 ml, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 ml. Si es necesario, la alícuota se puede diluir con los tampones citados anteriormente para dar volúmenes de 10, 20, 20, 30, 40 o 50 ml. Como alternativa, cuando la superficie de separación por afinidad es una partícula pequeña, tal como una perla magnética con anticuerpos inmovilizados sobre la misma, las células diana se pueden resuspender en tampón y las perlas se añaden posteriormente a la suspensión celular para una incubación adicional. Además, la superficie de separación puede estar en forma de partículas, por ejemplo partículas de vidrio o partículas de una resina, de modo que las células diana que se han resuspendido en un volumen pequeño de tampón pueden llevarse a través de una columna de cromatografía llena de dichas partículas. Además, la superficie de separación puede tener la forma de un capilar a través del cual se lleva a cabo una suspensión que comprende las células diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "superficie de separación" en general se refiere a cualquier superficie portadora de al menos un tipo de molécula de afinidad adecuada para unirse selectivamente a una estructura predeterminada sobre la célula diana. La superficie de separación puede ser una superficie de la partícula, por ejemplo, la superficie de una perla, tal como una perla magnética o perla de vidrio, que se modifica mediante la inmovilización de moléculas de afinidad, tales como anticuerpos, que están dirigidas a las estructuras antigénicas definidas de las células diana. Como alternativa, la superficie de separación puede ser la superficie de un soporte sustancialmente plano, tal como la superficie de un portaobjetos, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio o de plástico. En un ejemplo preferido, la superficie de separación es parte de un biochip, preferentemente hecho de vidrio o plástico transparente. La superficie de separación también puede estar presente como un material de resina de cromatografía. Los materiales de soporte mencionados anteriormente pueden estar provistos de un recubrimiento para hacer que la superficie de separación sea bioinerte. Esto significa que se evita que las células se adsorban de forma no específica a la superficie. De acuerdo con un aspecto particularmente preferido, la superficie de separación se recubre con una capa de polímero hidrófilo natural o sintético. Preferentemente, los polímeros hidrófilos forman una estructura tridimensional en el material de soporte que está altamente hidratado. De acuerdo con lo anterior, tal red de polímero se denomina a menudo "hidrogel". Un hidrogel puede contener hasta un 99 % o más de agua, mientras que el contenido de polímero puede ser de 1 % o incluso inferior. Los procedimientos para preparar hidrogeles para su uso en la presente invención se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/10759. Esta solicitud internacional describe el uso de capas de mediador de adherencia que proporcionan el acoplamiento de los polímeros de hidrogel al material de soporte. Los recubrimientos de hidrogel proporcionados en el documento WO 02/10759 son particularmente preferidos para su uso en el procedimiento de la presente invención.

Se pueden usar diversos polímeros hidrófilos para el recubrimiento de hidrogel. Por ejemplo, el recubrimiento puede comprender o consistir en polisacáridos, polialcoholes, poliéteres, poliamidas, ácidos policarboxílicos, polisulfatos, polisulfonatos, polifosfatos, polifosfonatos y / o combinaciones o derivados funcionalizados de los mismos. Tales funcionalizaciones incluyen, por ejemplo, isotiocianatos, isocianatos, azidas de ácidos carboxílicos, N-hidroxisuccinimidas, N-acilimidazoles, derivados de cloruro de sulfonilo, aldehído, ceto, glioxal, oxirano, carbonato, arilhalogenuro, imidóesteres, anhídridos, alquilos de halógeno, acilos de de halógeno, maleimidas, aziridinas, acrilóilos, sulfhidrilos, disulfuros, diazoalcanos, diazoacetilos, carbamatos de imidazolilo, hidrazidas, diazo, arilazidas, benzofenonas, diazopiruvatos o diazirinas. Una funcionalización preferida adicional implica derivados de ácido nitrilotriacético (NTA), de modo que los ligandos o anticuerpos se pueden inmovilizar por medio de un quelato de metal. Los derivados de estreptavidina y / o biotina también son adecuados para funcionalización. De acuerdo

con un ejemplo preferente, el recubrimiento de hidrogel comprende o consiste en polímeros de policarboxilato. De acuerdo con un ejemplo preferente adicional, el recubrimiento de hidrogel tiene una carga ligeramente negativa, tal como se mide, por ejemplo, mediante determinación del potencial Zeta.

5 El recubrimiento de hidrogel puede ser de cualquier espesor que permita la captura de las células diana sobre la superficie del hidrogel. Preferentemente, el recubrimiento de hidrogel tiene un espesor de entre aproximadamente 100 nm y aproximadamente 5000 nm, preferentemente entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 3000 nm, por ejemplo, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 700 nm, aproximadamente 800 nm, aproximadamente 900 nm, aproximadamente 1.000 nm, aproximadamente 1100 nm, aproximadamente 1200 nm, aproximadamente 1300 nm, aproximadamente 1400 nm, aproximadamente 1500 nm, aproximadamente 1600 nm, aproximadamente 1700 nm, aproximadamente 1800 nm o aproximadamente 1900 nm. El espesor del recubrimiento se puede determinar mediante procedimientos rutinarios disponibles en la técnica anterior, por ejemplo, mediante microscopía de fuerza atómica o elipsometría.

15 El recubrimiento proporciona preferentemente una estructura de superficie tridimensional en la que las cadenas del polímero hidrófilo están alineadas al menos parcialmente vertical a la superficie del sustrato, es decir, en forma de cepillo. Debido a su mayor superficie en comparación con las estructuras planas, tales superficies de hidrogel en forma de cepillo muestran una capacidad de inmovilización particularmente mejorada para biomoléculas, tales como anticuerpos y otras moléculas de afinidad que son capaces de unirse a las células diana. Se ha encontrado que los recubrimientos de hidrogel de tipo cepillo, en particular los que comprenden o consisten en ciertos polímeros de policarboxilato, proporcionan una superficie excelente para unir selectivamente las células a un soporte sólido para la detección y / o cuantificación posterior. Las superficies de hidrogel preferidas para su uso en la presente invención están disponibles, por ejemplo, como portaobjetos recubiertos HC o HCX de XanTec bioanalytics GmbH, Dusseldorf, Alemania.

25 La superficie de separación comprende uno o más tipos diferentes de moléculas de afinidad que se unen selectivamente a las células diana en la muestra, de modo que se permite de este modo la separación de las células diana de cualquier otra célula presente en la fracción retenida después de la eliminación de glóbulos rojos y / o plaquetas. Las "moléculas de afinidad" se conocen ampliamente como moléculas que se unen a estructuras predeterminadas de las células, preferentemente a estructuras de proteínas o de sacárido que están presentes en la superficie de las células diana. Las moléculas de afinidad son, preferentemente, moléculas de proteínas, tales como receptores, lectinas, ligandos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ácidos nucleicos (tales como aptámeros), estructuras de sacáridos, o combinaciones de los mismos.

35 De acuerdo con la presente invención, el uso de moléculas de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos es particularmente preferido para la unión de la célula diana. En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos antiidiotípicos, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos humanizados, siempre y cuando muestren actividad inmunológica deseada, es decir, la unión específica a las células diana. En particular, debe entenderse que el término comprende cualquier tipo de molécula de anticuerpo artificial que se preparó mediante técnicas de injerto y similares. Los anticuerpos para su uso en el presente procedimiento pueden ser de cualquier clase de isotipo, tal como IgG, IgM, IgA, IgE, e IgD, así como sus subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2 y similares.

40 Además de los anticuerpos completos, la presente invención también se refiere a fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo que se unen específicamente a la célula diana. Como se usa en el presente documento, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo es un fragmento que conserva al menos una parte de la actividad de unión específica de toda la molécula de anticuerpo de la estructura antigénica particular de la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral diseminada. Los fragmentos de unión a antígeno de la invención pueden comprender los fragmentos Fv, Fab, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>. Se incluyen además en la expresión "fragmento de unión a antígeno" son fragmentos de anticuerpo de una sola cadena Fv y fragmentos Fv unidos por disulfuro (dsFv). Los procedimientos para la producción recombinante de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la técnica anterior y comprenden, por ejemplo, técnicas tales como expresión en fagos o expresión en ribosomas. Los fragmentos de anticuerpos recombinantes producidos por estos procedimientos pueden purificarse y analizarse para determinar la afinidad de unión y la especificidad para las células diana, por ejemplo, células tumorales.

55 La inmovilización de moléculas de afinidad específicas por una superficie de separación recubierta por hidrogel se puede hacer de diferentes maneras. El procedimiento estándar, que es adecuado para la mayoría de aplicaciones, implica el acoplamiento covalente de las moléculas de afinidad a través de funcionalidades amino o hidroxilo a un hidrogel preactivado con N-hidroxisuccinimida (NHS). Como las moléculas de afinidad inmovilizadas están unidas covalentemente al recubrimiento de hidrogel en lugar de estar adsorbidas, el proceso de inmovilización es igualmente adecuado para todo tipo de moléculas de afinidad, por ejemplo, anticuerpos, proteínas, péptidos, compuestos de PM bajo, ácidos nucleicos, y similares, siempre y cuando estas moléculas de afinidad lleven grupos reactivos adecuados, tales como restos e amino, (di)sulfuro o aldehído. Para estrategias de acoplamiento alternativas, en la técnica anterior también están disponibles recubrimientos funcionalizados con estreptavidina, proteína A, disulfuro o hidrazida. Los tampones que contienen la molécula de afinidad se pueden aplicar a toda la superficie de separación o transferir a regiones definidas de dicha superficie. Es fácilmente posible combinar



diferentes moléculas de afinidad en un sustrato. En un ejemplo preferido, la superficie de separación recubierta con hidrogel comprende 2 o más moléculas de afinidad que tienen diferentes especificidades de unión, tales como 2, 3, 4, o 5 anticuerpos diferentes.

Las superficies de separación pueden, por supuesto, también comprender diferentes tipos de moléculas de afinidad, tales como diferentes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se dirigen contra las mismas o diferentes estructuras antigénicas de la misma célula diana. Como alternativa, cuando se desea el enriquecimiento simultáneo de diferentes tipos de células diana dentro del mismo proceso, las superficies de separación pueden comprender también diferentes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que están dirigidos contra diferentes células diana. Preferentemente, la densidad total de moléculas de afinidad en las superficies de separación está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 ng/mm<sup>2</sup>, por ejemplo aproximadamente 0.5 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 5 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 8 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 10 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 15 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 20 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 30 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 40 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 50 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 60 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 70 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 80 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 90 ng/mm<sup>2</sup>, aproximadamente 100 ng/mm<sup>2</sup> o a densidades incluso superiores. Se prefiere particularmente que las densidades anteriores se refieran a moléculas de afinidad que son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. También se prefiere que las capacidades de unión de las moléculas de afinidad que se inmovilizan en la superficie de separación no se vean afectadas sustancialmente por el proceso de acoplamiento. Después de la inmovilización en la superficie de separación, las moléculas de afinidad, por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, retienen más del 50 %, preferentemente más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, y más preferentemente más del 95 % de su capacidad de unión original por la molécula diana, es decir, la capacidad de unión por la diana sin inmovilización.

Las moléculas de afinidad, por ejemplo, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno derivados de los mismos, se seleccionan en base a su capacidad para exhibir unión selectiva a las células diana, por ejemplo, a las células tumorales. Como se usa en este documento, unión selectiva significa que la molécula de afinidad se une a la célula diana con al menos aproximadamente 4 veces más fuerza, por lo general con más de aproximadamente 5 veces más fuerza, con más de aproximadamente 6 veces, con más de aproximadamente 8 veces, con más de aproximadamente 10 veces, con más de aproximadamente 15 veces, con más de aproximadamente 20 veces, con más de aproximadamente 50 veces, o incluso con más de aproximadamente 100 veces más fuerza con respecto a la unión a una célula no diana en la muestra, como se refleja, por ejemplo, por el valor K<sub>D</sub> de del par molécula de afinidad/ligando diana. Por ejemplo, cuando se utiliza una muestra de sangre entera en el procedimiento de la invención, la molécula de afinidad no debería presentar ninguna unión sustancial a los leucocitos que están presentes en el filtrado obtenido en la etapa (a) del procedimiento.

En un aspecto adicional, las moléculas de afinidad en las superficies de separación pueden ser receptores, lectinas, ligandos o porciones funcionales de los mismos. Además, se pueden usar moléculas de afinidad con una baja afinidad por las estructuras en las células diana. Aunque una interacción solo generalmente no será lo suficientemente estable para un proceso de separación, el efecto de colaboración de varias interacciones débiles distribuidas en el área de contacto de una célula con la superficie de separación tiene como resultado una interacción suficientemente fuerte y específica. Esto es una ventaja significativa sobre las técnicas de separación basadas en nanopartículas de la técnica anterior, ya que el área de superficie relativamente pequeña de esas partículas es demasiado pequeña como para permitir un mecanismo colaborador de este tipo.

En un ejemplo preferido, las células diana que se desea enriquecer y / o aislar son células tumorales diseminadas que están unidas a una superficie de separación, por ejemplo, una superficie de soporte recubierta con hidrogel, a través de anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen una afinidad de unión específica por el marcador de la superficie celular de estas células tumorales. Los marcadores de superficie adecuados de las células tumorales diseminadas son bien conocidos en la técnica e incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM o CD326), el receptor del factor 1 de crecimiento de la insulina (IGF-1 R), el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), la citoqueratina 19 (CK19), la citoqueratina 20 (CK20), la mucina 1 (MUC1), la mucina 2 (MUC2), el antígeno de membrana epitelial humano (EMA), el antígeno epitelial (Ber-EP4), el receptor alfa de folato (FRalpha). Otros marcadores se tratan ampliamente en la literatura, véase, por ejemplo, Pantel y col., (2008), Nature Reviews, 8, 1-12; Pantel y col., (2009), Nat Rev Clin Oncol., 6(6):339-51.

De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos para su uso como moléculas de afinidad en el procedimiento comprenden un anticuerpo anti-EpCAM, tal como el clon de anticuerpo 323A3 (disponible en Kamiya Biomedical Company, Seattle, EE.UU.), el clon de anticuerpo MK-1-25 (disponible en Acris, Herford, Alemania), el clon de anticuerpo AUA1 (disponible en Novus Biologicals, Littleton, EE.UU.), clon de anticuerpo 158206 (disponible en R'n'D Systems GmbH, Wiesbaden, Alemania), clon de anticuerpo 528 (disponible en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania), un anticuerpo anti-IGF-1R, tal como CP-751,871 (disponible en Pfizer Pharma AG, Berlín, Alemania), un anticuerpo anti-CD19, tales como los disponibles en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania a los que se hace referencia en los números de catálogo sc-70563, sc-18895, sc-70560, sc-70559, sc-70561, sc-21714, sc-65295, sc-52311, sc-69736, sc-65255, sc-8498, sc-52378, sc-20922, sc-18884, sc-18894, sc-19650, sc-51529, sc-8500-R, sc-13507, sc-53191, sc-8499, sc-18896 y sc-69735); un anticuerpo anti-MUC1, tales como los disponibles en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania a los que se hace referencia en los números de catálogo sc-71611, sc-71610, sc-71612, sc-71613, sc-59931, sc-71614, sc-59794, sc-59795, sc-59796,

sc-59797, sc-52347, sc-6827, sc-53376, sc-59798, sc-52085, sc-59799, sc-53377, sc-6826, sc-59793, sc-59800, sc-15333, sc-25274, sc-53379, sc-52086, sc-52087, sc-52088, sc-52089, sc-52090, sc-52091, sc-52092, sc-52093, sc-6825, sc-53380, sc-73595, sc-53381, sc-56441, sc-65589, sc-65220, sc-69644, sc-73606, sc-80889, sc-73605, sc-7313, y sc-52094; un anticuerpo anti-MUC2, tales como los disponibles en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania a los que se hace referencia en los números de catálogo sc-59859, sc-7314, sc-15334, sc-23170, sc-23171, y sc-13312; un anticuerpo anti-CK19, tales como los disponibles en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania a los que se hace referencia en los números de catálogo sc-53258, sc-53257, sc-33110, sc-33120, sc-25724, sc-33111, sc-33119, sc-53003, y sc-56371; un anticuerpo anti-CK20, tales como los disponibles en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania a los que se hace referencia en los números de catálogo sc-25725, sc-17112, sc-52320, sc-70918, sc-56522, sc-56372 y sc-58730; un anticuerpo anti-antígeno de membrana epitelial, tal como el clon E29 de Dako Deutschland GmbH, Hamburgo, Alemania; un anticuerpo anti-antígeno epitelial, tal como el clone Ber-EP4 de Dako Deutschland GmbH, Hamburgo, Alemania; un anticuerpo anti-egfr, tal como sc-120 disponible en Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Alemania. Otros anticuerpos adecuados son, por ejemplo, el anticuerpo VU-1-D9 de Novocastra Deutschland, Berlín, Alemania; el anticuerpo KS5 + 8.22 / C22 de Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg Alemania; el anticuerpo A45-BB3-Cy3 de Micromet, Munich, Alemania; el anticuerpo Mov18/Zel de Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Alemania. También se contempla el uso de fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos anteriores.

En un ejemplo del procedimiento divulgado, las células diana en la muestra se pueden preincubar con una molécula de afinidad adecuada, por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente, antes de poner en contacto las células diana con la superficie de separación. Por ejemplo, las células diana pueden preincubarse en una etapa inicial con uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que están dirigidos a ciertos marcadores de la superficie de la célula diana. La superficie de separación comprende inmovilizar las moléculas de afinidad que a su vez están dirigidas a las moléculas de afinidad utilizadas para la preincubación. Por ejemplo, cuando las moléculas de afinidad utilizadas para la preincubación de las células diana en la muestra son anticuerpos de ratón, una superficie de separación adecuada comprendería anticuerpos anti-ratón o fragmentos de los mismos que capturan los anticuerpos de ratón que se han unido a las células diana en la etapa de preincubación. El mismo principio puede usarse mediante preincubación de la muestra que contiene las células diana con anticuerpos biotinilados, tales como los anticuerpos IgG biotinilados, que están dirigidos a los antígenos de superficie específicos de las células diana respectivas. Estos anticuerpos marcados pueden capturarse mediante el uso de superficies de separación que se modifican para comprender moléculas de afinidad que se unen selectivamente al resto de biotina de los anticuerpos, tal como estreptavidina. Preferentemente, cualquier anticuerpo biotinilado no unido se elimina de la muestra después de la etapa de preincubación, por ejemplo, mediante la etapa de filtración del procedimiento.

Después de poner en contacto las células obtenidas de la fracción retenida con la superficie de separación, las células se incuban con la superficie en condiciones adecuadas para permitir la unión de las células a sus moléculas de afinidad correspondientes. Dependiendo de la naturaleza de la superficie de separación y las moléculas de afinidad seleccionadas para la captura de las células diana, las condiciones de incubación pueden variar. El experto podrá fácilmente identificar los parámetros óptimos que se deben aplicar para una superficie de separación dada. Por ejemplo, los tiempos de incubación pueden variar desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 horas, pero normalmente estarán en el intervalo de entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 8 horas, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6 horas, por ejemplo, 3, 4, o 5 horas. La temperatura estará en el intervalo de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C, preferentemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, más preferentemente de aproximadamente 32 °C a aproximadamente 36 °C. En un aspecto preferido particular, la incubación de la muestra que contiene las células diana se llevará a cabo a temperatura ambiente, por ejemplo, a de 22 °C a 25 °C.

En un ejemplo sencillo, una parte alícuota de líquido que contiene la fracción retenida de la etapa de filtrado se transfiere sobre la superficie de separación, por ejemplo, mediante pipeteo, y posteriormente se incuban. La alícuota que contiene la fracción retenida normalmente tendrá un volumen de entre 0,5 y 8 ml, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 ml. Si es necesario, la alícuota se puede diluir con los tampones citados anteriormente para dar volúmenes de 10, 20, 30, 40 o 50 ml. La incubación no necesariamente tiene que implicar la agitación de la superficie de separación. Sin embargo, se prefiere la agitación de la superficie de separación para una unión mejorada de las células diana a la superficie. Por ejemplo, cuando la superficie de separación es un portaobjetos sustancialmente plano, la incubación se puede realizar colocando el portaobjetos en una placa Petri o un tubo de cytospin que se agita en un agitador de plataforma oscilante con una velocidad de rotación entre 0,2 y 60 rpm, preferentemente de 10 a 20 rpm, por ejemplo, 15 rpm.

Como alternativa, la superficie de separación puede girar lentamente en la alícuota líquida que contiene la fracción retenida de la etapa de filtrado o puede introducirse en un tubo giratorio lleno con dicha alícuota. Otra opción más es (si es necesario varias veces) hacer fluir la muestra sobre una superficie de separación plana, opcionalmente inclinada (por ejemplo, de aproximadamente 30 ° a 40 °, preferentemente de aproximadamente 35 °), por ejemplo, un portaobjetos recubierto. En tal ejemplo, la superficie del portaobjetos puede sumergirse parcial o completamente en un tampón fisiológico adecuado (véase, por ejemplo, los tampones definidos anteriormente en el contexto con la dilución de la muestra). Dado que las células en la muestra tienen una densidad específica mayor que el tampón, fluirán a lo largo de la superficie de separación inclinada en la dirección de la parte inferior del dispositivo.

En un ejemplo aún más preferido, la incubación se lleva a cabo en un dispositivo de flujo continuo, por ejemplo, un dispositivo tal como se representa en la figura 10.

En el caso de partículas recubiertas, la suspensión de partículas se mezcla con la muestra purificada y se agita suavemente, como por ejemplo en un tubo cerrado en un incubador rotatorio a baja velocidad.

5 Después de que las células y la superficie de separación se han incubado en condiciones que permiten la unión de las moléculas de afinidad a las células diana, se eliminan todas las células no unidas y los materiales no unidos. Esto se logra mediante la separación de la superficie de separación de tales células y materiales no unidos. Preferentemente, esta etapa también incluye el lavado de la superficie de separación con un tampón de lavado adecuado, tal como los tampones de isoosmoláricos mencionados anteriormente en el contexto con dilución de la muestra.

10 Es posible aislar células diana en un estado nativo que permite el posterior procesamiento aguas abajo de las células. Por ejemplo, las células aisladas mediante el procedimiento descrito anteriormente pueden cultivarse en medios de cultivo celular estándar. Esta es, por ejemplo, una ventaja particular con células tumorales que puede caracterizarse adicionalmente después del aislamiento. Como ventaja adicional, las células obtenidas mediante el procedimiento divulgado en el presente documento muestran una morfología celular intacta en comparación con las células aisladas de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica anterior. Como se muestra en la figura 7, las células aisladas con sistemas habituales basados en partículas magnéticas (por ejemplo, Veridex) tienden a perder su forma esférica. En consecuencia, muchas células no se identificarán debido a una pérdida del núcleo, una relación de plasma-núcleo no regular y la aparición de restos celulares que se tiñen positivamente para los marcadores para la detección de anticuerpos, lo que conduce a resultados falsos positivos. Por el contrario, la morfología esférica de las células tumorales capturadas mediante el procedimiento de la invención no se ve alterada debido al hecho de que las células no están acopladas a las partículas de bordes afilados y se unen a una superficie suave que flota en la parte superior de macromoléculas.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la detección y/o cuantificación de las células diana en una muestra, en la que la muestra comprende glóbulos rojos y / o plaquetas. El procedimiento comprende

- a) realizar un procedimiento como se ha descrito anteriormente en el contexto con el aislamiento y / o enriquecimiento de las células diana; y
- b) detectar y / o cuantificar las células diana por medios adecuados.

20 Los procedimientos para detectar células diana que se han capturado son bien conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, estos procedimientos se pueden basar en la detección de moléculas marcadoras, por ejemplo, estructuras de proteína o sacárido de superficie o secuencias de nucleótidos, que son altamente específicas de las células diana que se desea detectar y / o cuantificar. La elección de moléculas marcadoras adecuadas dependerá de la célula diana en particular y el experto no tendrá problemas para seleccionar moléculas marcadoras adecuadas y las correspondientes moléculas de afinidad que se unen específicamente a estas moléculas marcadoras.

25 De acuerdo con un aspecto adicional, la detección y / o cuantificación de las células diana se puede realizar mediante el uso de moléculas de afinidad marcadas de forma detectable, tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos marcados de manera detectable. Las moléculas de afinidad que se van a usar en la etapa de detección y / o cuantificación pueden ser, por ejemplo, las mismas moléculas que se han descrito en otro lugar del presente documento para la inmovilización en las superficies de separación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que estén marcados o que se puedan detectar por sí mismos mediante anticuerpos secundarios marcados.

30 De acuerdo con otro aspecto, la detección y / o cuantificación de las células diana implica sondas de ADN marcadas de forma detectable. Más preferentemente, la detección y / o cuantificación comprenden hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Varios protocolos para la realización de un análisis FISH utilizando sondas marcadas de diferente longitud en las células diana intactas están disponibles en la técnica (por ejemplo, detección de amplificación de EGFR usando sondas de ADN específicas). En un ensayo de hibridación *in situ*, las células diana que se van a detectar y / o cuantificar están típicamente permeabilizadas y el ADN de las células se funde parcialmente. Después, se pone en contacto el ADN con una solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de sondas marcadas fluorescentemente específicas de la secuencia de ácido nucleico particular seleccionado para la detección de las células diana. Por ejemplo, cuando se desea la detección y / o cuantificación de células tumorales procedentes de un tejido epitelial en la sangre, se puede usar una sonda de ácido nucleico marcada dirigida a EGFR, HER2, PI3-quinasa, c-myc, akt, y similares. La sonda que se ha hibridado con el ADN de las células tumorales muestra un número de manchas de EGFR de más de 2, por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 o más, y se puede distinguir del ADN de los leucocitos que pueden haberse adsorbido a la superficie de separación (2 manchas a lo sumo). Las sondas FISH normalmente están marcadas con uno o más indicadores fluorescentes. Después de la hibridación con la sonda, las células diana se lavan a una rigurosidad predeterminada o a una rigurosidad creciente hasta que se obtiene una relación señal – ruido apropiada. Después, las sondas hibridadas se monitorizan, por ejemplo, mediante microscopio de fluorescencia. Mediante el uso de múltiples sondas de ácidos

nucleicos con diferentes colores de fluorescencia, se puede realizar un análisis multicolor (es decir, para diferentes secuencias) en una sola etapa en la superficie de separación. Las sondas de ácido nucleico utilizadas en los ensayos FISH son generalmente más largas que las utilizadas, por ejemplo, en la transferencia de tipo Southern. Las sondas FISH pueden tener un tamaño de aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 o hasta 100 kb, o incluso de 200, 300 o 400 kb. Las sondas FISH se pueden marcar directamente (por ejemplo, mediante el uso de colorantes fluorescentes) o marcar indirectamente (por ejemplo, mediante un hapteno, tal como digoxigenina o biotina). Se prefiere el uso de marcadores fluorescentes, de modo que se pueda observar directamente el resultado de la hibridación con el ADN genómico de la muestra de ensayo (por ejemplo, células de tejido derivado de biopsia). Los kits de marcaje para el marcado de fluorescencia se pueden obtener de diferentes fabricantes, tal como los kits de marcaje SpectrumOrange, SpectrumGreen, y SpectrumRed que se pueden adquirir en Vysis Inc., Downer's Grove, Illinois, EE.UU.

Por supuesto, es también posible combinar uno o más de los procedimientos anteriores para detectar y / o cuantificar las células diana con el fin de mejorar la sensibilidad. Por ejemplo, la detección y / o cuantificación pueden basarse en un procedimiento combinado de hibridación fluorescente *in situ* y la detección basada en anticuerpos, como se describe a continuación en los ejemplos.

De acuerdo con un aspecto, la detección y / o cuantificación de las células diana implican una PCR, preferentemente una PCR en tiempo real. En este enfoque, se usan cebadores dirigidos a genes marcadores, que son habituales para las células diana respectivas, para amplificar productos que indican la abundancia de estas células en una muestra. Por ejemplo, si la célula diana es una célula tumoral, tal como una célula tumoral diseminada, se puede usar uno o más genes que codifican el marcador de superficie celular específico tratado anteriormente como moldes para la amplificación por PCR. Para una célula tumoral diseminada, los genes adecuados que codifican marcadores de superficie adecuados son aquellos que codifican, por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM o CD326), el receptor del factor 1 de crecimiento de la insulina (IGF-1 R), el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), la citoqueratina 19 (CK19), la citoqueratina 20 (CK20), la mucina 1 (MUC1), la mucina 2 (MUC2), y similares. En un aspecto particularmente preferido, se usa una combinación de cebador dirigido a diferentes genes marcadores para la detección y / o la cuantificación de las células diana.

Además, la detección de células tumorales se puede lograr utilizando procedimientos fotoacústicos de dos colores. De este modo, el uso de nanotubos de carbono recubiertos de oro como un segundo agente de contraste permite la detección multiplex (véase, por ejemplo, Galanzha y col., (2009), Nat. Nanotechnol. 4, 855).

A continuación, aspectos ventajosos de ejemplo de realizaciones preferidas de la invención se explican con más detalle con referencia a las figuras.

### **Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra la incubación de la línea de células tumorales de mama que expresan EGFR, MDA-MB-468, que están presentes en el suero humano, sobre una superficie de hidrogel derivada parcialmente de anticuerpo. Izquierda: Superficie de hidrogel funcionalizado con IgG anti-EGFR. Esquina superior derecha: superficie de hidrogel blanco (control).

La Fig. 2 muestra una comparación de unión no específica (NSB) de leucocitos de diferentes preparaciones sobre superficies variables de policarboxilato (HC) (con y sin anticuerpo). Se prepararon fracciones de leucocitos a partir de sangre entera mediante a) centrifugación en gradiente de densidad o b), c) por tamizado celular. La incubación se realizó en 2 ml de PBS que contiene de 0,96 a 1,15 millones de células en tubos de centrifugación Cytospin con portaobjetos HCX modificados con EpCAM (XanTec bioanalítica GmbH, Dusseldorf, Alemania) y portaobjetos HC no reactivos (XanTec bioanalytics GmbH, Dusseldorf, Alemania).

La Fig. 3 muestra una representación esquemática de un recubrimiento de hidrogel que puede usarse preferentemente en el procedimiento de la invención. El sustrato (3) está recubierto con una capa de estimulación de la adhesión (2) y un polímero hidrófilo (1), el último de los cuales tiene una estructura similar a un cepillo. El polímero hidrófilo (1) está dispuesto verticalmente a la superficie del sustrato, de modo que una multiplicidad de grupos funcionales (4) está disponible para la inmovilización de las moléculas de afinidad.

La Fig. 4 muestra una ilustración esquemática de una realización de la disposición ari para llevar a cabo la etapa de filtración.

La Fig. 5 muestra una ilustración esquemática de otra realización de la disposición ari para llevar a cabo la etapa de filtración.

La Fig. 6 muestra la tasa de recuperación de las células tumorales MDA-468 tras la separación por afinidad usando un portaobjetos de hidrogel modificado con anticuerpos.

La Fig. 7 muestra una comparación de la morfología celular después de diferentes procesos de aislamiento de células; A y B: las células tumorales capturadas por el sistema Veridex están rodeadas por partículas magnéticas

recubiertas por el anticuerpo anti-EpCAM y plaquetas agregadas. La morfología esférica de las células capturadas se pierde; C: células tumorales capturadas en los portaobjetos HC recubiertos con el anticuerpo anti-EpCAM.

La Fig. 8 muestra una ilustración esquemática de otra realización más de la disposición ari para llevar a cabo la etapa de filtración.

5 La Fig. 9a ilustra un primer procedimiento de realización de la etapa de filtración que utiliza la disposición de la figura 8.

Las Figs. 9b y 9c ilustran un segundo procedimiento de realización de la etapa de filtración que utiliza la disposición de la figura 8.

10 La Fig. 10 muestra una ilustración esquemática de una realización de la disposición ari para llevar a cabo la etapa de separación.

Las Figs. 11 a y 11 b muestran una ilustración esquemática de una realización adicional de una disposición para la realización de la etapa de separación.

15 En la Fig. 4, una disposición para la realización de la etapa de filtración comprende un depósito de muestras 1 para recibir y contener la muestra diluida o sin diluir que posiblemente incluya las células diana. El depósito 1 tiene una abertura de salida 2 a través de la cual, en funcionamiento, la muestra sale del depósito 1 y entra en un conducto 3. Como se muestra en la Fig. 4, la abertura de salida 2 está dispuesta preferentemente en la parte inferior del depósito 1 y el depósito 1 y el conducto 3 están dispuestos preferentemente de tal manera que la liberación la muestra desde el depósito 1 al conducto 3 y el movimiento de la muestra dentro del conducto 3 se efectúan por gravedad, o al menos la gravedad ayuda. A lo largo de la presente descripción de las figuras, términos tales como "inferior" y "superior" se refieren a la orientación que se muestra en las figuras.

20 Además del depósito 1, un depósito adicional 4 puede proporcionarse opcionalmente para recibir y contener una solución o tampón que puede servir para diluir la muestra. El depósito 4 tiene una abertura de salida 2 a través de la cual, en funcionamiento, la solución sale del depósito 4 y entra en un conducto 6. De nuevo, la abertura de salida 5 está dispuesta preferentemente en la parte inferior del depósito 4 y el depósito 4 y el conducto 6 están dispuestos preferentemente de tal manera que la liberación la muestra desde el depósito 4 al conducto 6 y el movimiento de la muestra dentro del conducto 6 se efectúan por gravedad, o al menos la gravedad ayuda. El conducto 6 está conectado al conducto 3 de tal manera que la muestra y la solución se pueden mezclar.

25 El extremo de liberación 7 del conducto 3 está dispuesto de tal manera que la muestra, opcionalmente mezclada con la solución desde el depósito 4, se puede suministrar de forma continua, discontinua o intermitente a un componente de filtro generalmente cilíndrica 8 que está dispuesto dentro de un contenedor 9.

30 El componente de filtro 8 comprende en su extremo longitudinal inferior una placa 10 y en su extremo longitudinal superior un anillo 11. La placa 10 y el anillo 11 están interconectados mediante una pluralidad de barras longitudinales (no mostradas en las figuras). Un elemento de filtro con forma de lámina 12 está dispuesto anularmente cerrado alrededor de la disposición de las barras de tal manera que forma la superficie circunferencial del componente de filtro cilíndrico 8. En este sentido, también es posible que el elemento de filtro en forma de lámina 12 esté dispuesto de forma anular cerrada en el interior del espacio definido por las barras uniéndole a la cara interior radial de cada una de las barras. La placa 10 y el anillo 11 pueden tener, por ejemplo, una forma circular, ovalada, cuadrada, rectangular, hexagonal u de otro tipo, teniendo el componente de filtro cilíndrico 8 una forma de sección transversal correspondiente.

35 Por medio de esta construcción, la muestra alimenta desde el extremo de liberación 7 del conducto 3 puede entrar en el componente de filtro 8 a través de la abertura del anillo 11, y el filtrado sale del componente de filtro 8 a través del elemento de filtro 12 y se recoge dentro del recipiente 9. Se proporciona un conducto adicional 13, por ejemplo, conectado a la parte inferior del recipiente 9, a través de cuyo conducto 13 el filtrado puede eliminarse del contenedor 9, por ejemplo, mediante drenaje bajo la influencia de la gravedad o mediante la utilización de bombas o dispositivos de aspiración adecuados. Se proporciona un recipiente adicional 14 para recoger el filtrado retirado del recipiente 9.

40 En funcionamiento, el flujo de la muestra hacia el interior del componente de filtro 8 y / o la velocidad de eliminación del filtrado desde el recipiente 9 se controlan de tal manera que el nivel absoluto de la superficie 15 del líquido dentro del componente de filtro 8 es más alto que el nivel de la superficie 16 del líquido dentro del recipiente 9. De esta manera, ventajosamente se mantiene una diferencia de presión hidrostática en ambos lados del elemento de filtro 12 que obliga al filtrado a pasar a través del elemento de filtro 12.

45 Opcionalmente se puede proporcionar un conducto de gas 17 para la introducción de gas en el filtrado para generar ventajosamente un movimiento dentro del líquido.

50 En una realización alternativa se muestra esquemáticamente en la figura 5 una disposición para la realización de la etapa de filtración es una disposición de filtración de flujo cruzado 20. De la forma usual, comprende dos conductos

- 21, 22 que se extienden en paralelo y en contacto unos con otros, y un elemento de filtro 23 está dispuesto en aberturas alineadas en las paredes laterales de los conductos 21, 22 de forma que el líquido es capaz de pasar a través del elemento de filtro 23 entre los dos conductos 21, 22. En funcionamiento, un flujo 24 de la muestra diluida o sin diluir se introduce en un extremo del conducto 21 de tal manera que se pasa tangencialmente a través del elemento de filtro 23. Un flujo en dirección opuesta 25 de un medio fisiológico se introduce en el extremo opuesto del conducto 22 de tal manera que se pasa tangencialmente a través de la cara opuesta del elemento de filtro 23. Manteniendo una presión más alta dentro del conducto 21, el filtrado es forzado a través del elemento de filtro 23 hacia el interior del conducto 22 de tal manera que la fracción retenida 26 sale del conducto 21 y una mezcla 27 del filtrado y el medio fisiológico sale del conducto 22.
- Una forma de realización alternativa adicional de una disposición para la realización de la etapa de filtración se muestra esquemáticamente en la Figura 8. Esta disposición 30 comprende dos cuerpos 31 y 32 que, en la realización ilustrada, tienen una forma cuboide. Los cuerpos 31 y 32 se disponen de un modo tal que las superficies 38a y 38b del cuerpo 31 y el cuerpo 32, respectivamente, se extienden en paralelo y a una distancia una de otra. De esta manera, hay un hueco o separación 39 presente entre los dos cuerpos 31 y 32.
- En cada una de las superficies 38a y 38b, se forma un hueco 31 de una y 32a, respectivamente, en el cuerpo respectivo 31 y 32, respectivamente. En la realización ilustrada, los huecos 31a y 32a tienen igualmente una forma cuboide. Las aberturas de los huecos 31a y 32a, que están enfrentadas, se cierran mediante un elemento de filtro habitual 33 dispuesto adecuadamente en la separación 39 entre los cuerpos 31 y 32. A fin de asegurar un cierre sellado de los huecos 31a y 32a, el elemento de filtro 33 se puede llevar en un bastidor que tiene 33a una construcción anular y estando provisto de elementos de sellado adecuados, en el que los elementos de sellado acoplan herméticamente las superficies 38a y 38b y rodean las aberturas de los huecos 31a y 32a.
- Dos conductos 34 y 36 se extienden desde el hueco 31 a y se proyectan desde la superficie 40a opuesta a superficie 38a y dos conductos 35 y 37 se extienden desde el hueco 32a y se proyectan desde la superficie 40b opuesta a la superficie 38b, y estos conductos 34, 35, 36 y 37 permiten introducir fluidos en y eliminarlos del interior de los huecos 31a y 32a. Por lo tanto, en principio es posible por medio de esta disposición 30 realizar una filtración de flujo cruzado similar al caso descrito con referencia a la Figura 5 introduciendo adecuadamente un flujo de la muestra diluida o sin diluir a través de por ejemplo, el conducto 34 y un flujo de un medio fisiológico a través de, por ejemplo, el conducto 37.
- Sin embargo, la disposición 30 mostrada en la Figura 8 es particularmente ventajosa para la realización de dos procedimientos diferentes de filtración.
- El primer procedimiento, en el que la disposición 30 no se mueve y está orientada de tal manera que el elemento de filtro 33 y la separación 39 se extienden en un plano vertical, se ilustra en la Figura 9a. Para una filtración eficaz, ambos huecos 31 y 32a están primero llenos con tampón hasta un nivel de aproximadamente 50 % del volumen del hueco interior. Posteriormente, la muestra diluida o sin diluir se introduce a través de, por ejemplo, el conducto 35 en el hueco 32a, de modo que eleva el nivel de líquido dentro del hueco 32a en comparación con el nivel de líquido dentro de hueco 31a. De esta manera, se crea una diferencia de presión hidrostática en ambos lados del elemento de filtro 33 que fuerza al filtrado a través del elemento de filtro 33. Por supuesto, también es posible llenar inmediatamente el hueco 32a a un nivel adecuado con una mezcla de tampón y muestra.
- El segundo procedimiento, en el que la disposición 30 realiza un movimiento de balanceo y está orientada inicialmente de tal manera que el elemento de filtro 33 y la separación 39 se extienden en un plano horizontal, se ilustra en las Figuras 9b y 9c. Al principio, ambos huecos 31a y 32a se llenan de nuevo con tampón hasta un nivel de aproximadamente 50 % del volumen del hueco interior. Posteriormente, la muestra diluida o sin diluir se introduce a través por ejemplo, el conducto 35 en el hueco 32a. A partir de la orientación horizontal mostrada en la Figura 9b, la disposición 30 se pone en un movimiento de balanceo, preferentemente lento, alternativamente mediante la inclinación de la disposición 30 en dos direcciones opuestas, como se ilustra en la Figura 9c. El ángulo máximo de inclinación preferido es 25 °. En las posiciones inclinadas asumidos en el curso del movimiento de balanceo de la disposición 30, los volúmenes de líquido en los dos huecos 31a y 32a contactan entre sí a través de porciones del elemento de filtro 33. Debido al movimiento de balanceo, el área de contacto se desplaza a través toda la superficie del elemento de filtro 33. El movimiento de balanceo puede efectuarse ventajosamente por medio de un agitador de balanceo.
- La Figura 10 muestra una vista en sección transversal de una disposición 50 para poner en contacto la fracción retenida producida por medio de la etapa de filtración con una superficie de separación. La disposición 50 comprende un portaobjetos 51, preferentemente rectangular, que tiene la superficie de separación 52.
- Además, la disposición 50 comprende dos cuerpos 53 y 54 que, en la realización ilustrada, tienen una forma cuboide. En la superficie superior 55 del cuerpo inferior 54 se proporciona un hueco 56 que está conformado y dimensionado para recibir el portaobjetos 51 junto con un elemento de sellado anular 59 y tal que al menos el elemento de sellado 59 se proyecta ligeramente desde la superficie 55. Un hueco correspondiente 57 se proporciona en la superficie inferior 58 del cuerpo superior 53. Este último hueco 57 está dimensionado y conformado para recibir con acoplamiento la porción de la elemento de sellado. 59 que se proyecta desde la superficie 55 del cuerpo inferior

54 cuando los dos cuerpos 53 y 54 están unidos entre sí con las dos superficies 55 y 58 que son adyacentes y que se extienden paralelas entre sí como se explicará en más detalle más adelante.

5 En funcionamiento, el portaobjetos 51 se posiciona dentro del hueco 56, y el elemento de sellado anular 59 se coloca en la parte superior del portaobjetos 51. Este elemento de sellado 59 está dimensionado y conformado de tal manera que se acopla circunferencialmente a la superficie de separación superior 52 del portaobjetos 51 en una región del borde del mismo. Después, el cuerpo 53 se coloca en la parte superior del cuerpo 54 de tal manera que el elemento de sellado anular 59 se recibe dentro del hueco 57, y los dos cuerpos 53 y 54 se aseguran de un modo fijo uno al otro por medio de, por ejemplo, tornillos que se introducen a través de una pluralidad de taladros correspondientes 60 y 61 en los cuerpos 53 y 54, respectivamente. Los huecos 56 y 57 están dimensionados de tal manera que en esta posición la superficie de separación 52 del portaobjetos 51 está separada de 3 a 500  $\mu\text{m}$  de la pared interior 62 del hueco 57.

10 En el cuerpo superior 53 se proporcionan dos orificios pasantes que tienen secciones de gran diámetro 63a y 63b, respectivamente, y una sección de diámetro pequeño 64a y 64b de diámetro, respectivamente. Las secciones de diámetro pequeño 64a y 64b se abren en el hueco 57. Por lo tanto, es posible, en funcionamiento, introducir la fracción retenida a través del orificio pasante 63a, 64a en el hueco 57 en un extremo del mismo, y eliminar el filtrado del hueco 57 en el extremo opuesto a través del orificio pasante 63b a través de, 64b, con la fracción retenida fluyendo a lo largo y en contacto con la superficie de separación 52. Debido a la estrecha separación entre la superficie de separación 52 y la pared interior 62 del hueco 57, el flujo es esencialmente y de manera ventajosa un flujo laminar.

15 Además, es posible llenar de forma simultánea la fracción retenida en ambos orificios pasantes 63a, 63b y 64a, 64b y poner la disposición en un movimiento de balanceo como se muestra esquemáticamente en las figuras 11a y 11b. En estas figuras, los orificios pasantes 63a, 63b y 64a, 64b tienen una forma cónica con el fin de reducir el volumen muerto.

## Ejemplos

### 25 Ejemplo 1

#### Preparación de una muestra de ensayo que contiene células tumorales

30 Las células MDA-468 cultivadas derivadas de carcinoma de mama humano se tiñeron previamente con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Pierce / ThermoScientific) sin permeabilización. DAPI es un colorante fluorescente catiónico que se une a ADN ricos en adenina-timina. DAPI se utiliza regularmente para la tinción de los núcleos celulares. Las células teñidas se pueden contar mediante inspección visual o mediante dispositivos automatizados adecuados. Las células se lavaron dos veces con Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) para eliminar el exceso de colorante. Cada suspensión de células preteñidas se controló para la emisión de fluorescencia. Las alícuotas de las células tumorales se contaron manualmente y se enriquecieron en muestras de sangre entera humana recogidas de donantes sanos mediante venopunción en tubos de recogida con EDTA para prevenir la coagulación. Las muestras de sangre se usaron en un plazo de 4 horas desde la obtención. Para las pruebas de recuperación, las células tumorales se diluyeron a un número de células de entre 50 y 500 células / 100  $\mu\text{l}$  para minimizar la dilución y los errores de recuento.

### Ejemplo 2

#### Preparación de una tela tejida para el tamizado celular

40 El filtro de un conjunto de administración de sangre (Sarstedt AG & Co; 74.4255) se separó y se retiró el filtro de tejido. Una lámina de una tela tejida (Sefar AG, Sefar Nitex 03-5 / 1, Sefar Petex 07-5 / 1) que tiene un tamaño de malla de 1  $\mu\text{m}$  se fijó en la rejilla del filtro mediante el uso de un adhesivo. Después de fijar la tela tejida a la rejilla del filtro, se retiró cualquier disolvente restante que derive del adhesivo al vacío durante 30 minutos. Se realizó una prueba de fugas con una suspensión celular de monocitos de la capa leucocitaria obtenida mediante centrifugación de 500 ml de sangre sobre la totalidad del volumen de la rejilla de filtro. La rejilla de filtro preparada de este modo se fijó en el centro de un vaso de precipitados mediante el uso de un adhesivo médico de doble cara (50  $\mu\text{m}$  de espesor) de manera que la parte inferior cerrada de la rejilla de filtro estaba en contacto con la parte inferior del vaso de precipitados.

### Ejemplo 3

#### 50 Eliminación de los glóbulos rojos y las plaquetas de la muestra

Se prefiere prehumidificar la rejilla de filtro preparada en el ejemplo 2 para evitar la adhesión no específica inicial de las células a la unidad de filtro. Por lo tanto, se añadió un volumen de  $\geq 10$ -15 ml de un tampón fisiológico y isoosmolárico (por ejemplo, PBS) a la rejilla de filtro. La filtración se llevó a cabo en un ensamblaje tal como se representa en la figura 4. El tampón se aplicó al el centro de la rejilla de filtro cilíndrica por un conducto que se encuentra 1-2 cm por encima de la abertura de la rejilla del filtro. Se fijó un caudal de 1 ml / min con una bomba

peristáltica Una muestra de sangre tal como se preparó en el ejemplo 1 (almacenada durante 24 horas en agitación a temperatura ambiente) que contiene entre 10 y 120 células MDA-468 por ml en los experimentos de enriquecimiento se aplicó a la rejilla de filtro mediante un segundo conducto con un caudal de de 100-200  $\mu$ l/min. De esta manera, se pudieron obtener diluciones de las muestras de sangre de en una proporción de aproximadamente 1: 5 a 1: 10.

Debido al tamaño de malla estrecha del elemento de filtro tejido, el menisco de líquido en el compartimiento interior de la rejilla del filtro era más alto que el menisco en el vaso de precipitados que encierra la rejilla de filtro (véase la Figura 4). La presión resultante condujo a la eliminación de los glóbulos rojos y las plaquetas que pasaron las mallas del elemento de filtro tejido y se enriquecieron en el vaso de precipitados. Para mantener el menisco en el vaso de precipitados, un conducto de residuos se fijó en la parte inferior del vaso de precipitados que estaba conectado con una bomba peristáltica. El caudal del conducto de residuos se calculó como la suma de los caudales desde el conducto de la muestra y el conducto del tampón. Después de aplicar un volumen predeterminado de una muestra de sangre entera, se detuvo la adición de solución tampón a la rejilla del filtro. Debido al drenaje continuo del tampón por el conducto de residuos, el volumen de líquido en el elemento de filtro también disminuyó. El drenaje se detuvo en un volumen de aproximadamente 1-3 ml de suspensión celular que quedaba en el elemento de filtro. Después, la suspensión de células retenidas se pipeteó en un tubo de reacción. Para asegurar que todas las células en el dispositivo de filtro se transfirieron a la cámara de incubación, la cara interior del elemento de filtro se lavó cinco veces con 2 ml de PBS y después se pipeteó al tubo. El tubo se centrifugó a 800 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante de 9 ml se descartó y el sedimento celular con el volumen residual se resuspendió en 1 ml de PBS para su posterior transferencia a un portaobjetos de hidrogel.

#### Ejemplo 4

##### Derivación de un portaobjetos recubierto con hidrogel para planificación

Un portaobjetos con hidrogel de policarboxilato pre-activado (SL-HCX-5, XanTec Bioanalytics GmbH, Dusseldorf, Alemania) se cubrió con 20  $\mu$ l de una solución de anticuerpos anti-EpCAM/Trop-1 (AF960; RnD Systems, Minneapolis, EE.UU.). Antes de acoplamiento, el anticuerpo se dializó frente a una solución de acetato sódico 5 mM (pH 5,0). La solución de anticuerpo se secó en condiciones ambientales (temperatura ambiente y humedad relativa de 50-75 %), y la solución se incubó adicionalmente durante 20 minutos adicionales en dichas condiciones después del secado. En la siguiente etapa, todo el portaobjetos se colocó en un plato Petri y se cubrió con una solución 1 M de etanolamina a pH 8,5, en agitación suave durante 20 minutos. Se llevaron a cabo dos etapas de lavado durante 10 minutos cada una con agitación en la placa Petri utilizando solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar la etanolamina residual. Para el almacenamiento posterior, el portaobjetos se aclaró con agua destilada y se secó en una fuerte corriente de nitrógeno. Los portaobjetos preparados de esta manera estaban listos para la incubación con las suspensiones de células derivadas de la sangre obtenidos a partir de los ejemplos 1-3 que contenían las células MDA-468.

Como alternativa, a fin de proporcionar un portaobjetos recubierto con hidrogel para panning con un fondo particularmente bajo de células no cancerosas unidas inespecíficamente (por ejemplo, leucocitos de la sangre), un portaobjetos de hidrogel (SL-HC-5, XanTec Bioanalytics GmbH, Dusseldorf, Alemania) se colocó en una placa Petri o una gradilla de portaobjetos adecuada. Una solución de activación de MES 0,5 M, NHS 0,05 M con 0,01 a 0,025 % (p / v) de EDC se preparó inmediatamente antes del uso. Los portaobjetos de hidrogel se cubrieron con esta solución y se incubaron durante 5 minutos con agitación suave seguido de una incubación en ácido acético 2 mM durante al menos 30 segundos. A continuación, los portaobjetos se aclararon con agua destilada y se secaron en una fuerte corriente de nitrógeno o mediante centrifugación. Los portaobjetos hechos de acuerdo con este procedimiento de activación tienen una menor cantidad de éster de succinimidilo reactivo formado en el hidrogel en comparación con los portaobjetos HCX mencionados anteriormente y, por lo tanto, una capacidad de inmovilización inferior para las biomoléculas (por ejemplo, anticuerpos) que disminuye el fondo de los leucocitos unidos no específicamente durante la incubación. La modificación del hidrogel con anticuerpos puede realizarse como se ha indicado anteriormente en relación con el portaobjetos SL-HCX-5.

#### Ejemplo 5

##### Incubación de las células tumorales en las superficies de hidrogel

2 ml de la suspensión celular MDA-468 obtenida en el Ejemplo 3 anterior se transfirieron a continuación a la cámara de incubación de un sistema cito (Hettich AG, Alemania) con un portaobjetos recubierto con anticuerpo (SL-HCX-5, XanTec bioanalytics, Dusseldorf, Alemania) ya montado en el agitador de la plataforma oscilante del cito-sistema A (Heidolph Duomax 1030) con un ángulo de inclinación de 5° se ajustó a 2 ciclos / min. Las células se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se descartó el sobrenadante. En la siguiente etapa de lavado, se pipetearon 2 ml de PBS en la cámara de incubación. Después de la incubación durante 4 horas a temperatura ambiente, el tampón de PBS se desechó y el lavado se repitió una vez.

#### Ejemplo 6

##### Determinación de la tasa de recuperación después de tamizar



15 ml de sangre extraída de un voluntario sano como se ha descrito en el ejemplo 1 se dividieron en alícuotas de 5 ml. 110 (+/-2) células MDA-468 se enriquecieron en cada alícuota. El tamizado se llevó a cabo con cada una de las tres alícuotas como se describe en el ejemplo 3. Después del tamizado, un volumen residual de aproximadamente 2 ml de suspensión de células se dejó la rejilla del filtro. La rejilla del filtro que contiene la suspensión celular se retiró después cuidadosamente del vaso de precipitados y se transfirió a un sistema cito-spin (Hettich) que se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un portaobjetos de vidrio de supercongelación, de modo que las aberturas de la rejilla del filtro estaba orientadas en la dirección del portaobjetos de vidrio. La detección de células tumorales preteñidas se llevó a cabo mediante microscopia de fluorescencia de forma manual y automática (. Genetix Ltd. New Milton, Hampshire, Reino Unido. Se alcanzaron tasas de recuperación de 99 a 100 % (véase la tabla 1 a continuación).

Tabla 1: Tasa de recuperación tras el tamizado

	Número de células (recuento manual)	Número de células (recuento automático)
Alícuota 1	109	111
Alícuota 2	110	111
Alícuota 3	109	109

### Ejemplo 7

#### 15 Tasa de recuperación en la separación celular por afinidad con el portaobjetos de hidrogel modificado con anticuerpo

Se extrajeron 75 ml de sangre entera de un voluntario sano como se ha descrito en el ejemplo 1, y la muestra completa se sometió a la etapa de tamizado descrita en el ejemplo 3. Después de tamizar un volumen residual de aproximadamente 3 ml de suspensión de células quedó en la rejilla del filtro. La suspensión de células se diluyó hasta un volumen de 30 ml con PBS, y 14 partes alícuotas de 2 ml se pipetearon en tubos de cytospin (Hettich) que se habían preparado con portaobjetos de HC-hidrogel recubiertos con anticuerpo en lugar de portaobjetos de vidrio esmerilado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Inmediatamente después de la transferencia de las suspensiones celulares a los tubos cytospin, 120 (+/- 2) células MDA-468 previamente teñidas con DAPI se enriquecieron en las alícuotas. La incubación se llevó a cabo en un agitador de plataforma oscilante (Heidolph Duomax 1.030) a una velocidad de 2 ciclos por minuto a temperatura ambiente. Los recuentos celulares se determinaron después de 30, 60, 120, 180, 240, 300, y 360 minutos de incubación sobre la superficie de hidrogel por el recuento celular manual en un microscopio de fluorescencia (Leica DMLB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) para células MDA-468 previamente teñidas con DAPI. Los recuentos de células medidas en muestras paralelas se representan en la siguiente tabla 2. Una evolución en el tiempo de las tasas de recuperación se muestra en la fig. 6.

Tabla 2: Tasa de recuperación después de la separación de los portaobjetos de hidrogel

Tiempo (min)	Recuento 1	Recuento 2	Valor medio (%)
30	20	15	14,53
60	47	52	41,25
120	78	67	60,42
180	95	108	84,58
240	117	111	95
300	121	118	99,58
360	123	116	99,58

### Ejemplo 8

#### Detección de células MDA-468 mediante FISH e inmunocitoquímica

Células MDA-468 que se han aislado mediante el uso de un portaobjetos de hidrogel como se describe en el ejemplo 5 se detectaron mediante un protocolo combinado para FISH e inmunocitoquímica. Este enfoque se centró en la detección de aberraciones cromosómicas y la expresión génica específica de tumor. Para la detección de amplificaciones génicas del gen EGFR mediante FISH, se prepararon sondas complementarias a la secuencia del gen EGFR a partir de ADN de BAC (clones RP5-10191 E12) con el uso de del kit de aislamiento de construcciones grandes de ADN (Qiagen, Alemania) y BioPrime® Total Genomic Labelling System (Gibco Invitrogen, UK) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

Las células MDA-468 se fijaron en portaobjetos de hidrogel en la cámara de incubación de un sistema cito (Hettich AG, Alemania) (en etanol helado al 75 % durante 2 minutos y se pretrataron con 100 µg/ml de ARNasa A durante 40 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se trataron en 1x tampón de citrato (pH 6,0, Dako, Dinamarca) durante 3 minutos a 120 ° C. Las células se fijaron de nuevo en 1 % de formaldehído en 1 x PBS durante 10 minutos y se deshidrataron en una serie de alcoholes. Las células secadas al aire se desnaturalizaron en tampón de desnaturalización (70 % de formamida, 0,6 x SSC, pH 7,4) durante 5 minutos a 73 ° C y se deshidrataron en una serie de alcoholes. 1 µl de ADN Cot Humano (Roche, Alemania), 0,5 µl de CEP7 Spectrum Aqua (Abbott Molecular) como sonda de referencia y 2 µl de sonda marcada con naranja del espectro para el gen EGFR humano en suspensión en 6,5 µl de tampón de hibridación (Abbott Molecular) se aplicaron en la parte superior del portaobjetos. Las muestras se desnaturalizaron durante 3 minutos a 95 ° C y se hibridaron durante al menos 16 horas a 37 ° C. Después, se lavaron 2 minutos en 2 x tampón SSC / NP-40 a 72 ° C y a temperatura ambiente (TA). Al día siguiente, el portaobjetos se lavó 3 veces durante 10 minutos en 50 % de formamida / 2 x tampón SSC, 2 veces durante 10 minutos en 2 x tampón SSC y 5 minutos en 0,1 x SSC / 0,1% de tampón Tween-20 a 46 ° C. Las células se permeabilizaron 3 veces durante 3 minutos en 1 x TBST. La unión no específica se redujo en 20 minutos de incubación en suero de bloqueo (Dako, Dinamarca).

Los anticuerpos monoclonales de ratón primarios contra pan-citoqueratina (A45, Mikromet, Alemania) o vimentina (DB Pharmingen™) diluido a 1: 100 o 1: 200, respectivamente, en diluyente de anticuerpos DakoREAL™ (Dako, Dinamarca) se incubaron con las células durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se incubó con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Alexa-488 (MiBioTech) diluido a 1: 200 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Por último, el portaobjetos se lavó 2 veces durante 3 minutos con 1xTBST y una vez durante 3 minutos con 1 x PBS, y se sometió a contratinción con medio de montaje Vectashield® con DAPI (Vector Laboratories Inc.).

Las células positivas a citoqueratina o a vimentina, que no muestran morfología apoptótica o necrótica, se analizaron según su dosis de genes EGFR. Además, se puntuó un total de 500 positivas a citoqueratina o a vimentina conforme a la frecuencia de las ganancias de EGFR y se compararon con la puntuación obtenida en 3 voluntarios sanos. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia (MetaSystem GmbH, Zeiss, Alemania). Para cada célula, la relación entre la sonda objetivo y de referencia se contó y los recuentos medios de 20 células se tomaron para la evaluación, que contiene 2 señales mínimas de referencia para la sonda CEP7. Se pudo demostrar que las células MDA-468 albergaban de 3 a 7 puntos para la sonda de EGFR marcada con fluoróforo y simultáneamente 2 puntos para la sonda de referencia CEP7.

## Ejemplo 9

### Amplificación del genoma entero

En un enfoque alternativo, las células MDA-468 en una superficie de hidrogel se detectaron mediante PCR. En una primera etapa, las células MDA-468 en la superficie de hidrogel se enfriaron a 0 ° C en hielo, se cubrieron con 9 µl de tampón de la muestra GenomiPhi (GE Healthcare). Se realizó una transferencia de una célula a tubos de reacción de PCR utilizando el micromanipulador CellTram vario equipado con el capilar a medida Kappa MFKII junto con un TransferMan NK 2 (Eppendorf) unido al microscopio invertido Axiovert 200 (Zeiss). Los tubos se mantuvieron a -80 ° C durante un tiempo mínimo de 15 minutos. Después de descongelar, a cada tubo se añadió 1 µl de una solución de 1:10 de proteasa (Qiagen). Después, las células se incubaron en un termociclador a 50 ° C (15 minutos) para la digestión y a 70 ° C (15 minutos) para la inactivación enzimática. Para amplificar el genoma de las células tumorales, se realizó la amplificación de todo el genoma (WGA) utilizando el Kit GenomiPhi (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante. Después de la reacción WGA, los dNTP y el cebador hexámero aleatorio restante se retiraron del producto utilizando el kit NucleoSEQ (Macherey-Nagel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras preparadas de esta manera se utilizaron en la amplificación de las secuencias diana diferentes descritas a continuación.

## Ejemplo 10

### Análisis de desequilibrio alélico (DA)

El análisis de desequilibrio alélico (DA) se basa en la detección de LAS secuencias polimórficas de longitud que comprenden simples repeticiones de secuencia de citidina y adenosina (microsatélites). Un desequilibrio alélico se determina si la relación de las áreas de los picos en una evaluación electroforética capilar entre el alelo 1 y el alelo 2, que difieren en el número de repeticiones de CA excede 1,3 o es inferior a 0,7. Las reacciones de PCR se realizaron

5 en un Mastercycler Gradient (Eppendorf) en un volumen de reacción total de 10 µl, que contiene 20 ng de ADN molde a partir de las células tumorales MDA-468 (ADN genómico o producto de WGA del ejemplo 9), los cebadores representados en las SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2 (SEC ID N° 1 CA-SSR1\_para: [6-FAM]GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC; SEC ID N° 2, CA-SSR1\_Rev: TTCTGTCTGCACACTTGGCAC), desoxinucleótido trifosfato, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), TMAC, MgCl<sub>2</sub> en tampón AmpliTaq Gold (para LAS concentraciones véase la tabla 3. Se utilizaron las siguientes condiciones de ciclado para todos los cebadores de microsatélites: etapa de desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos de hibridación a 56 °C, 30 segundos a 72 °C y una etapa de extensión final de 7 minutos a 72 °C. Cada amplificación por PCR se monitorizó mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 2,5 %. Se multiplexaron los pares de cebadores. Todas las reacciones de PCR se realizaron en tripletes independientes.

Tabla 3: Muestras de PCR muestras del microsatélite-PCR-Tamizado

		Muestras: 1	Muestras: 10
Reactivos	Conc.	Vol. (µl)	Volumen (µl)
Tampón PCR Gold	10x	1	10
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,8	8
dNTP	2,5 mM	0,8	8
Cebador directo	10 µM	0,1	1
Cebador inverso	10 µM	0,1	1
AmpliTaq Gold	5 U/pl	0,1	1
ADN	5 ng/µl	4	40
TMAC	2mM	0,5	5
H <sub>2</sub> O	añadir 30 µl	2,6	26
TOTAL		10	100

15 Los productos de PCR se diluyeron 5 veces en agua de grado para PCR (Merck), y 1 µl de cada muestra diluida se mezcló con 0,15 µl de patrón de tamaño GeneScan-500-Rox (Applied Biosystems) y 20 µl de HIDI formamida. Las mezclas se desnaturalizaron a 95 °C durante 2 minutos y se ultraenfriaron en hielo. Los fragmentos se separaron mediante electroforesis capilar, (CE) y se detectaron mediante fluorescencia inducida por láser en un analizador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se detectaron dos fragmentos en el caso de heterocigosidad, el caso informativo, que difieren en longitud desde 2 a 10 pares de bases. El estado de DA se determinó mediante la relación entre el alelo 1 y 2. En el caso de homocigosidad solo se midió 1 fragmento y no se pudo obtener información sobre el estado de DA de la célula.

### Ejemplo 11

#### PCR en tiempo real

25 Un ensayo de PCR en tiempo real con verde SYBR como indicador se utilizó para detectar células tumorales MDA-468 a través de sus dosis génicas más elevadas de para EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Para la normalización de las dosis de genes, el gen doméstico de SOD2 (superóxido dismutasa 2) se determinó simultáneamente. Para la curva de la concentración patrón para medir las concentraciones de los productos de PCR, se utilizó ADN de leucocitos preamplificado mediante WGSa como molde. Todas las muestras se midieron en tripletes. Para la amplificación y la recopilación de datos se utilizó el Mel astercycler eppgradient S-realplex (Eppendorf). Todas las reacciones se llevaron a cabo en placas de PCR TWINTEC 96 (Eppendorf) en un volumen total de 15 µl y se sellaron con tapas adhesivas ópticas (Applied Biosystems). Para los ensayos de verde SYBR se utilizó el Kit verde QuantiTect SYBR (Qiagen) con 1 µM de cada uno de los cebadores proporcionados en la SEC ID N° 3-6. El protocolo de amplificación estándar consiste en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 58 °C, durante 30 segundos y 68 °C durante 30 segundos. Las mediciones de fluorescencia se tomaron al final de las fases de elongación a 68 °C. Un paso curva de fusión se agregó como etapa final en cada ciclo para confirmar la especificidad de la reacción PCR. Para cada muestra se usaron 10 ng de ADN (2 µ 3,5 ng / l) como molde de partida. Todas las muestras y controles se midieron en tripletes. Durante la fase de evaluación cada reacción de amplificación de ambos tipos de ensayo se comprobó para determinar la ausencia de productos de PCR no específicos mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida nativa.

Los datos en bruto se analizaron con el software realplex Ver.2. Para cada par de cebadores se realizó una curva de la concentración patrón en cada ciclo mediante el uso de una cantidad del molde de 10 ng, 2,5 ng, 0,625 ng y 0,156 ng. Se utilizó ADN de leucocitos o el producto WGA dependiendo del tipo de muestras que iban a medirse. Los puntos de intersección de las curvas de amplificación y el umbral (valor CT) eran dependientes de la cantidad de ADN molde dado en sus regiones exponenciales. Usando los ensayos con cantidad conocida del ADN molde se generaron líneas de calibración (CT frente a Log2 de la cantidad de ADN molde dada) y se calcularon sus ecuaciones lineales. Para determinar las cantidades de ADN de las muestras desconocidas, se calculó el promedio para cada triplicado de los valores CT. Después se calculó el cociente de la diana contra LA referencia, dando la dosis génica relativa de EGFR contra LINE1. Las desviaciones estándar se calcularon utilizando el procedimiento de CV como se describe en Michael Walter Pfaffl (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, Biospektrum BIoSpektrum, 1/04, 10. Jahrgang, 92-95. Las células cancerosas se detectaron entre las células positivas para citoqueratina –como células que muestran dosis génicas para EGFR mayores de 2, lo que indica amplificación génica.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

15 <110> Universitaetsklinikum Hamburg-Eppendorf

<120> Procedimiento para aislar células diana

<130> P 84891

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Cebador oligonucleotídico

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1). (1)

<223> marcador 6-Fam en el extremo 5'

30 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> marcador 6-FAM en el extremo 5'

<400> 1

35 22 gttgaagaa ttgagccaa cc

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> Cebador oligonucleotídico

<400> 2

21      tctgtctgc acacttgca c  
<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
5      <213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico  
<400> 3  
20      tctgcattcc tgccgagtc  
10      <210> 4  
<211> 21  
<21-2> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
15      <223> Cebador oligonucleotídico  
<400> 4  
21      gcagtctcea ctccatgctc a  
<210> 5  
<211> 20  
20      <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico  
<400> 5  
25      20      aaagccgctc aactacatg  
<210> 6  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial  
30      <220>  
<223> Cebador oligonucleotídico  
<400> 6  
21      tgcttgaat gcgtcccaga g

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de enriquecimiento y / o aislamiento de las células diana en una muestra, en el que la muestra comprende glóbulos rojos y / o plaquetas, que comprende:
- (a) filtrar la muestra a través de un elemento de filtro que tiene poros con un tamaño de entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ ,
- 5 (b) poner en contacto las células retenidas por el elemento de filtro en la etapa (a) con una superficie de separación, en el que dicha superficie de separación es un recubrimiento de hidrogel sobre un material soporte y comprende moléculas de afinidad que se unen selectivamente a la célula diana;
- (c) incubar las células y la superficie de separación en condiciones que permitan la unión de las moléculas de afinidad a las células diana; y
- 10 (d) separar la superficie de separación de cualquier célula no unida y el material.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tamaño de poro del elemento de filtro está entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ .
3. Procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el elemento de filtro es una tela tejida.
4. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células diana son células tumorales.
5. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra comprende sangre entera, orina, derrame pleural, ascitis, lavado broncoalveolar, aspirado de pezón de la glándula mamaria femenina o médula ósea.
- 15 6. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el material de soporte es un portaobjetos, una perla o una resina de cromatografía.
7. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la molécula de afinidad es un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, un ligando, una lectina o un receptor o un aptámero.
- 20 8. Procedimiento de la reivindicación 7, en el que la molécula de afinidad es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-EpCAM, un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CK20, un anticuerpo anti-MUC1, un anticuerpo anti-MUC2, o un fragmento de unión al antígeno.
9. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la muestra se diluye con un tampón adecuado antes o simultáneamente con la aplicación de la muestra al elemento de filtro.
- 25 10. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la incubación en la etapa (c) incluye la agitación de la superficie de separación.
11. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la etapa (d) incluye el lavado de la superficie de separación con un tampón de lavado.
- 30 12. Procedimiento de detección y/o cuantificación de las células diana en una muestra, en el que la muestra comprende glóbulos rojos y / o plaquetas, comprendiendo dicho procedimiento
- (a) realizar un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11; y
- b) detectar y / o cuantificar las células diana.
13. Procedimiento de la reivindicación 12, en el que la detección y / o cuantificación se realiza mediante el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos marcados de manera detectable o mediante sondas de ADN marcadas de forma detectable.
- 35 14. Procedimiento de la reivindicación 12, en el que la detección y / o cuantificación implica una PCR, preferentemente una PCR en tiempo real.
15. Procedimiento de la reivindicación 12, en el que la detección de implica técnicas fotoacústicas de dos colores.

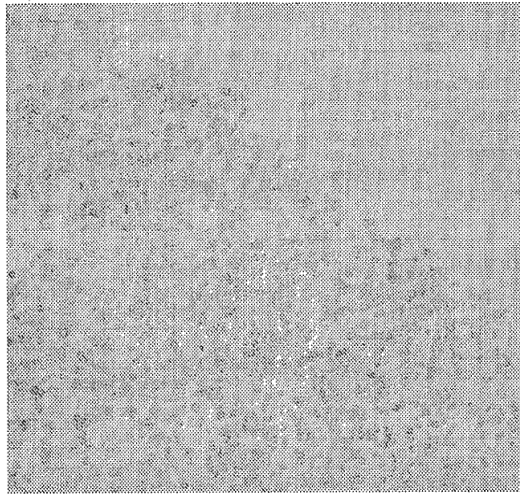


Fig. 1

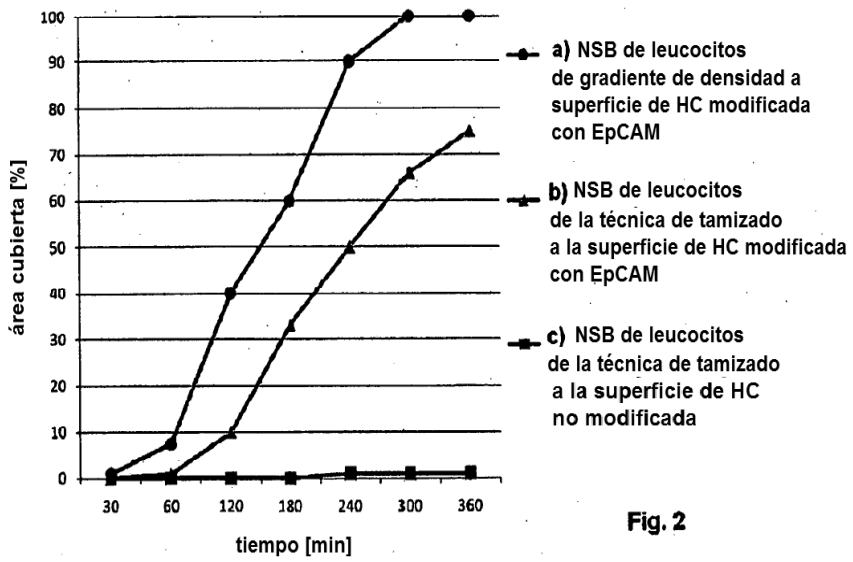


Fig. 2

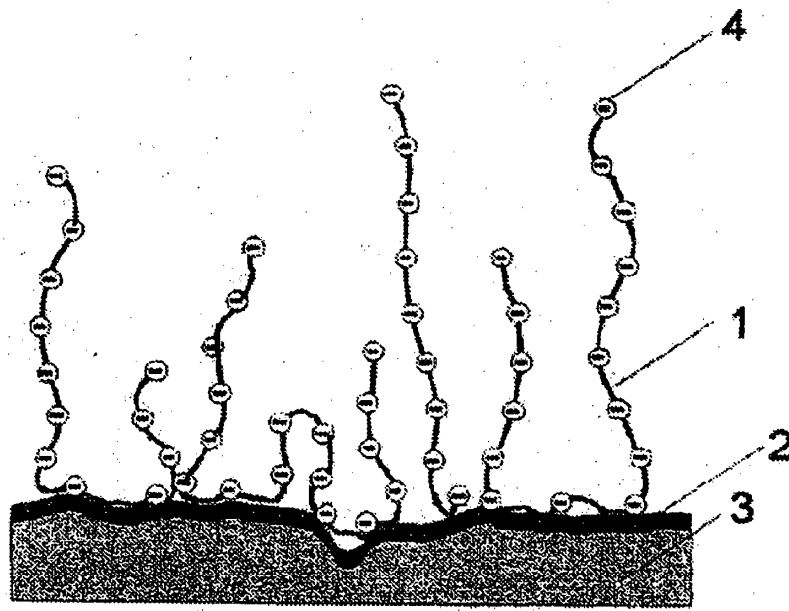


Fig. 3



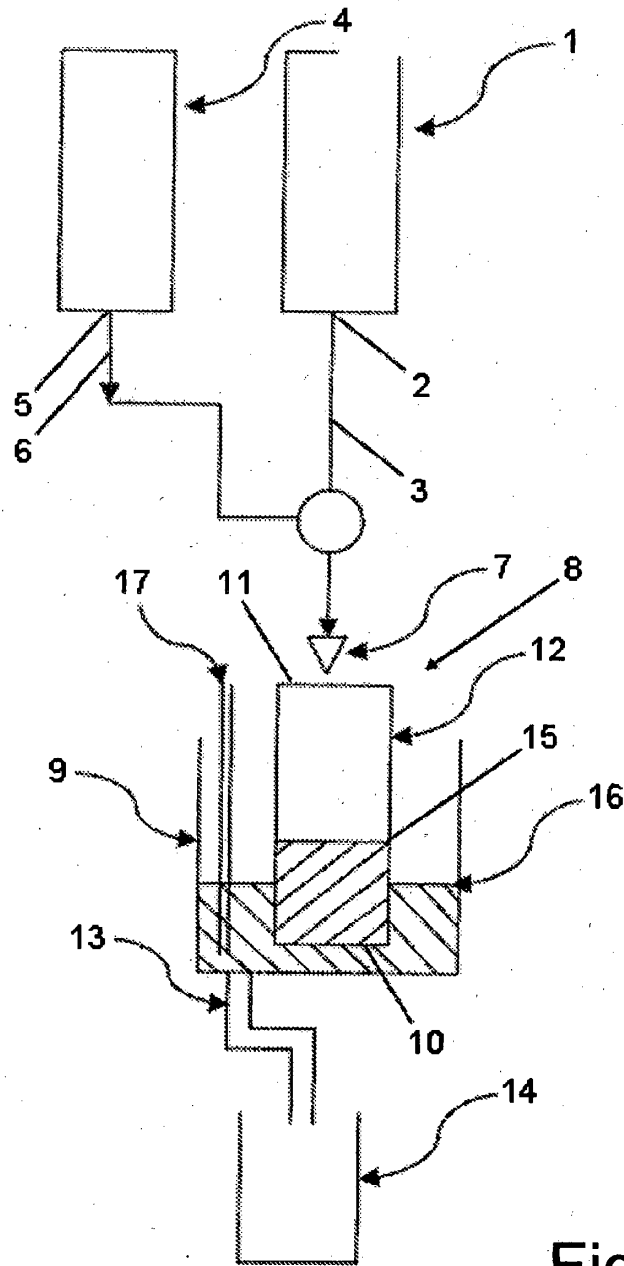


Fig. 4

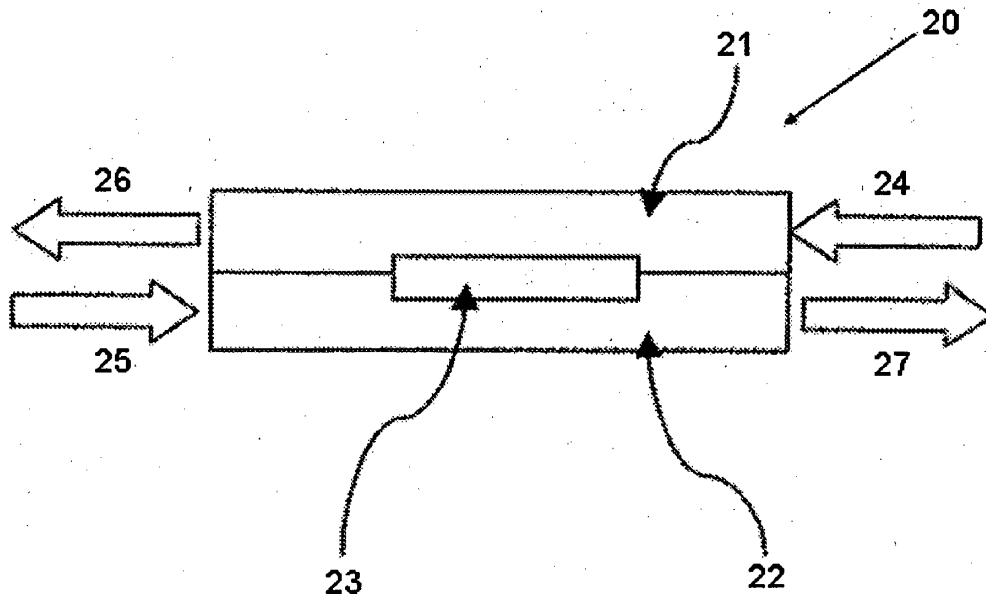


Fig. 5

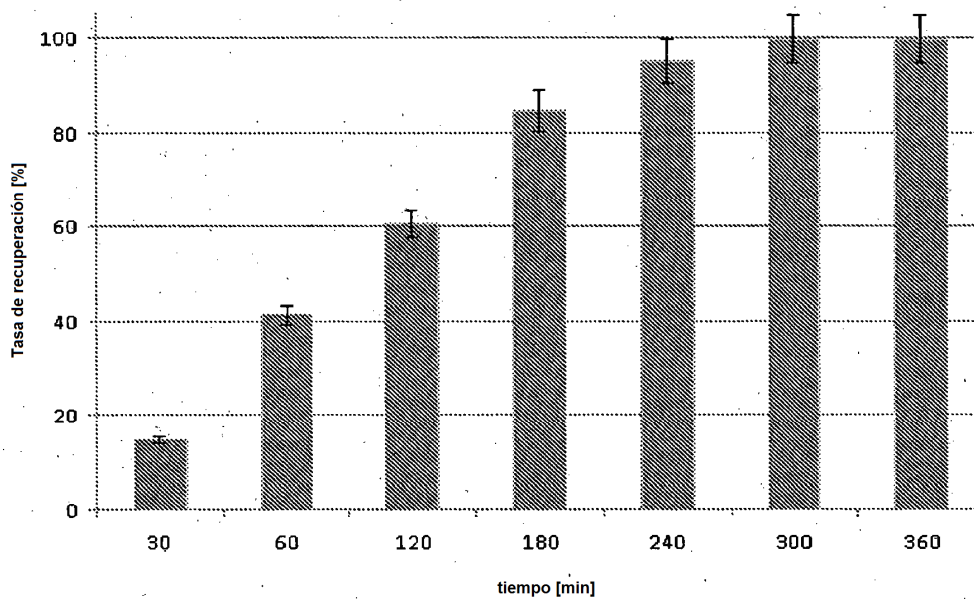


FIG. 6

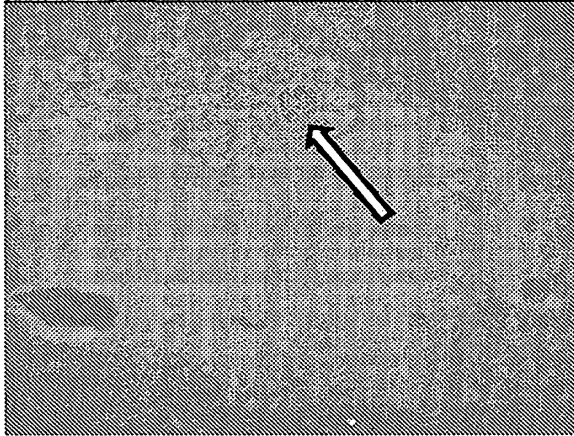


Fig. 7A

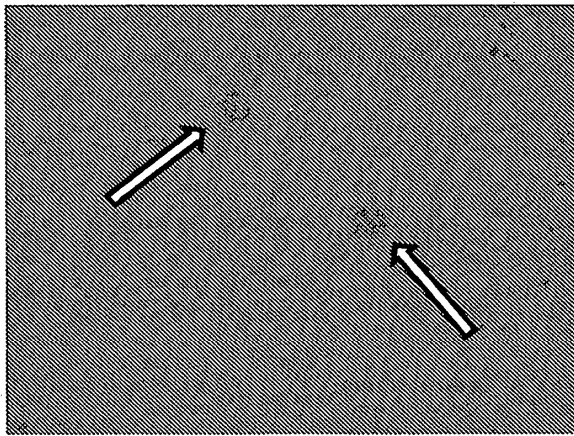


Fig. 7B

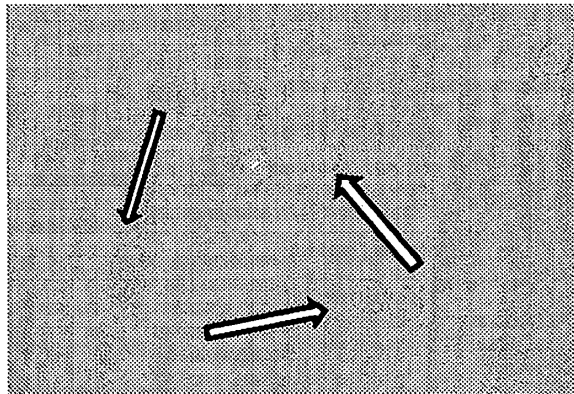


Fig. 7C

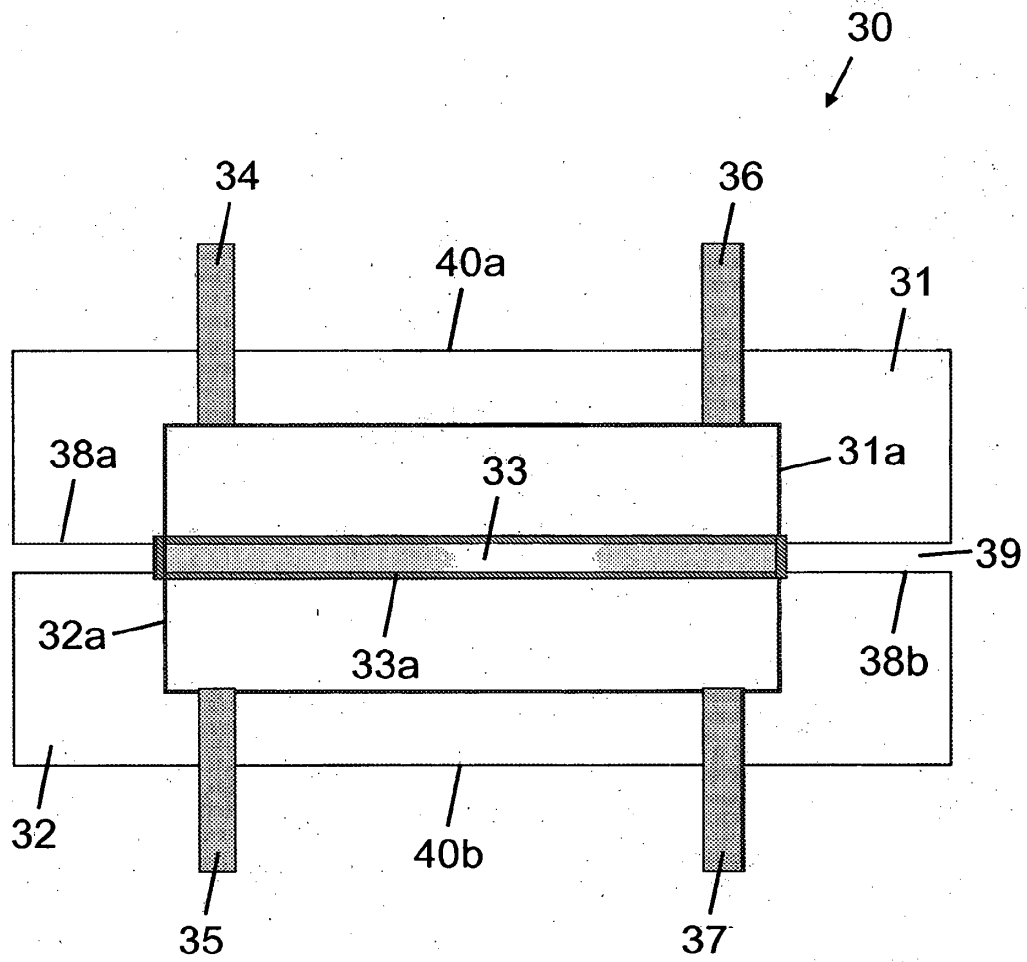


Fig. 8

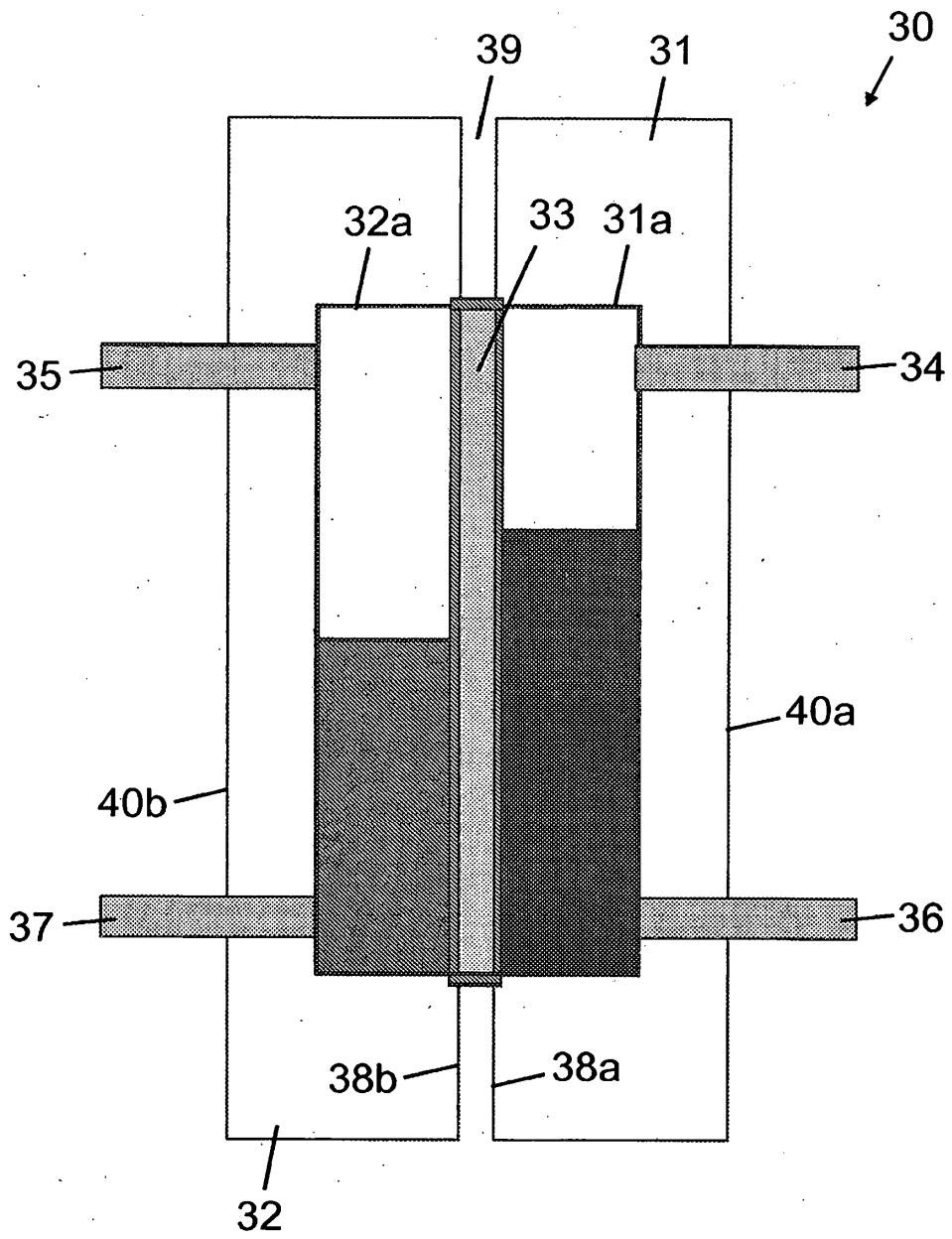


Fig. 9a

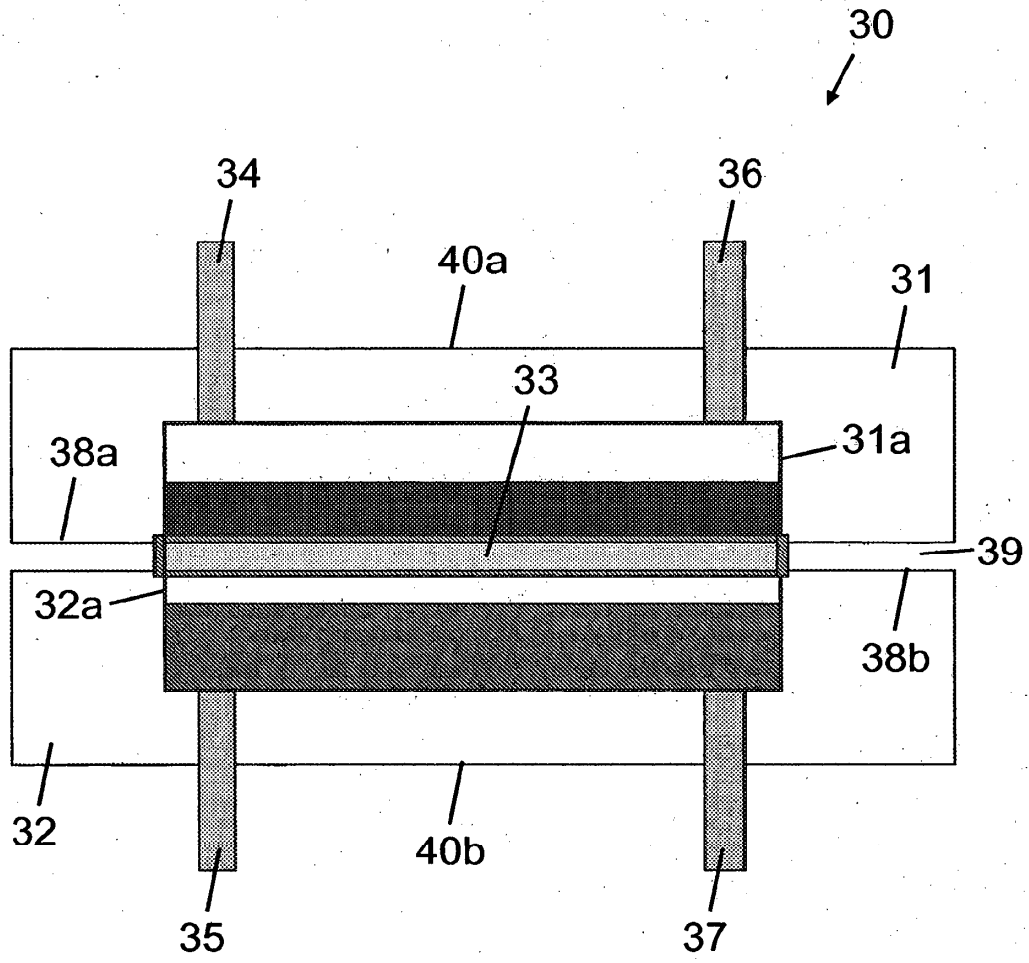


Fig. 9b

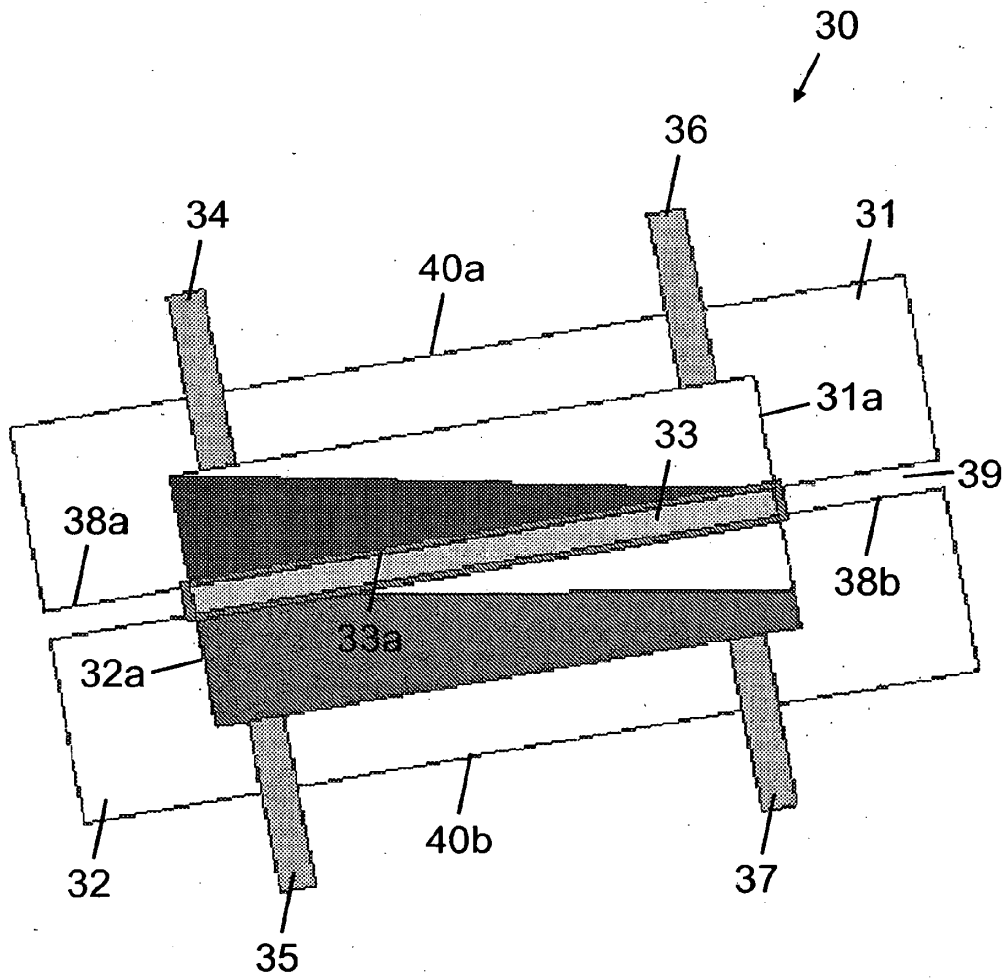


Fig. 9c

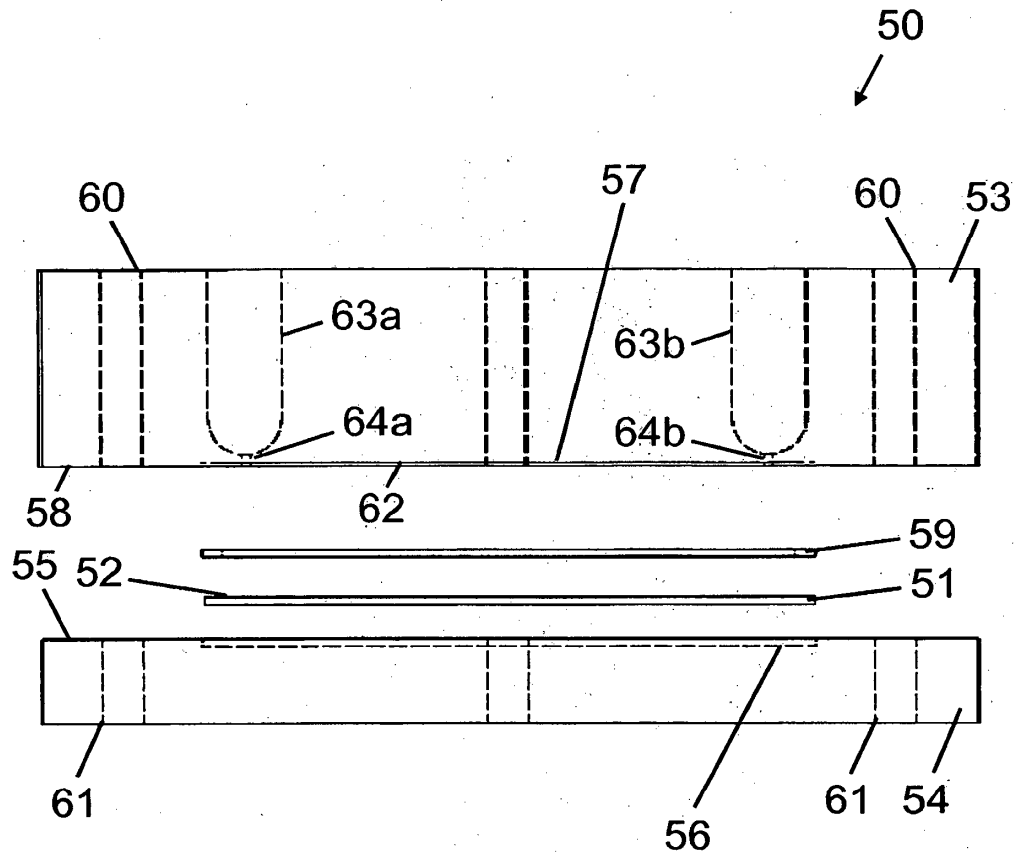


Fig. 10



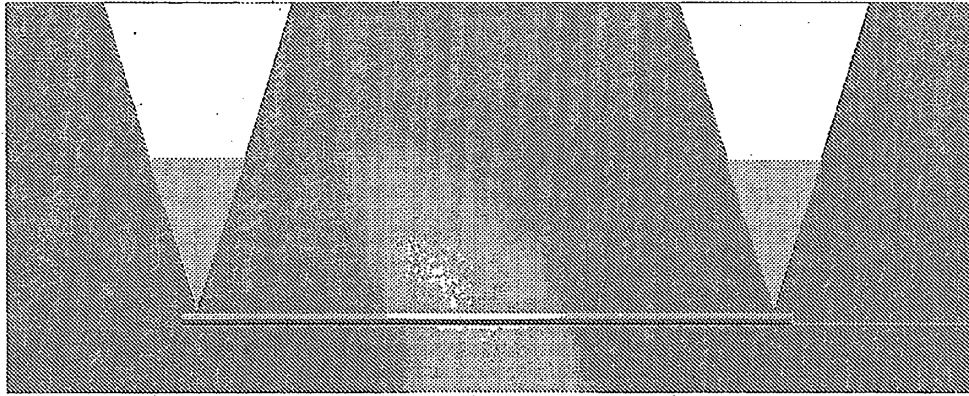


Fig. 11a

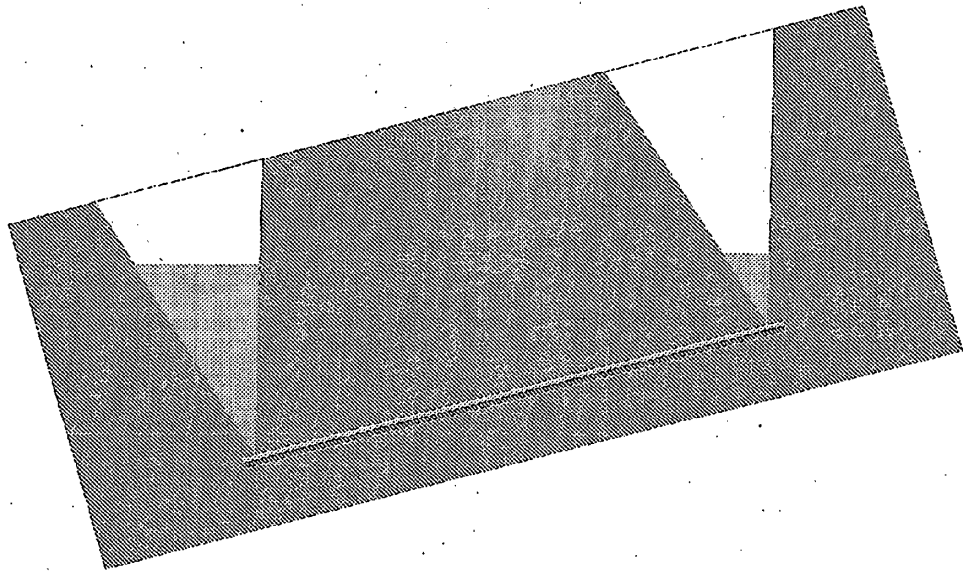


Fig. 11b