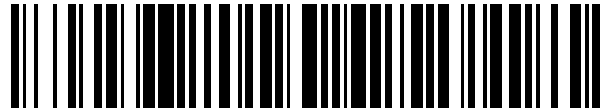


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 914**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10756790 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2411808**

54 Título: **Dispositivos y métodos de captura y análisis de células**

30 Prioridad:

24.03.2009 US 163009 P

20.08.2009 US 235615 P

27.01.2010 US 298871 P

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

29.01.2016

73 Titular/es:

BIOCEPT, INC. (100.0%)

5810 Nancy Ridge Drive

San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:

MIKOLAJCZYK, STEPHEN;

PIRCHER, TONY;

TSINBERG, PAVEL y

BISCHOFF, FARIDEH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 557 914 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

Dispositivos y métodos de captura y análisis de células

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a dispositivos de microcanales para capturar dianas, tales como células y moléculas de interés de soluciones, así como al análisis posterior a la captura de las células circulantes. En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a métodos y dispositivos para capturar células diana (por ejemplo, células tumorales circulantes) a partir de fluidos fisiológicos, y análisis de los mismos.

Antecedentes de la invención

Aislamiento de las células o moléculas diana a partir de muestras heterogéneas sigue siendo de interés prominente para aplicaciones de investigación, así como aplicaciones médicas, tales como diagnósticas y terapéuticas. En particular, la separación de tipos de células inusuales de tejidos fisiológicos y fluidos corporales obvia la necesidad de obtener muestras de tejidos grandes y evita los riesgos asociados con los procedimientos requeridos para obtener dichas muestras. Por ejemplo, el aislamiento de células fetales de muestras de sangre materna para pruebas genéticas evita los riesgos asociados con la amniocentesis o la muestra de vellosidades crónicas. El aislamiento de células tumorales circulantes de un paciente permitiría al clínico evaluar el cáncer y controlar los cambios patológicos en el tumor del paciente, así como evaluar la eficacia de cualquier tratamiento farmacológico en curso sin llevar a cabo procedimientos de biopsia invasivos.

Los métodos actuales para la separación de moléculas y/o células biológicas de muestras heterogéneas normalmente implicarán el uso de una pareja de unión de alta afinidad (por ejemplo, un anticuerpo o antígeno) acoplada a un soporte sólido. La muestra heterogénea se pasa sobre el soporte sólido y las moléculas o células biológicas diana de interés se unen a la pareja de unión y quedan retenidas en el soporte sólido. Las moléculas o células unidas de interés pueden analizarse después para determinar la presencia de información proteómica y genómica molecular.

Estos abordajes actuales sufren varias dificultades técnicas, una de las cuales es el problema de la unión inespecífica. Para minimizar la unión inespecífica se requiere una o más etapas de lavado para eliminar otras moléculas y/o células que se unen al soporte sólido o a la pareja de unión. Además, el posterior análisis in situ de las células en el canal mediante procedimientos de tinción e hibridación puede someter a las células a condiciones duras y desnaturalizantes. Estos procedimientos de lavado y análisis pueden comprometer la captura inicial de la molécula o célula deseada sometiendo la pareja de unión a condiciones que pueden hacer que la pareja de unión se degrade, pierda parte de su estructura conformacional o se desprende del soporte sólido.

Todavía más, los procedimientos existentes para analizar las células circulantes (por ejemplo, capturadas de una muestra de paciente) para neoplasias malignas, tales como tinción de células para detectar citoqueratina (CK), tienen limitaciones como marcadores para identificar y/o evaluar las células tumorales circulantes.

Por tanto, existe la necesidad en la técnica de métodos y dispositivos adicionales para aislar moléculas y/o células biológicas de interés de muestras, así como métodos para posteriores análisis de dianas capturadas, tal como análisis de células tumorales circulantes capturadas.

El documento US 2006/0160243 A1 divulga un dispositivo de microcanales para separar o aislar células de muestras de líquido. El microcanal lo proporcionan agentes secuestrantes inmovilizados sobre un soporte para capturar las moléculas diana.

El documento WO 03/050537 A1 divulga un ensayo diagnóstico de flujo continuo que tiene una etapa de preincubación en la que se forman complejos entre un analito de detección y un reactivo antes de la filtración de los complejos a través de una membrana y la posterior captura de los complejos mediante un analito de captura dirigido al reactivo.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para capturar y/o analizar dianas biológicas a partir de muestras de fluidos, tal como se define en las reivindicaciones. En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para la captura de células tumorales circulantes a partir de muestras biológicas, para la evaluación de la enfermedad de un paciente de cáncer. En estas y otras realizaciones, la invención proporciona métodos para identificar y/o evaluar la malignidad de las células circulantes sin o de forma independiente del estado de CK.

En un aspecto, la invención proporciona un método para la captura de dianas biológicas en la solución. En este aspecto, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el marcaje previo o la mezcla previa de una muestra que contiene una diana (por ejemplo, una célula) de interés con una pareja de unión que se une

específicamente a la célula, aumenta la captura de dichas dianas en un dispositivo de microcanales.

En ciertas realizaciones, el dispositivo de la presente divulgación comprende un microcanal y una mezcla de carga. El microcanal puede comprender una población de postes distribuidos sobre la superficie del microcanal en el patrón aleatorio. La mezcla de carga puede comprender una muestra biológica sospechosa de contener una diana, tal como una célula diana, y comprende también una primera entidad de unión. La primera entidad de unión se une específicamente a la diana (por ejemplo, una entidad diana en una célula diana). La superficie del microcanal está recubierta con una segunda entidad de unión que se une específicamente, directa o indirectamente, a la primera entidad de unión. En algunas realizaciones, la mezcla de carga comprende además una tercera entidad de unión conjugada con una entidad detectable o capturable. Por ejemplo, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo primario, la tercera entidad de unión puede ser un anticuerpo secundario que se une específicamente al anticuerpo primario, y la segunda entidad de unión se une específicamente directa o indirectamente al anticuerpo secundario. En una realización, la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario biotinilado que se une específicamente a la primera entidad de unión y la entidad segunda unión es avidina. El anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo intacto o cualquier fragmento de anticuerpo tal como Fab², Fab 'o Fab. Además esto puede incluir cualquiera de las formas modificadas mediante ingeniería genética o expresadas de un fragmento de anticuerpo, como el fragmento Fab monocatenario o el fragmento variable monocatenario.

La presente invención proporciona métodos para la captura y/o detección de una célula diana en una muestra biológica tal como se define en las reivindicaciones, incluyendo poblaciones de células inusuales como se describe en el presente documento. También se divulgan métodos comprenden poner en contacto una muestra biológica con una primera entidad de unión para formar una mezcla de precarga, en la que la primera entidad de unión se une específicamente a una entidad diana en la superficie de la célula diana; hacer pasar la mezcla de precarga a través de un microcanal, en el que la superficie del microcanal está recubierta con una segunda entidad de unión capaz de unirse específicamente a la primera entidad de unión; y detectar la presencia de la célula diana en la superficie del microcanal. La muestra biológica puede ser un tejido o fluido corporal fisiológico, tal como sangre, plasma, suero, médula ósea, semen, secreciones vaginales, orina, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, aspirados con aguja fina (AAF) o muestra de tejido de biopsia. En ciertas realizaciones, la célula diana es inusual y presente en una baja proporción en la muestra biológica. Los ejemplos de células diana que son inusuales en las muestras biológicas (por ejemplo, sangre) incluyen células tumorales circulantes (CTC) que se encuentran en las primeras etapas de un estado de enfermedad, tales como la Etapa 1 de la tumorigénesis, así como células infectadas por virus, bacterias u hongos.

En ciertas realizaciones, la célula diana es una célula cancerosa (por ejemplo, una célula tumoral circulante), tal como una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovarios, una célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer endometrial, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer renal, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de huesos, una célula de linfoma, una célula de melanoma y una célula de cáncer de piel que no es de melanoma. El tumor puede ser un tumor epitelial. En estas realizaciones, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo que se une específicamente a las células epiteliales circulantes. En una realización, la primera entidad de unión es un anticuerpo de molécula de adhesión epitelial celular (por ejemplo, EpCAM). En estas y otras realizaciones, la primera entidad de unión es un anticuerpo biotinilado y la segunda entidad de unión es avidina. En varias realizaciones, la invención implica cócteles de anticuerpos, como la primera entidad de unión, para capturar las células tumorales circulantes que exhiben una serie de características de células epiteliales, mesenquimatosas, madre o progenitoras.

En los métodos de la presente invención, la mezcla de precarga comprende adicionalmente una tercera entidad de unión. La primera entidad de unión es un anticuerpo primario, la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario marcado con biotina, digoxigenina, epítipo FLAG o polihistidina, y el anticuerpo secundario se une específicamente a la primera entidad de unión. Una segunda entidad de unión se une específicamente a la tercera entidad de unión a través del marcador. En ciertas realizaciones, la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario biotinilado que se une específicamente a la primera entidad de unión y la entidad segunda unión es avidina.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente, tras la captura celular, la reticulación de la célula diana unida a la superficie del microcanal. Los reactivos de reticulación incluyen reactivos de reticulación de proteínas, tal como un reactivo de reticulación de NHS homobifuncional hidrófilo. En ciertas realizaciones, las células capturadas pueden someterse a un análisis posterior en el microcanal o fuera de la captura después de la captura.

También se divulgan métodos para el análisis posterior a la captura de las células circulantes y, en particular, para analizar o evaluar la malignidad de las células circulantes. En general, la invención en este aspecto implica evaluar las células capturadas para determinar aneuploidía, Opcionalmente con evaluación de otros marcadores de malignidad, incluyendo mutaciones. El método generalmente no implica determinar la expresión de citoqueratina o es independiente de esta.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es una vista en perspectiva de una realización de un dispositivo de microcanales que comprende una región de recolección que contiene un poste en el microcanal.

La **Figura 2** es una captura de representación esquemática de una célula tumoral circulante (CTC) en un dispositivo de microcanales que se ha recubierto con un anticuerpo específico para un antígeno en la CTC. B designa biotina.

La **Figura 3** es una captura de representación esquemática de una célula tumoral circulante (CTC) en un dispositivo de microcanales, en el que la CTC se ha marcado previamente con un anticuerpo específico de un antígeno de CTC en un dispositivo de microcanales se ha recubierto con una proteína capaz de unir el anticuerpo específico de célula. B designa biotina.

La **Figura 4** es un gráfico que muestra el porcentaje de células T24 EpCAM positivas capturadas en un microcanal recubierto con anticuerpos frente a EpCAM (canal de EpCAM) o un microcanal recubierto con estreptavidina (Canal de Estrept.) a diferentes caudales. En el caso del canal de Estrept., las células T24 se marcaron previamente con un anticuerpo frente a EpCAM biotinilado antes del paso a canal de Estrept.

La **Figura 5** es un gráfico que muestra el porcentaje de células T24 previamente marcadas con EpCAM biotiniladas que se capturaron en un microcanal recubierto con estreptavidina en presencia de concentraciones diferentes de anticuerpo frente a EpCAM biotinilado. Una muestra de 250 μ l que contenía aproximadamente 200 células se aplicó al canal.

La **Figura 6** es un gráfico que muestra el porcentaje de células T24 previamente marcadas con EpCAM biotiniladas que se capturaron en un microcanal recubierto con estreptavidina en presencia de concentraciones diferentes de anticuerpo frente a EpCAM biotinilado. Una muestra de 2 ml que contenía aproximadamente 200 células se aplicó al canal.

La **Figura 7** es un gráfico que muestra la dilución del anticuerpo de captura de EpCAM que está recubierto sobre el microcanal en comparación con la captura de las células T24 como función de la misma mezcla de dilución usada para marcar previamente las células antes de la aplicación en el microcanal.

La **Figura 8** es un gráfico que representa el porcentaje de células T24 o SKOV capturadas en un microcanal recubierto con estreptavidina cuando se marca previamente con el anticuerpo Trop-1 biotinilado solo o en combinación con el anticuerpo Trop-2 biotinilado.

La **Figura 9** es un gráfico que representa la captura de células MDA-ND-231 en un microcanal recubierto con estreptavidina cuando se marcó previamente con el anticuerpo anti-EpCAM biotinilado solo o en combinación con una mezcla de anticuerpos de captura biotinilados.

La **Figura 10** es un gráfico que representa el porcentaje de células SKOV capturadas en un microcanal recubierto con estreptavidina cuando se marcó previamente con el anticuerpo primario biotinilado o una combinación de anticuerpo primario no biotinilado y anticuerpo secundario biotinilado.

La **Figura 11** muestra una serie de microfotografías de células capturadas en un microcanal recubierto que se sometieron después a lavados con una solución viscosa a diferentes caudales (20, 50 y 100 μ l/min).

La **Figura 12** muestra una serie de microfotografías de células capturadas en un microcanal recubierto. Las células quedaron expuestas a un reactivo de reticulación de proteína NHS homobifuncional antes de someterlas a lavados con una solución viscosa a caudales diferentes (20, 50 y 100 μ l/min).

La **Figura 13** es un gráfico que muestra el porcentaje de células capturadas en un microcanal recubierto en ausencia o presencia de un reactivo de reticulación de proteína NHS.

Figura 14 es un gráfico que muestra el porcentaje de células de cáncer de vejiga capturadas en un microcanal recubierto usando solamente EpCAM como anticuerpo de captura en comparación con el uso de una mezcla de anticuerpos. El gráfico también muestra la tinción de los tipos de células con anticuerpos anticitoqueratina y antivimentina.

La **Figura 15A** es un gráfico que muestra la captura de células SKOV por el anticuerpo frente a EpCAM en comparación con la captura por una mezcla de anticuerpos.

La **Figura 15B** muestra la tinción de las células SKOV después de la incubación con el anticuerpo frente a EpCAM o mezcla de anticuerpos y se detectó con anticuerpos secundarios anti-ratón marcados con fluorescencia. El análisis FACS de las mismas células muestra el número de antígenos de superficie marcados con anticuerpo anti-ratón secundario marcado.

La **Figura 16** es una imagen de células SKOV enriquecidas en sangre y capturadas en un microcanal usando una mezcla de anticuerpos primarios y anticuerpos anti-ratón secundarios biotinilados. Las células se tiñeron en el canal con neutravidina marcada con fluorescencia que se une fuertemente a biotina. La imagen muestra células SKOV teñidas de verde con neutravidina y los glóbulos blancos cercanos que no se tiñeron con neutravidina pero solo se tiñeron con DAPI para detectar el núcleo.

La **Figura 17** muestra la recuperación de Skbr3 en una muestra de sangre enriquecida con un número variable de células SKBr3. Los resultados muestran que el porcentaje de captura es independiente de la entrada de células.

Descripción detallada

La presente invención proporciona dispositivos y métodos para capturar y/o analizar dianas biológicas a partir de muestras de fluidos, tal como se define en las reivindicaciones. En diversas realizaciones, la invención proporciona métodos para la captura de células tumorales circulantes a partir de muestras biológicas, para la evaluación de la

enfermedad de un paciente de cáncer. En estas y otras realizaciones, la invención proporciona métodos para identificar y/o evaluar la malignidad de las células circulantes sin o de forma independiente de la expresión de citoqueratina.

5 En un aspecto, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el marcaje previo o la mezcla previa de una muestra que contiene una diana (por ejemplo, una célula) de interés con una pareja de unión que se une específicamente a la diana permite, por ejemplo, la captura de dichas dianas en un dispositivo de microcanales, tal como un dispositivo de microcanales descrito en el presente documento. Este abordaje también proporciona flexibilidad en el tipo y naturaleza de los anticuerpos primarios que se pueden usar para marcar los antígenos
10 celulares. De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona un dispositivo y método nuevos para separar las biomoléculas o células de interés de las muestras, en particular de muestras biológicas. En una realización, el dispositivo comprende un microcanal y una mezcla de carga. El microcanal puede comprender una población de postes distribuidos sobre la superficie del microcanal en el patrón aleatorio. La mezcla de carga puede comprender una muestra biológica que se sospecha que contiene una célula diana y una primera entidad de unión,
15 en la que la primera entidad de unión se une específicamente a una entidad diana en la célula diana. La superficie del microcanal está recubierta con una segunda entidad de unión que se une específicamente, directa o indirectamente, a la primera entidad de unión.

20 Cualquier dispositivo microcanal adecuado se puede usar en relación con la presente invención. En algunas realizaciones, el dispositivo de microcanales comprende una pluralidad de trayectorias de flujo predeterminadas. En algunas realizaciones, el dispositivo de microcanales comprende postes u obstáculos dispuestos en un patrón aleatorio o un patrón regular o de repetición. En algunas realizaciones, el dispositivo de microcanales comprende regiones que proporcionan un flujo laminar o un flujo no laminar aleatorio para cualquier fluido que las atraviese.

25 El dispositivo de microcanales puede ser un dispositivo de flujo aleatorio para separar las biomoléculas o células como se describe con detalle en la solicitud publicada de EE.UU. N° 2006/0160243. Dichos dispositivos se pueden modificar como se describe en el presente documento para su uso en relación con la invención. En general, el dispositivo de microcanales de flujo aleatorio incluye un sustrato o soporte que tiene una trayectoria de flujo definida en el mismo que incluye al menos un microcanal que tiene una región de recolección, en el que la trayectoria de flujo
30 está ligada a una entrada para la muestra y una salida para líquidos. En algunas realizaciones, la trayectoria de flujo puede incluir varios microcanales dispuestos en serie, cada uno de los cuales tiene una de estas regiones de recolección. Como alternativa, un microcanal de flujo aleatorio puede tener más de una región de recolección, dispuestas en serie, y también puede haber más de una entrada y más de una salida. Una realización concreta del dispositivo de microcanales de flujo aleatorio se describe en el ejemplo 1 y se ilustra en la Figura 1.

35 La región de recolección del microcanal de flujo aleatorio puede contener una pluralidad de postes verticales que están alineados transversalmente a la trayectoria de flujo líquido y dispuestos en un patrón aleatorio irregular a través de toda la anchura de la porción de la región de recolección del canal de flujo. En una realización, el patrón de los postes es tal que puede no haber un flujo laminar a través de la región de recolección y/o que las corrientes de
40 flujo laminar se rompen, lo que garantiza que haya un buen contacto entre el líquido que se ha hecho que fluya a lo largo de la trayectoria del flujo y las superficies de los postes. Los postes, en general, están integrados con la base plana de la región de recolección y se extienden perpendiculares a la misma, de modo que se presentan superficies que son verticales respecto a una trayectoria horizontal del líquido que se está haciendo que fluya a través del canal de flujo del sustrato o soporte.

45 La colocación y la forma de los postes en la región de recolección de postes en patrón se pueden modificar mediante ingeniería para una dinámica óptima de fluidos y potenciación de la captura de células diana a través de sus características de superficie específicas. Muy en general, en la mayoría de los casos, la forma preferida de la sección transversal horizontal de los postes fijados transversales evita los ángulos agudos que podrían estimular la
50 unión inespecífica de las superficies transversales de los postes. Los postes tienen superficies exteriores rectilíneas y, preferentemente, tienen una forma transversal circular generalmente o poligonal regular de 6 o más lados. Formas alternativas que podrían usarse son una forma desgarrable en la que la punta está en el extremo posterior y curvada superficialmente, o una forma ovalada; no obstante, si se desea más impacto se podría usar una forma cuadrada. En una realización, el patrón de los postes debería crear un patrón de flujo en la corriente de líquido que potencia la
55 captura de las células diana mediante la segunda entidad de unión unida a las superficies de los postes y la superficie enfrentada. Para conseguir este fin, los postes, por ejemplo, deben ser de diferentes tamaños y estar dispuestos en un patrón aleatorio fijado. Un patrón aleatorio de postes de diferentes tamaños de sección transversal, por ejemplo postes de sección transversal circular de al menos aproximadamente 3 o 4 tamaños diferentes, de aproximadamente 70 a aproximadamente 130 micrómetros de diámetro, en una región de recolección de
60 aproximadamente 100 micrómetros de altura en la que el espaciado de separación mínimo entre postes es de 50 a 70 μm y, preferentemente, de aproximadamente 60 μm .

65 En algunas realizaciones, el área transversal de los postes, todos los cuales tienen paredes laterales formadas por líneas paralelas que son perpendiculares a la base, es tal que ocupan entre aproximadamente 10 a 40 % o de aproximadamente 15 a 25 % del volumen de la región de recolección. Preferentemente, el patrón del poste será tal que ocupan aproximadamente el 20 % del volumen de la región de recolección, dejando un volumen hueco para el

flujo líquido de aproximadamente 80 %. Los postes están sustancialmente separados unos de otros, por ejemplo por al menos aproximadamente 60 micrómetros, y postes de diferentes tamaños se localizan aguas arriba y aguas abajo unos de otros. Postes más pequeños pueden crear regiones de turbulencia aguas abajo de los postes más grandes, y, como resultado del patrón de flujo que se genera, las superficies en las proximidades pueden mostrar una eficacia en particular a la hora de capturar las células diana.

En general, el componente sustrato del dispositivo de microcanales puede estar hecho de cualquier material aceptable de laboratorio adecuado, tal como silicio, sílice fundida, vidrio y materiales poliméricos. Puede ser deseable usar un material que sea ópticamente transparente, en particular cuando se desea usar opcionalmente una función diagnóstica. En su realización más simple, el sustrato portador del microcanal fabricado se sella con una placa que tiene una superficie plana que sostendrá la superficie enfrentada del sustrato. Dicha placa puede estar fabricada del mismo material o simplemente ser una placa de cobertura hecha de vidrio. Los plásticos adecuados que se pueden usar incluyen polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato, poliestireno, tereftalato de polietileno, así como otras resinas poliméricas bien conocidas para uso aceptable de material de laboratorio. Dichos sustratos establecidos se pueden fabricar usando cualquier método conveniente, como los seleccionados de entre las técnicas de moldeo y colado convencionales,

Los sustratos se pueden fabricar de forma conveniente con materiales poliméricos usando una estructura de molde maestra o negativa, que se puede crear en un fotorresistente negativo espeso, usando litografía óptica, bien conocida en esta técnica. Por ejemplo, la capa de construcción se puede formar a partir de una mezcla de resina epoxi de calidad estándar disponible comercialmente (EPON SU-8) fotorresistente y endurecedor (SU-82025), que se puede hilar sobre sustratos de oblea de silicio a 2.000 rpm para proporcionar, por ejemplo, una película de 40 o 50 µm de espesor de dicho fotorresistente. El espesor determina la altura de la trayectoria del flujo en la región de recolección. La película se somete a cocido preexposición durante 3 minutos a 60 °C, y después 7 minutos a 95 °C sobre una placa de calefacción de nivel preciso para garantizar un espesor total uniforme y las muestras resultantes se enfrían a temperatura ambiente. Se usa un Karl Suss Contact Mask Aligner para exponer una película con el patrón deseado para la trayectoria de flujo en el dispositivo último. Después, la película se somete a cocido posterior a 65 °C durante 2 minutos y después a 95 °C durante 5 minutos antes de que se desarrolle en un desarrollador SU-8 comercial durante 5 minutos, aplicándose una ligera agitación durante el desarrollo. Esto crea un molde de patrón negativo en la resina epoxi fotorresistente que después se usa como molde maestro para la replicación de sustratos con patrón de postes en PDMS u otra resina polimérica adecuada. El despliegue y las dimensiones del microcanal y de los postes con patrón en la región de recolección se determinan mediante la máscara usada en la etapa de exposición de la fabricación del molde maestro. La profundidad del microcanal se controla mediante el espesor de la capa de SU-8 del molde maestro, que se determina mediante condiciones de recubrimiento por rotación.

La invención implica una mezcla de carga que comprende una muestra biológica sospechosa de contener una diana (por ejemplo, una célula diana) y también comprende también una primera entidad de unión. La muestra biológica puede incluir, pero sin limitaciones, un fluido o tejido fisiológico o corporal, o una mezcla celular aislada de una muestra biológica. Por ejemplo, la muestra biológica puede incluir, sin limitaciones, sangre, plasma, suero, semen, secreciones vaginales, orina, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, un aspirado de aguja fina (AAF) y muestra de tejido de biopsia. Una célula diana puede ser cualquier célula que comprenda un antígeno de superficie detectable, tal como una célula de cáncer, célula madre, célula fetal, una célula infectada viral, bacteriana o fúngica. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula de cáncer. En determinadas realizaciones, la célula diana es inusual y está presente a una proporción baja en la muestra biológica, o expresa un nivel muy bajo de un antígeno concreto de interés. Los ejemplos de células diana que son inusuales en las muestras biológicas (por ejemplo, sangre) incluyen células tumorales circulantes (CTC) que se encuentran en las primeras etapas de un estado de enfermedad, tales como la Etapa 1 de la tumorigénesis, así como infecciones tempranas virales, bacterianas o fúngicas.

En realizaciones de la presente divulgación, la primera entidad de unión se une específicamente a una entidad diana en la célula diana. La primera entidad de unión puede incluir, entre otros, un anticuerpo, un antígeno, un aptámero, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN y ARN), una proteína (por ejemplo, receptor, enzima, inhibidor enzimático, sustrato enzimático, ligando), un péptido, una lectina, un ácido graso o lípido y un polisacárido. En una realización, la primera entidad de unión es un anticuerpo. En otra realización, la primera entidad de unión comprende una mezcla de la entidad de unión que tiene al menos un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, y en la que el primer anticuerpo se une específicamente a un primer epítipo de la entidad diana y el segundo anticuerpo se une específicamente a un segundo epítipo de la entidad diana. La primera entidad de unión puede comprender una mezcla de anticuerpos o entidades de unión dirigidas al uno o más antígenos sobre la célula o uno o más epítopos del antígeno diana, o una combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" puede hacer referencia a una región de unión en un antígeno singular o una región de unión en un segundo antígeno. A modo de ejemplo, en algunas realizaciones, el primer anticuerpo se une a un primer epítipo en un primer antígeno y el segundo anticuerpo se une a un segundo epítipo en el primer antígeno. En otras realizaciones, el primer anticuerpo se une a un primer epítipo en un primer antígeno y el segundo anticuerpo se une a un segundo epítipo en un segundo antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se pueden conjugar a una molécula marcadora que incluyen, sin limitaciones, biotina, digoxigenina, epítipo FLAG o polihistidina.

En realizaciones de la presente divulgación, la mezcla de carga comprende además una tercera entidad de unión conjugada con una entidad detectable o capturable. Por ejemplo, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo o ligando primario, la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario o ligando que se une específicamente a la primera entidad de unión, y la segunda entidad de unión se une específicamente a la tercera entidad de unión. Un anticuerpo primario puede incluir un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o anticuerpos purificados parcialmente. El anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo que se une a la región constante del anticuerpo primario. A modo de ejemplo, si el anticuerpo primario es un anticuerpo de ratón, el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-ratón. La entidad detectable o capturable conjugada al anticuerpo secundario puede ser un marcador que incluye, aunque sin limitaciones, biotina, digoxigenina, epítipo FLAG o polihistidina. En una realización, la mezcla de carga comprende además una tercera entidad de unión, en la que la primera entidad de unión es un anticuerpo primario, la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario biotinilado que se une específicamente a la primera entidad de unión y la segunda entidad de unión es avidina. Como se usa en el presente documento, el término "avidina" incluye cualquier forma expresada o modificada por ingeniería de la molécula de unión a avidina biotina, tal como estreptavidina, neutravidina y similares.

La superficie del microcanal del dispositivo está recubierta con una segunda entidad de unión que se une específicamente a la primera entidad de unión. La segunda entidad de unión puede ser un anticuerpo, un antígeno, un aptámero, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN y ARN), una proteína (por ejemplo, receptor, enzima, inhibidor enzimático, sustrato enzimático, ligando), un péptido, una lectina, un ácido graso o lípido y un polisacárido. La segunda entidad de unión puede ser el mismo tipo de molécula que la primera entidad de unión (por ejemplo anticuerpo-anticuerpo o ácido nucleico-ácido nucleico) o puede ser un tipo de molécula diferente a la primera entidad de unión (por ejemplo, ácido nucleico-proteína). La segunda entidad de unión puede unirse directamente a la primera entidad de unión o puede unirse indirectamente a la primera entidad a través de una molécula marcadora. Por ejemplo, si la primera entidad de unión es un anticuerpo primario biotinilado, la segunda entidad de unión puede ser avidina. En una realización, la segunda entidad de unión es avidina. En algunas realizaciones, la mezcla de carga puede comprender una primera entidad de unión y una tercera entidad de unión, en la que la primera entidad de unión se une a una entidad diana (por ejemplo sobre la célula diana) y la tercera entidad de unión se une específicamente a la primera entidad de unión. En dichas realizaciones, la segunda entidad de unión se une específicamente a la tercera entidad de unión, directa o indirectamente, a través de una entidad detectable. A modo de ejemplo, si la primera entidad de unión es un anticuerpo primario de ratón y la tercera es un anticuerpo anti-ratón conjugado con digoxigenina, la segunda entidad de unión puede ser un anticuerpo anti-digoxigenina.

La superficie polimérica del microcanal y/o de la región del poste con patrón u obstáculo comprendida en el mismo se puede derivar de varias formas para permitir la fijación de la segunda entidad de unión sobre todas las superficies. Por ejemplo, después del tratamiento del plasma y del cierre del microcanal que porta el sustrato, en el microcanal se puede inyectar una solución de 1 a 50 % en volumen de un silano amino funcional (por ejemplo, una solución al 3 % de Dow Coming Z-6020) o un silano tiofuncional, en etanol, para llenar la región de recolección entre las regiones de entrada para la muestra y la salida para la muestra y, a continuación, el microcanal inundado puede dejarse incubarse durante 30 minutos a temperatura ambiente. La derivación se puede realizar en un polímero no curado completamente, tal como PDMS, antes del cierre de la región del microcanal con una placa. En este caso, una alternativa es curar parcialmente ligeramente el sustrato de PDMS y después completar el curado después de fijar la placa de sellado y tratar con el silano sustituido u otro reactivo de funcionalización. Por ejemplo, se podría usar una etapa final de calentamiento de aproximadamente 90 minutos a aproximadamente 50 a 90 °C para completar el curado después de tratar con Z-6020. Como alternativa, uno o dos días a temperatura ambiente también completarían el curado. Dicho tratamiento de derivación también se puede realizar antes del cierre de la región de microcanal porque la derivación de la superficie plana enfrentada no tiene una consecuencia real. La trayectoria de flujo se purga después con etanol y el micro-canal está listo para la fijación de la segunda entidad de unión.

Las segundas entidades de unión pueden inmovilizarse directa o indirectamente sobre las superficies de los postes, obstáculos y/o el microcanal y las superficies pueden pretrazarse y/o recubrirse para facilitar la unión. En algunas realizaciones, se prefiere la inmovilización indirecta y se contempla el empleo de un agente intermedio o sustancia que primero se une al poste o superficie. Se puede desear utilizar pares de acoplamiento para enlazar con el agente intermedio. Por ejemplo, la avidina, o un anticuerpo dirigido contra otro anticuerpo de especie, podría unirse al agente intermedio, tal como un enlazador heterobifuncional de NHS/maleimida, que después se acoplaría a un anticuerpo biotinilado o a un anticuerpo de este tipo de especie.

El flujo continuo a través de los dispositivos de la presente divulgación se puede lograr mediante cualquier medio adecuado, con o sin fuerza exterior. En una realización, el flujo a través de los dispositivos se logra mediante bombeo, por ejemplo, usando una bomba de jeringa o similar, o mediante vacío que extraería el líquido a través de un depósito en un pocillo de entrada proporcionado por un orificio de entrada de gran diámetro. Preferentemente, se incluye un pocillo tal que tiene una capacidad para albergar de aproximadamente 50 µl a aproximadamente 500 µl de muestra de líquido. En una realización, el diseño del canal de flujo es tal que a caudales a través del dispositivo dentro de un intervalo razonable (por ejemplo, mediante la inyección de la muestra usando una bomba de jeringa o un dispositivo equivalente, tal como una bomba de jeringa Biocept, o una bomba de jeringa para infusión del aparato Harvard u otra bomba de jeringa disponible comercialmente) para crear un flujo en la región de recolección a una

velocidad de aproximadamente 0,01 a 100 mm por segundo, existe una alteración sustancial del flujo aerodinámico a través de la región, sin crear turbulencias. Esto es el resultado de la disposición aleatoria de los postes de diferentes tamaños y la separación relativa de los postes a lo largo de la región de recolección. El flujo relativamente no laminar relativamente suave sin puntos muertos se consigue a un caudal de líquido preferido de entre
 5 aproximadamente 0,3 a 10 mm/s, y, más preferentemente, el caudal se mantiene entre aproximadamente 0,5 y 5 mm/s y se logra mediante succión desde un pocillo de entrada de tamaño definido.

La presente divulgación también proporciona un método para detectar una célula diana en una muestra biológica usando los dispositivos descritos en el presente documento, definidos en las reivindicaciones. Los métodos de la
 10 presente divulgación comprenden poner en contacto una muestra biológica con una primera entidad de unión para formar una mezcla de precarga, en la que la primera entidad de unión se une específicamente a una entidad diana en la superficie de la célula diana; hacer pasar la mezcla de precarga a través de un microcanal, en el que la superficie del microcanal está recubierta con una segunda entidad de unión capaz de unirse específicamente a la primera entidad de unión; y detectar la presencia de la célula diana en la superficie del microcanal. En determinadas
 15 realizaciones, el microcanal comprende una población de postes distribuidos sobre la superficie del microcanal en el patrón aleatorio.

Varios tipos de muestras biológicas, tales como sangre, plasma, suero, médula ósea, semen, secreciones vaginales, orina, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, lavados pulmonares, aspirados con aguja
 20 fina (AAF) y muestras de tejido de biopsia, son adecuados para su uso en los métodos de la invención. En una realización, la muestra biológica es una muestra de sangre de un paciente. La célula diana puede estar presente en la muestra biológica en la proporción de 1 de cada 10^{10} células, 1 de 5×10^7 o de 1 de cada 10^4 células. Una célula diana puede ser cualquier célula que comprenda un antígeno de superficie detectable, tal como una célula de cáncer, célula madre, célula fetal, una célula infectada viral, bacteriana o fúngica.

En una realización concreta, la célula diana es una célula de cáncer. La célula de cáncer puede ser una célula de cualquier tipo de cáncer, tal como un cáncer epitelial, incluyendo, pero sin limitaciones, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer colorrectal, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de ovarios, células del cáncer de vejiga, células de cáncer endometrial uterino, células
 25 de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de hígado, células de cáncer renal o de riñón, cáncer de tiroides, células de cáncer de hueso, células de linfoma (por ejemplo, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin), células de melanoma y células de cáncer de piel que no es melanoma.

La primera entidad de unión puede ser cualquiera de las moléculas tal como se describe en el presente documento. En una realización, la primera entidad de unión es un anticuerpo. La primera entidad de unión puede ser un anticuerpo biotinilado y la segunda entidad de unión puede ser avidina. En algunas realizaciones, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo que se une específicamente a las células epiteliales circulantes. El anticuerpo puede ser un anticuerpo frente a la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), tal como un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de adhesión de la superficie celular epitelial. La primera entidad de unión puede
 35 ser un cóctel de dos, tres, cuatro, cinco, o más anticuerpos, por ejemplo, como se describe en el presente documento para la captura de las células cancerosas diana. Por ejemplo, el cóctel de anticuerpos puede comprender al menos anticuerpos contra un antígeno de superficie celular epitelial, y al menos un anticuerpo contra un antígeno que es indicativo de un fenotipo mesenquimatoso, para aislar de ese modo células que tienen una gama de características epiteliales y/o mesenquimatosas de la muestra.

Por ejemplo, cuando la célula diana es una célula de cáncer de mama, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo que se une específicamente a EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial), Her2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), MUC-1, EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), TAG-12 (glicoproteína 12 asociada a tumor), IGF1R (receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina), TACSTD2 (transductor 2 de señal de calcio asociado a tumor), CD318, CD340, CD104, N-cadherina o una combinación (por
 45 ejemplo, cóctel) de dos o más de los mismos.

En aún otra realización, la célula diana es una célula de cáncer de próstata y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a EpCAM, MUC-1, EGFR, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata), PSA (antígeno específico de la próstata), TACSTD2, PSCA (antígeno de células madre de próstata), PCSA (antígeno de superficie celular de próstata), CD318, CD104, N-cadherina o una combinación de los mismos. En otra realización, la célula diana es una célula de cáncer colorrectal y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a EpCAM, CD66c, CD66e, CEA (antígeno carcinoembrionario), TACSTD2, CK20 (citoqueratina 20), CD104, MUC-1, CD318, N-cadherina o una combinación de los mismos.
 55

En todavía otra realización, la célula diana es una célula de cáncer de pulmón y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a CK18, CK19, CEA, EGFR, TACSTD2, CD318, CD104, o EpCAM o una combinación de los mismos. En todavía otra realización, la célula diana es una célula de cáncer de páncreas y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a MUC-1, TACSTD2, CEA, CD104, CD318, N-cadherina, EpCAM o una combinación de los mismos. En todavía otra realización, la célula diana es una célula de
 60 cáncer de ovarios y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a MUC-1, TACSTD2,

CD318, CD104, N-cadherina, EpCAM o una combinación de los mismos.

En todavía otra realización, la célula diana es una célula endotelial de cáncer de vejiga urinaria y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a CD34, CD146, CD62, CD105, CD106, receptor de VEGF (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), MUC-1 o una combinación de los mismos. En otra realización, la célula diana es una célula epitelial de cáncer de vejiga y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a TACSTD2, EpCAM, CD318, EGFR, 6B5 o al receptor de unión a folato.

La célula diana puede ser una célula madre de cáncer y la primera entidad primero de unión puede ser un anticuerpo que se une específicamente a CD133, CD135, CD117, CD34 o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula diana es una célula de cáncer circulante que expresa antígenos mesenquimatosos y la primera entidad de unión es un anticuerpo (o un cóctel de anticuerpos) que se une específicamente a FGFR1, FGFR4, EGFR, N-cadherina, al receptor de unión a folato, y MSC o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula diana es una célula de cáncer circulante que expresa antígenos de superficie de la angiogénesis y la primera entidad de unión incluye un anticuerpo que se une específicamente a un receptor de VEGF.

En otras realizaciones, la célula diana es una célula de cáncer de melanoma y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a uno o más de los antígenos de diferenciación de melanocitos, antígenos oncofetales, antígenos específicos de tumor, antígenos SEREX o una combinación de los mismos. Los ejemplos de antígenos de diferenciación de melanocitos, incluyen, pero sin limitaciones, tirosinasa, gp75, gp100, Melan A/MART 1 o TRP-2. Los ejemplos de antígenos oncofetales incluyen antígenos en la familia MAGE (MAGE-A1, MAGE-A4), la familia BAGE, la familia GAGE o NY-ESO1. Los ejemplos de antígenos específicos de tumor incluyen CDK4 y β -catenina. Los ejemplos de antígenos SEREX incluyen D-1 y SSX-2.

En ciertas realizaciones, la primera entidad de unión es un anticuerpo dirigido a péptidos mutados que se activan como resultado de la transformación celular. Estos péptidos incluyen, pero no se limitan a, intrones mutados, N-acetilglucosaminiltransferasa, productos de genes V, MUM-1 y p15.

En otras realizaciones, la primera entidad de unión es un anticuerpo que reconoce el gangliósido, GM2, GD2, GM3 y/o GD3; proteoglicanos de condroitínsulfato de alto peso molecular, CD 146, o melanotransferrina p97.

En ciertas realizaciones, la célula diana es una célula tumoral circulante (CTC). A CTC en la muestra de sangre es una célula tumoral definida a menudo mediante la tinción positiva para CK y DAPI y tinción negativa para CD45 (CK⁺, CD45⁻, DAPI⁺), mientras que los linfocitos son CD45⁺. La detección de las CTC en la circulación sanguínea puede ayudar a la gestión de la enfermedad, incluyendo la capacidad de monitorizar la eficacia o el fracaso del tratamiento. Sin embargo, debido al número limitado de anticuerpos específicos de CTC disponibles, las CTC no han podido ser capturadas en aproximadamente el 40 % - 60 % de las muestras de sangre del paciente. De acuerdo con lo anterior, la presente invención en algunos aspectos proporciona un método para capturar y detectar estas CTC inusuales.

En algunas realizaciones, la primera entidad de unión es una mezcla (por ejemplo, un cóctel) de al menos un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, en la que el primer anticuerpo se une específicamente a un primer epítipo de la entidad diana y el segundo anticuerpo se une específicamente a un segundo epítipo de la entidad diana. El primero y segundo epítopos pueden estar presentes en el mismo antígeno (molécula) o el primero y segundo epítopos pueden estar presentes en diferentes antígenos (moléculas).

En una realización, la primera entidad primero de unión puede ser una mezcla de un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, en la que el la prime anticuerpo se une específicamente a un antígeno de células madre y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de células de cáncer. Los antígenos de las células madre pueden estar presentes en las células madre de cáncer y los anticuerpos dirigidos a estos antígenos de células madre se pueden añadir como anticuerpos de captura generales a uno o más anticuerpos dirigidos a antígenos de cáncer, tales como los descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo se une específicamente a CD133, CD135, CD117, CD34 o combinaciones de los mismos, y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de cáncer.

En otra realización, la primera entidad primero de unión puede ser una mezcla de un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, en la que el la prime anticuerpo se une específicamente a un marcador mesenquimatoso y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de células de cáncer. Las células tumorales circulantes pueden regular por disminución los marcadores epiteliales y regular por aumento los marcadores mesenquimatosos y, por tanto, pueden ser capturadas por los anticuerpos que se unen específicamente a este tipo de marcadores mesenquimatosos. En algunas realizaciones, el primer anticuerpo se une específicamente a FGFR1 (receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos), FGFR4, MSC (antígeno de células madre mesenquimatosas), EGFR, N-

cadherina, receptor de unión a folato o combinaciones de los mismos, y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de cáncer.

5 En todavía otra realización, la primera entidad primero de unión puede ser una mezcla de un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, en la que el primer anticuerpo se une específicamente a un marcador de angiogénesis y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de células de cáncer. En ciertas realizaciones, el primer anticuerpo se une específicamente a un receptor de VEGF y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de cáncer.

10 El método de la presente invención comprende adicionalmente poner en contacto la mezcla de precarga con una tercera entidad de unión. En la presente divulgación, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo primario, la tercera entidad de unión puede ser un anticuerpo secundario conjugado a una entidad detectable o capturable, y el anticuerpo secundario se une específicamente a la primera entidad de unión. La segunda entidad de unión se une específicamente a la tercera entidad de unión (por ejemplo, a través de la entidad capturable). En otra realización, el método comprende además poner en contacto la mezcla de precarga con una tercera entidad de unión, en la que la primera entidad de unión es un anticuerpo primario, la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario biotinilado que se une específicamente a la primera entidad de unión y en la que la segunda entidad de unión es una molécula de avidina. El anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo entero o intacto o un fragmento de mismo tal como Fab'2, Fab' o Fab cualquier derivado de anticuerpo. Un anticuerpo derivatizado puede ser un fragmento del anticuerpo, un anticuerpo que se ha conjugado con un ácido graso, hidrato de carbono, péptido, una entidad química tal como una fluoresceína, estreptavidina etcétera. Un anticuerpo derivatizado puede ser un anticuerpo en el que los aminoácidos se han modificado para aumentar la avidéz o afinidad del anticuerpo por la proteína diana.

25 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente, tras la captura celular, la reticulación de la célula diana unida a la superficie del microcanal. Se pueden usar varios agentes de reticulación para reticular las células diana unidas al microcanal, por ejemplo a través de, grupos amino (amida, amina etc.), grupos carbonilo, grupos acilo, grupos alquilo, grupos arilo, grupos sulfhidrilo, y otros que son bien conocidos para un experto en la técnica. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen, pero no se limitan a, reactivos de reticulación de NHS homobifuncionales hidrófilos (por ejemplo, éster de bis (NHS) PEO-5 (bis N-succinimidil-[pentaetilenglicol]) para reticular aminas primarias, derivados de isotiocianato homobifuncional de PEG o polímeros de dextrano, glutaraldehído, reticulantes heterobifuncionales que contienen NHS en un extremo y maleimida en el otro extremo del polímero; polímeros de hidratos de carbono tratados con peróxido para formar polímeros de aldehído reactivos y EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida clorhidrato) para reticular grupos carboxilo en aminas primarias. La longitud de los agentes de reticulación se puede variar mediante la adición de una o más unidades poliméricas entre los dos grupos reactivos en cada extremo del enlazador. Las unidades poliméricas adecuadas incluyen, pero no están limitados a, etilenglicol polimérico, cadenas de carbono, polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos.

40 El reactivo de reticulación se puede aplicar al microcanal después de la captura de las células diana. En algunas realizaciones, se emplea un segundo tratamiento de reticulación tras el marcaje (por ejemplo, marcaje fluorescente) de las células capturadas para reticular el marcador a las células capturadas. La concentración del agente de reticulación y la duración del tratamiento dependerán del tipo y la reactividad del reactivo de reticulación, el tipo de célula diana, las entidades de unión empleadas para capturar las células y el nivel de expresión de antígeno de superficie al que se une una entidad de unión. Las concentraciones adecuadas pueden ser de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 10 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, o lo más preferentemente de aproximadamente 1 mM. La duración del tratamiento con el reactivo de reticulación puede ser de aproximadamente 5 min a aproximadamente 120 min, de aproximadamente 15 min a aproximadamente 90 min, o de aproximadamente 30 min a aproximadamente 60 min. La optimización de la concentración del reactivo de reticulación y la duración del tratamiento está dentro de la habilidad del experto en la materia.

50 La detección de la presencia de células capturadas puede realizarse mediante uno de varios métodos conocidos por los expertos en la técnica. En una realización, las células capturadas pueden visualizarse mediante fotomicroscopia. En otra realización, las células capturadas pueden marcarse con una molécula fluorescente o teñirse y visualizarse mediante microscopia de fluorescencia o mediante la medición de una señal fluorescente. Por ejemplo, las células capturadas pueden teñirse con el pigmento nuclear DAPI y posteriormente visualizarse mediante microscopia de fluorescencia. En otra realización, la detección de la presencia de la célula diana se lleva a cabo mediante la detección de la presencia de la primera entidad de unión. La detección de la primera entidad de unión puede incluir la exposición de las células capturadas a una molécula marcada que reconoce y se une a la primera entidad de unión. Por ejemplo, la molécula marcada puede ser un anticuerpo marcado con un marcador fluorescente o partícula de látex coloreada que se une a la primera entidad de unión. En una realización, la primera entidad de unión es un anticuerpo biotinilado y la molécula marcada es avidina marcada con fluorescencia. En algunas realizaciones, la molécula marcada puede ser el mismo tipo de molécula que la segunda entidad de unión. En realizaciones en las que hay presente una tercera entidad de unión, la detección de las células capturadas puede comprender la detección de la presencia de la tercera entidad de unión. En tales realizaciones, la molécula marcada reconoce y se une a la tercera entidad de unión. Por ejemplo, la primera entidad de unión puede ser un anticuerpo de ratón, la tercera entidad de unión puede ser un anticuerpo secundario biotinilado que se une a los anticuerpos de ratón (por

ejemplo, un anticuerpo anti-ratón derivado de cabra) y la molécula marcada puede ser o bien avidina marcada con fluorescencia o un anticuerpo marcado con fluorescencia que se une a la tercera entidad de unión (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-cabra derivado de conejo).

5 En algunas realizaciones, puede ser deseable el análisis posterior de las células capturadas. En una realización, las células capturadas pueden liberarse del microcanal y recogerse para su posterior análisis. En la técnica se conocen varios métodos para la liberación de las células capturadas y pueden incluir medios mecánicos (por ejemplo, flujo de fluido alto), medios químicos (por ejemplo, cambio en el pH) o el uso de agentes de escisión enzimática. Por ejemplo, un reactivo se puede aplicar al microcanal para escindir la segunda entidad de unión o escindir el enlace
10 entre la segunda entidad de unión y las células a fin de liberar las células diana del microcanal. Por ejemplo, se puede usar tripsina, proteinasa K, colagenasa, o una enzima específicamente enfocada para degradar la segunda entidad de unión (por ejemplo, anticuerpos, estreptavidina) y/o los antígenos de superficie celular. Durante dicha escisión, la salida del microcanal está conectada a un depósito u otro colector y la corriente de descarga que lleva las células liberadas se recoge para su posterior análisis. Este análisis adicional puede incluir, pero no se limita a, la
15 detección de aneuploidía (incluyendo monosomía o trisomía de, por ejemplo, los cromosomas 1, 3, 4, 7, 8, 11, y/o 17), la amplificación de genes, la detección de la mutación génica, la duplicación de genes y otros cambios ácido nucleico o proteína bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una mutación génica puede ser una sustitución, adición, deleción de uno o más nucleótidos en una secuencia génica. En una realización, el ácido nucleico, tal como ADN o ARN, obtenido a partir de las células liberadas puede someterse a hibridación fluorescente *in situ* (FISH), análisis de PCR, análisis RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), secuenciación de ADN, etc.
20 En otra realización, las proteínas o glicoproteínas, incluyendo péptidos y aminoácidos obtenidos a partir de las células liberadas pueden someterse a, por ejemplo, pero no limitado a, análisis o secuenciación de aminoácidos o péptidos, CG-EM y otras técnicas conocidas por los expertos en la arte de análisis de proteínas. En aún otra realización, la célula capturada liberada desde el dispositivo de microcanales se puede analizar morfológicamente mediante microscopía óptica, microscopía electrónica, microscopía de barrido, tinción inmunocitoquímica (ICC) para
25 estructuras celulares internas o expresión de proteínas de la superficie etc.

En otra realización, las células capturadas pueden analizarse adicionalmente *in situ*. Por ejemplo, las células pueden contarse mientras están unidas, marcarse con marcadores fluorescentes, someterse a análisis de hibridación *in situ*,
30 tal como FISH. Debido a que los enlaces anticuerpo-antígeno no son covalentes, se pueden disociar en algunas circunstancias. Por lo tanto, en algunas realizaciones, es altamente deseable estabilizar adicionalmente las células en el microcanal mediante reticulación de las células al canal, de manera que las células no se desprenden y pierden durante las diversas etapas de calentamiento, desnaturalización y lavado. La reticulación puede ser una consideración particularmente importante con las células que expresan un bajo nivel de los antígenos de superficie dirigidos por la primera entidad de unión, ya que estas células pueden unirse más débilmente a la segunda entidad de unión. La reticulación covalente de las células a la matriz de la superficie del canal pueden estabilizar las células
35 capturadas durante el análisis posterior a la captura.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de análisis posterior a la captura de las células
40 circulantes. Las células circulantes pueden capturarse como se describe en el presente documento, incluyendo mediante los métodos o dispositivos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, las células circulantes son capturadas y evaluadas sin uno o más procesos de enriquecimiento y/o replicación o duplicación celular, por ejemplo, mediante cultivo celular, etc. En este aspecto, las células circulantes se evalúan para determinar la malignidad independiente del estado o la expresión de CK, por ejemplo, sin tinción de CK y/o cualquier otro ensayo de evaluación. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto, se evalúan las células capturadas (como se describe en el
45 presente documento) para determinar aneuploidía. La aneuploidía puede ser, con respecto a, por ejemplo, los cromosomas 1, 3, 4, 7, 8, 11, y/o 17. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente divulgación implica evaluar las células circulantes para determinar monosomía o trisomía 8, 11, y/o 17. En ciertas realizaciones, los métodos implica evaluar las células circulantes para determinar monosomía 8, 11, y/o 17. La aneuploidía se puede detectar usando cualquier método conocido, tal como FISH. Adicionalmente se pueden usar marcadores de cáncer o neoplasia maligna (excepto la expresión de citoqueratina), tales como los descritos en el presente documento, incluyendo la expresión de Her2.
50

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos adicionales, que no deberían interpretarse como limitantes.
55

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de dispositivo de microcanales básicos

60 Una realización de un dispositivo de microcanales para la separación de biomoléculas o células se muestra en la Figura 1. El dispositivo comprende un sustrato o soporte 11 que está formado por una trayectoria de flujo que incluye un microcanal 13 al que se debe suministrar el líquido de la muestra a través de una abertura o pocillo 15 que sirve como entrada en un primer extremo del dispositivo y una abertura 19 que sirve como salida en el segundo extremo
65 del dispositivo. La sección transversal de la región de recolección 17 es mayor que la de una sección de entrada 18 que conduce desde allí hacia la abertura de entrada 15. La sección de entrada contiene uno o más pares de

divisores/soportes alineados axialmente 21 justo aguas arriba de donde se ensancha en el extremo de la región 18 para entrar en la región de recolección 17. Estos divisores centrales rompen el flujo en dos o más rutas y sirven para distribuir el flujo de líquido de manera más uniforme, ya que se libera al extremo de entrada de la región de recolección 17. La región de recogida contiene una pluralidad de postes verticales 23 que están alineados transversalmente a la trayectoria del flujo de líquido y dispuestos en un patrón irregular, generalmente al azar en toda la anchura de la porción de región de recolección del canal de flujo. En una realización, el patrón de los postes es tal que puede no haber un flujo laminar a través de la región de recolección y que las corrientes de flujo laminar se rompen, lo que garantiza que hay un buen contacto entre el líquido que se ha hecho que fluya a lo largo de la trayectoria del flujo y las superficies de los postes. Los postes están integrados con la base plana de la región de recolección 17 y se extienden perpendicularmente desde la base, presentando superficies que son verticales con respecto a una trayectoria horizontal del líquido que se hace que fluya a través del canal de flujo del sustrato 11. Otro divisor/soporte de flujo 21a se localiza en la salida de la región de recolección.

El sustrato está formado por PDMS y está unido a una placa de vidrio plana para cerrar el canal de flujo. Las superficies interiores de la región de recolección se derivatizan con grupos amina (Inventores: ¿Es el grupo amina específico de PDMS o pueden existir otros grupos activos, por ejemplo SH, que pueden derivatizarse?. El inventor parece recordar que se pueden recubrir soportes con polilisina para fijar las células o las proteínas con carga positiva) mediante la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución al 3 % de 3-aminopropiltrióxido de silano. Después de lavar con etanol los grupos amina en el canal se derivatizan durante 30 minutos con molécula enlazadora de PEG bifuncional que contiene un éster de NHS en un extremo y un grupo maleimida en el otro extremo. En esta reacción, el grupo NHS reacciona con los grupos amina en el canal. Después de lavar el canal con PBS, se añade una solución de 0,5 mg/ml de estreptavidina tiolada que reaccionará con los grupos maleimida en el otro extremo de los enlazadores de PEG unidos al canal. La estreptavidina tiolada se prepara mediante tratamiento de estreptavidina con el reactivo de Traut como se conoce habitualmente en la técnica. Después de incubar durante 60 minutos, el exceso de estreptavidina tiolada se lava del microcanal con PBS/1 % de BSA y se almacena para su uso futuro.

En un ejemplo típico, se obtienen 10 ml de sangre y la capa leucocitaria se aísla por sedimentación por gradiente de densidad como se conoce habitualmente en la técnica. La capa leucocitaria contiene la fracción de glóbulos blancos nucleados de la sangre y también contiene células nucleadas epiteliales u otras presentes en la sangre. La capa leucocitaria contenida en un volumen de aproximadamente 0,5 ml en un tubo de centrifuga se incuba con la primera entidad de unión durante 30 minutos y después el tubo se llena con un exceso de aproximadamente 30 veces de PBS/BSA y se centrifuga para sedimentar las células de la capa leucocitaria. La muestra se resuspende en aproximadamente 200 μ l y se pasa a través del microcanal recubierto con avidina-enganchando el dispositivo de microcanales al tubo de salida de una bomba de jeringa que está cargada con aproximadamente 50 μ l de la suspensión celular. La bomba de jeringa se acciona para producir un flujo continuo lento del líquido de muestra a través del dispositivo de microcanales a temperatura ambiente y una velocidad de aproximadamente 10 μ l/min. Durante este período, la avidina unida a las superficies en la región de recolección en la que se encuentra el patrón aleatorio de los postes transversales, captura las células diana de interés en la muestra. Después de que toda la muestra se ha liberado mediante la bomba de jeringa, se lleva a cabo un lavado lento con un tampón acuoso de PBS/1% de BSA. Aproximadamente 100 μ l de este tampón acuoso se alimentan a través del dispositivo durante un período de aproximadamente 10 minutos, que elimina eficazmente todo el biomaterial unido inespecíficamente desde el canal de flujo en el dispositivo. Después se llevan a cabo dos lavados adicionales, cada uno con aproximadamente 100 μ l de PBS/BSA al 1% durante un período de aproximadamente 10 minutos.

En este momento, puesto que el dispositivo es de un material ópticamente transparente, se puede hacer el examen microscópico de los efectos de la captura usando fotomicroscopía. Las células capturadas se pueden tratar adicionalmente con anticuerpos y sondas fluorescentes adicionales y se analizan mediante microscopía de fluorescencia.

Ejemplo 2. Comparación de las velocidades de captura de células entre microcanales previamente marcados y células previamente marcadas

Como se describe en la solicitud publicada de EE.UU. N° 2006/0160243, presentada el 18 de enero de 2005 y en otras partes (Nagrath et al. (2007) Nature, Vol. 450(7173):1235–9), los dispositivos anteriores para la captura de células de interés comprendían un microcanal que se derivatizó con un anticuerpo que fue específico de los antígenos en las células de interés. La suspensión que contiene las células inusuales de interés se pasó después a través del canal y las células fueron capturadas por el anticuerpo específico de la célula (Figura 2).

Aunque el nivel de expresión del antígeno puede ser determinarse en células cultivadas y en muestras de tejido clínicos, tales como tumores, no se sabe con precisión cuántos antígenos están disponibles en la superficie de una célula tumoral circulante (CTC). Se sabe que los tumores son muy heterogéneos y que las células desprendidas del tumor en la sangre pueden cambiar sus niveles de expresión de antígeno. Por lo tanto, es más probable que las CTC sean una población muy heterogénea con niveles de antígeno específicos que varían desde muy bajos a muy altos en cualquier muestra dada. Para obtener la captura máxima de CTC de una muestra, es mejor optimizar el sistema para capturar células con los niveles de expresión de antígenos más bajos.

Los dispositivos de la presente divulgación comprenden un microcanal derivado con un anticuerpo general o proteína que puede unirse a anticuerpos específicos de células como se describe en el Ejemplo 1. El anticuerpo específico de la célula se añade a la muestra que contiene las células de interés antes de hacer pasar la muestra a través del microcanal, de modo que se marcan las células previamente. A continuación, las células de interés son capturadas cuando el anticuerpo general u otra proteína que recubre el canal se une al anticuerpo específico de la célula unido a las células de interés (Figura 3).

Se llevó a cabo el siguiente conjunto de experimentos para determinar si el premarcaje de una muestra que contenía CTC con anticuerpos específicos de antígeno daba como resultado una velocidad de captura mejor en los dispositivos de microcanales en comparación con los dispositivos de microcanales recubiertos con el anticuerpo específico de antígeno. Un antígeno habitual utilizado para capturar CTC es EpCAM, una molécula de adhesión de la superficie celular epitelial. Para estos experimentos, se usó la línea celular de vejiga, T24, que se sabe que expresa bajos niveles de EpCAM.

En el dispositivo tradicional, el microcanal se derivó con estreptavidina y después el anticuerpo biotinilado para EpCAM se cargó previamente en el canal (canal de EpCAM). El anticuerpo de EpCAM fue capaz de unirse al antígeno de EpCAM sobre la superficie de las células T24, capturando así las células en el microcanal. En el dispositivo de la presente divulgación, el microcanal se derivó con estreptavidina (canal Estrept.) y el anticuerpo biotinilado para EpCAM se incubó con la muestra de células T24 en aproximadamente 1 µg/ml durante 30-60 minutos antes de hacer pasar las células sobre el canal recubierto con estreptavidina. La estreptavidina se une al anticuerpo de EpCAM biotinilado unido a la superficie de las células T24, capturando así las células en el microcanal. Así, los componentes reactivos de los dos dispositivos son idénticos excepto porque se aplican a los dispositivos en un orden diferente.

Como se muestra en la Figura 4, el uso del canal recubierto con estreptavidina con células previamente incubadas con el anticuerpo biotinilado de EpCAM produjo de forma inesperada porcentajes de captura de aproximadamente dos veces los obtenidos con el canal de EpCAM y las células no marcadas. El porcentaje de captura incrementado es aproximadamente 2-3 veces mayor cuando las células se pasan a través del canal con múltiples caudales.

En una siguiente serie de experimentos, 1,2 µg/ml del anticuerpo de EpCAM biotinilado se preincubó con las células durante 30 minutos. Esta concentración de anticuerpo fue un exceso molar de aproximadamente 100 a 1000 veces sobre los antígenos totales presentes en las células T24 y, por tanto, un significativo exceso de anticuerpo permaneció en cada suspensión. Después de unos 30 minutos de incubación, el exceso de anticuerpo se diluyó a menos de 0,05 µg/ml mediante dilución de las células a aproximadamente 200 células para su aplicación en el canal. Esta muestra de células sirvió como muestra de control y se aplicó directamente a la canal en 250 µl de PBS/BSA (muestra A en la Figura 5). En las muestras B-D se añadió exceso de anticuerpo a las concentraciones indicadas de nuevo a la suspensión celular de 250 µl antes de pasar por el canal. Como se muestra en la Figura 5, el anticuerpo libre no interfiere con la unión a la estreptavidina en el canal y no disminuye la captura de células como se esperaba, sino que en realidad aumenta la captura de células.

En un experimento similar, el volumen de la suspensión celular inicial aplicada al canal se incrementó de 250 µl a 2 ml. Dado que los µg por ml del anticuerpo adicional fueron los mismos que en la Figura 5, los µg totales de anticuerpo absoluto en la muestra con aproximadamente 200 células fue casi 10 veces mayor que en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 6, el anticuerpo adicional añadido muestra un aumento similar en la recuperación de células respecto a la concentración del anticuerpo que se observó en los resultados representados en la Figura 5. Este resultado indica que la observación de la mayor recuperación está relacionada con la concentración del anticuerpo en exceso en la suspensión de células y no los µg del anticuerpo total en la suspensión celular.

Los resultados de esta serie de experimentos muestran ventajas inesperadas en la recolección de células de interés en un dispositivo de flujo de microcanales cuando las células se marcan previamente con anticuerpo. Como se ve en la Figura 4, la preincubación de las células con el anticuerpo específico de antígeno mejora significativamente la captura en el dispositivo de microcanales en comparación con la captura en microcanales recubiertos con el anticuerpo específico de antígeno. Además, la presencia de un exceso de anticuerpos en la muestra de células durante la carrera no limita esta metodología, pero puede, de hecho, mediar en el aumento de la unión de los antígenos celulares a la matriz de estreptavidina en el canal, mejorando de este modo la captura.

Ejemplo 3. El uso de varios anticuerpos aumenta la velocidad de la captura de las células diana

Tradicionalmente se ha considerado más eficiente precargar un anticuerpo en el canal. Sin embargo, los efectos negativos sobre la captura de células de carga de un canal con múltiples anticuerpos no se han considerado previamente. Una ventaja del uso de un microcanal recubierto con una pareja de unión general (por ejemplo, anticuerpo o proteína) de un anticuerpo específico de antígeno es que se pueden añadir varios anticuerpos a una suspensión celular de células precargadas sin que disminuya la disponibilidad de cualquier único anticuerpo. Dado que múltiples sitios de antígeno en una célula no son mutuamente excluyentes, al añadir varios anticuerpos a la suspensión celular no disminuye la eficiencia de captura en el canal no para ningún único anticuerpo. A modo de ejemplo, si el canal pudiera acomodar 100 sitios de anticuerpo y se añadiera una mezcla de 5 anticuerpos diferentes

a la capa del canal, cada anticuerpo ocuparía ~ 20 % del espacio del canal. Por lo tanto, la potencial eficacia de unión para cada anticuerpo individual es de solo el 20 % de lo que sería si se cubriera todo el canal. Independientemente del número de antígenos en la célula, el canal es inherentemente menos eficiente en la captura de esas células con solo el 20 % de dicho anticuerpo individual. Cuando la célula tiene un número bajo de antígenos

5 diana, la eficacia en la captura de estas células que expresan poco antígeno puede amplificarse mediante la adición de los anticuerpos específicos para otro antígeno diana en la suspensión celular antes de la unión al sustrato o soporte del dispositivo de microcanales. Por ejemplo, si se añaden los mismos 5 anticuerpos a la suspensión celular, cada anticuerpo se puede unir al máximo a todos los antígenos de superficie celular afines de forma independiente, sin interferencia o reducción debido a la presencia de otros anticuerpos unidos a diferentes epítopos en la célula.

10 Derivando cada uno de los cinco anticuerpos diferentes con un marcador de captura frecuente (por ejemplo, biotina), un canal recubierto con una pareja de unión para el marcador de captura (por ejemplo, estreptavidina) puede unir los 5 anticuerpos simultáneamente a sus respectivos antígenos en la célula, produciendo así un efecto aditivo sobre la captura de células.

15 La figura 7 muestra una reducción en la captura de las células T24 cuando la relación entre el anticuerpo de EpCAM y la IgG murina se reduce cuando los anticuerpos se recubren primero sobre el sustrato/soporte del dispositivo de microcanales. Para determinar el efecto de la captura de EpCAM en la presencia de anticuerpos biotinilados adicionales, el anticuerpo de EpCAM biotinilado se diluyó con IgG de ratón biotinilada irrelevante y se utilizó la mezcla resultante, ya sea para recubrir el canal con el anticuerpo o se añadió a la suspensión celular antes del paso

20 por el canal. La figura 7 (muestra A) muestra que el porcentaje de captura de células T24 es aproximadamente dos veces mayor cuando las células se marcaron previamente con el anticuerpo de EpCAM biotinilado solamente. Esta observación es consistente con los resultados observados en la Figura 4. Sin embargo, cuando el anticuerpo de EpCAM se diluyó en una relación 1:1 con un anticuerpo irrelevante y se usó para marcar las células directamente o para recubrir el canal, la recuperación del canal desciende desde el 24 % al 7 %, mientras que la recuperación de las células premarcadas no se ve afectada (Figura 7, muestra B). Cuando el EpCAM se diluyó en una relación de

25 1:4, la recuperación desciende al 1 % cuando la mezcla de anticuerpos recubrió primero el canal, mientras que la recuperación no se modifica cuando las células se marcaron previamente con la mezcla de anticuerpos antes de unirse al sustrato o soporte del dispositivo de microcanales (Figura 7, muestra C). Estos resultados demuestran que la dilución de los anticuerpos de EpCAM por anticuerpos adicionales no interfiere con la unión máxima de los anticuerpos de EpCAM a las células cuando las células se marcaron previamente con los anticuerpos solubles, pero

30 que el recubrimiento previo del canal con los anticuerpos de EpCAM diluidos muestra una reducción significativa en la captura de las células T24 que expresan EpCAM. Por tanto, es evidente que si el anticuerpo de EpCAM se mezclara con 2 o 3 o 4 anticuerpos diferentes para la unión en el canal, incluso si los otros anticuerpos eran relevantes para un antígeno de superficie de la célula, el anticuerpo de EpCAM vería disminuida

35 conmensurablemente su eficacia de unión. Por lo tanto, al añadir varios anticuerpos al canal, no se puede esperar que el efecto de cada anticuerpo sea aditivo. El efecto global sobre la captura de células es impredecible en esta configuración, ya que los niveles de antígeno de las células tumorales circulantes (CTC) son variables. Por definición el anticuerpo en una mezcla que podría dirigirse hacia el antígeno de nivel más alto en las CTC se disminuirá mediante la adición de anticuerpos a los niveles de antígeno menores en las CTC. Si solo uno de los anticuerpos en

40 una mezcla reconoce un epítipo dominante en una CTC en particular, la dilución con varios otros anticuerpos en el canal afectará negativamente a la captura en vez de aumentarla. Por el contrario, las mezclas de anticuerpos solubles añadidos a las células antes del paso a través del canal son aditivas.

45 Para demostrar el efecto aditivo de múltiples anticuerpos en las células premarcadas antes del paso a través del canal, dos anticuerpos diferentes frente a dos antígenos de adhesión de la superficie celular diferentes, Trop-1 y Trop-2, se añadieron a suspensiones celulares de células de vejiga T24 o de células de ovario SKOV. Cada uno de los anticuerpos se biotiniló y las células fueron capturadas utilizando un dispositivo de microcanales recubiertos con estreptavidina. Cuando se utilizó el anticuerpo Trop-1 para precargar las células T24, se captura el 29 % de las células (Figura 8). Cuando se añadió el anticuerpo Trop-2, que se une a un antígeno diferente del anticuerpo Trop-1,

50 en combinación con el anticuerpo Trop-1, se capturaron el 94 % de las células. Un resultado similar se obtiene con las células SKOV. Se observa una captura del 74 % de las células con marcaje previo con solo el anticuerpo Trop-1. Sin embargo, se observa una captura del 89 % de las células cuando se añadieron ambos anticuerpos, Trop-1 y Trop-2, al mismo tiempo (Figura 8). Los resultados muestran que la adición de más de un anticuerpo a más de un sitio diana en la superficie de la célula aumenta el número efectivo de moléculas detectables en canales unidas a la

55 célula diana y produce un efecto aditivo sobre la captura de células.

En la Figura 9 se observa el mismo efecto aditivo usando una línea celular diferente y con una mezcla de anticuerpos diferentes. En este caso se analizó la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231, que tiene una expresión de EpCAM baja. En la Figura 9, el % de captura con el anticuerpo de EpCAM solo es bajo, pero la adición

60 de una mezcla de 6 anticuerpos específicos para los antígenos: EpCAM, Trop-2, EGFR, MUC -1, CD318 y HER-2 mejora la captura hasta esencialmente el 100 %. El análisis FACS de MDA-MB-231 mostró que esta línea celular tiene una expresión muy baja del antígeno de EpCAM, Trop-2, Her-2, y MUC-1, pero mayor expresión de EGFR y CD318. Por lo tanto, los anticuerpos frente a los antígenos que de expresión más alta se diluyeron 3 veces con los anticuerpos frente a antígeno de expresión baja. Los anticuerpos diluidos siguen siendo altamente eficaces en la

65 captura de esta línea celular de baja expresión de EpCAM. Este resultado es consistente con los resultados mostrados en la Figura 7 en la que se utilizaron anticuerpos para premarcar las células.

Ejemplo 4. El marcaje con anticuerpos secundarios de las células diana puede efectuar la captura en el dispositivo de microcanales

5 En algunos casos, un anticuerpo primario no derivatizado puede unirse de manera más eficiente al antígeno de interés o puede ser más fácil de emplear. Con algunos anticuerpos sus actividades se ven afectadas negativamente por procedimientos de derivatización que modifican sus aminoácidos superficiales. En casos en los que uno desea usar un anticuerpo primario no derivatizado para la unión a antígenos celulares, un anticuerpo secundario derivatizado se puede añadir a la suspensión celular para formar un complejo con el anticuerpo primario que se une al antígeno diana celular. Por lo tanto, las mezclas de anticuerpos primarios, sobrenadantes de hibridoma 10 semipurificados o no clonales se pueden añadir a la suspensión celular y cualquiera de los anticuerpos que se une a los antígenos de la célula pueden marcarse mediante la adición de un anticuerpo secundario derivado (por ejemplo, biotinilado). Los anticuerpos que no se unen a la célula simplemente se eliminan mediante lavado.

15 Para ilustrar este enfoque, la línea celular SKOV de ovarios cultivada se premarcó con el anticuerpo Trop-1 biotinilado (muestra A en la Figura 10) o Trop-1 no biotinilado, además de un exceso molar de 3 veces del anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado. La concentración del anticuerpo primario (Trop-1) fue de 1 µg/ml y las células se incubaron durante 30 minutos, ya sea con o sin 3 µg/ml de anticuerpo secundario antes de la captura de las células y la purificación en un dispositivo de microcanales. La diferencia entre las muestras B y D fue que se usó un enlazador de biotina más largo en el anticuerpo secundario en la muestra D. En la muestra C, las células se 20 lavaron con PBS/BSA para eliminar el exceso de anticuerpo primario y secundario antes de aplicar las células al canal. En todas las muestras, se suspendieron aproximadamente 200 células en 250 µl de PBS/BSA para la aplicación al canal.

25 Como se muestra en la Figura 10, todas las muestras tienen una recuperación similar. Estos resultados demuestran que el anticuerpo secundario biotinilado se puede utilizar en combinación con el anticuerpo primario no marcado frente a las células premarcadas para la captura eficaz en un dispositivo de microcanales. La presencia de algún exceso de anticuerpo secundario biotinilado no afectó negativamente el porcentaje de captura en comparación con el premarcaje directo con 1 µg de Trop-1 biotinilado. Los anticuerpos secundarios pueden incluir anticuerpo IgG intacto, o fragmentos de anticuerpos tales como Fab², Fab', Fab o fragmentos de anticuerpos modificados mediante 30 ingeniería, tal como Fab de cadena sencilla o un fragmento variable de cadena sencilla.

Ejemplo 5. Estabilización de las células capturadas en la superficie del canal

35 El proceso de captura de células en un dispositivo de microcanales implica el flujo de células suspendidas en un líquido. Por lo tanto, las células se someten a fuerzas de cizallamiento desde el flujo de líquido que también pueden desprender las células del canal después de su captura. Este efecto es más pronunciado con las células que tienen niveles de antígeno de superficie más bajos debido a que hay relativamente menos puntos de unión entre la célula y los antígenos de superficie celular específicos unidos a la superficie del canal por el anticuerpo. Por lo tanto, es ventajoso proporcionar una unión externa adicional de la célula a la superficie del canal por medio de reactivos de 40 reticulación para estabilizar mejor la unión de la célula al canal. Dado que el canal está normalmente recubierto con una proteína de unión (por ejemplo, estreptavidina o un anticuerpo), un medio fácil de anclaje adicional de la célula al canal es a través de reactivos de reticulación proteicos.

45 Los reactivos conocidos en la técnica para este propósito pueden ser ésteres de NHS homobifuncionales para reticular los grupos amino en las proteínas. Otra forma de reticulación es a través de los grupos tiol o disulfuro en las proteínas con reactivos tiol reactivos, tales como moléculas heterobifuncionales con una maleimida y un éster de NHS. Además, reactivos tales como EDC se pueden utilizar para reticular grupos carboxilo y amino. La longitud de estos agentes de reticulación se puede variar mediante el uso de regiones poliméricas entre los dos grupos reactivos, que normalmente toman la forma de enlazadores químicos tales como etilenglicol polimérico o cadenas de 50 carbono simples, pero también pueden incluir azúcares, aminoácidos o péptidos, u oligonucleótidos. Las longitudes de cadena polimérica de 5 a 50 nm son típicas para este propósito, pero pueden ser más cortas o más largas, según sea necesario. La propiedad común de todos estos reactivos de reticulación proteicos es unir covalentemente las proteínas celulares para anclar la célula a la superficie del canal a través de múltiples puntos de unión covalentes.

55 Para examinar si los reactivos de reticulación añadidos externamente mejoran la retención de las células capturadas en los microcanales recubiertos, las células fueron capturadas en microcanales recubiertos y se someten a altas velocidades de flujo en la ausencia o presencia de una proteína reticulante. Se prepararon superficies de microcanales recubiertas con estreptavidina. La línea celular T24 cultivada, que se sabe que tiene un bajo nivel de expresión de EpCAM en la superficie, se utilizó como línea celular modelo. Un µg/ml de anticuerpo anti-EpCAM biotinilado se incubó con las células durante 30 minutos a 4 °C y aproximadamente 325 células se suspendieron en 60 250 µl de tampón PBS/BSA y se pasaron por triplicado sobre microcanales recubiertos a 12 µl/min. El número exacto de células aplicadas al canal se determinó microscópicamente contando las células en alícuotas duplicadas. Después de hacer pasar la suspensión celular a través del canal, el canal que contiene las células unidas se lavó una vez con PBS/BSA y después se hizo pasar una solución de éster de NHS homobifuncional (éster de bis-N-succinimidil- [pentaetilenglicol]) a 2 mM sobre el canal y se dejó incubarlo durante 20 minutos. El canal de control sin 65 éster de NHS recibió solo solución de PBS/BSA. Después, las células se lavaron con una solución de PEG/PBS al 5

% en PBS durante 2 minutos a varios caudales. La solución de PEG/PBS al 5 % aumenta la viscosidad de la solución y, junto con el flujo más alto, proporciona más fuerza de cizallamiento sobre las células para los propósitos de esta comparación. Las células capturadas en el canal se tiñeron después con el colorante de tinción nuclear, DAPI y se contaron.

5 La Figura 11 muestra fotomicrografías de células capturadas sometidas a diferentes caudales en ausencia de proteína reticulante. Casi el 50 % de las células se pierden a un caudal de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ y todas las células se pierden a un caudal de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

10 La Figura 12 muestra fotomicrografías de células capturadas sometidas a diferentes caudales tras la exposición a una proteína reticulante de NHS. Todas las células se mantienen en el canal a caudales de hasta 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ y solo se perdió una célula a un caudal de de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

15 Una comparación cuantitativa de captura con y sin estabilización celular mediante reticulación de proteínas se muestra en la Figura 13. Como en los experimentos previos, aproximadamente 200 células T24 se aplicaron al microcanal y después de la captura, las células se lavaron con 5 % de PEG en PBS. La Figura 13 muestra que menos del 50 % de las células que no se tratan con reactivo de reticulación se recuperan en comparación con el porcentaje de células recuperadas en los canales tratados con un agente de reticulación. Por lo tanto, la adición de reactivos proteicos de reticulación estabiliza significativamente la unión celular al microcanal. Cabe señalar que este resultado es independiente de cómo se capturaron las células en el microcanal, ya sea por el anticuerpo de precarga en las células o en el canal, ya que el agente de reticulación estabiliza la célula del microcanal después de que se han capturado las células.

25 Se empleó un segundo experimento similar al anterior para analizar la estabilidad de las células en el canal. Después del tratamiento de las células con el agente de reticulación proteico como antes, las células SKOV en el canal se tiñeron después con anti-citoqueratina (para visualizar las células epiteliales) y DAPI (para visualizar las células con un núcleo). La diferencia en este experimento fue que el tubo conectado a la salida se desconectó, un proceso que puede causar impulsos de presión transitorios pero bruscos que pueden romper y desprender las células del microcanal.

30 La Tabla 1 muestra los números crecientes de células perdidas cuando las células no reticuladas al canal se sometieron a fuerzas mecánicas exógenas como resultado de la eliminación los tubos de salida. Si las células se fijaron al canal con tratamiento con metanol antes de la eliminación de las conexiones de los tubos, no hay ninguna diferencia significativa en la recuperación celular, independientemente de si se utilizó agente de reticulación (datos no mostrados). Sin embargo, la fijación de metanol (o cualquier fijación con alcohol o acetona) tiene varios efectos secundarios indeseables para los propósitos de algunos análisis celulares posteriores. Las células fijadas con metanol se permeabilizan debido a la interrupción de la membrana celular y, por lo tanto, los estudios de la superficie celular no se pueden distinguir de las reacciones celulares internas. Además, las células fijadas con metanol se fusionaron a la matriz del canal, de modo que se dificulta y hace ineficiente la eliminación de células.

40 Tales células pueden someterse a una proteólisis extensa para ayudar an la eliminación de las células, pero la digestión celular tiene varios efectos secundarios indeseables para algunos tipos de análisis celular posterior. El procedimiento de reticulación de las células al canal permite retener las células estabilizadas en el canal sin fijación con alcohol durante las operaciones y manipulaciones normales del canal, incluyendo caudales más altos, tampones de mayor viscosidad y la eliminación de conexiones del canal.

TABLA 1

Condiciones	Reticulador 2 mM + metanol	Reticulador 2 mM sin metanol	Reticulador 0,2 mM sin metanol	Reticulador 0,07 mM sin metanol
% retenido en el canal	100 % (control)	96 %	60 %	28 %

Ejemplo 6. Las mezclas de anticuerpos (cóctel de anticuerpos) potencian la captura de células cancerosas de tipo epitelial y de tipo mesenquimatoso

50 Las líneas celulares de carcinoma urotelial (CU) tienen menor expresión de EpCAM en modelos de tumores más invasivos. Se esperaría que tales células en circulación limitaran la utilidad de la captura de CTC basada en EpCAM. Se seleccionó una cohorte de 5 líneas celulares de CU (UMUC3, UMUC5, UMUC9, T24, y KU7) sobre la base del análisis del mapa térmico de la expresión génica como más de tipo epitelial o de tipo mesenquimatoso. En este último caso, estas células han sufrido una transición de epiteliales a mesenquimatosas (TEM) que se traduce en células epiteliales con características de expresión y morfológicas mesenquimatosas. Esta TEM se ha propuesto como un mecanismo por el cual las células epiteliales pueden disociarse del tumor y ser más migratorias e invasiva en la circulación.

60 Estas células de TEM se analizaron después mediante FACS para varios antígenos de superficie celular. Después de identificar las diferencias de expresión en estas líneas celulares, se seleccionó una mezcla de anticuerpos de EpCAM y 5 anticuerpos adicionales para mejorar la captura de células de todos los tipos de células de CU. Después

se compararon las velocidades de captura de células utilizando canales de microfluidos con la mezcla de anticuerpos frente a EpCAM solos. Las células también se sometieron a inmunotinción con anticuerpos frente a citoqueratina y vimentina para ayudar aún más a distinguir las células que tienen características de expresión epiteliales o mesenquimatosas, respectivamente.

5 La Figura 14 muestra la tinción de las 5 líneas celulares de CU con vimentina y citoqueratina. Entre las 5 líneas celulares de CU, 2 (UC3 y KU7) se tiñeron con vimentina y tenían una expresión mínima o nula de EpCAM. Si bien estas líneas de células retuvieron algún grado de tinción de citoqueratina, una línea celular se tiñó solo con vimentina (Figura 14). Las 3 líneas restantes (UC5, UC9 y T24) solo se tiñeron con citoqueratina y tuvieron una
10 expresión significativa de EpCAM. Esas líneas celulares con ninguna expresión de EpCAM (UC3 y KU7) no tuvieron ninguna recuperación de células EpCAM solo cuando solo se utilizó como anticuerpo de captura. Sin embargo, cuando se usó la mezcla de anticuerpos, que comprende 6B5, se utilizó CD318, EGFR, MOV18, Trop-2 y EpCAM), las 5 líneas celulares alcanzaron velocidades de captura de células de casi el 100 %. El caso de KU7, el más de tipo mesenquimatoso de este grupo de tipos de células, el receptor de unión a folato (MOV18) fue único y no se expresó
15 en las otras líneas celulares.

Los resultados muestran que el uso de una mezcla de anticuerpos permite la captura tanto de células epiteliales de vejiga como de células epiteliales de vejiga que han sufrido TEM. El estudio muestra que el uso de mezclas de anticuerpos proporciona una mejora espectacular en la recuperación de células en comparación con el uso de un
20 único anticuerpo de forma individual, tal como EpCAM sola. Debido a la heterogeneidad de los tipos de células tumorales que se esperan en circulación, cabe esperar que tal enfoque mejore significativamente la captura y el aislamiento de las CTC a partir de muestras de pacientes.

25 **Ejemplo 7. La captura de células de expresión baja de antígeno en un dispositivo de microcanales aumenta con la mezcla o cócteles de anticuerpos**

Se necesitan métodos de detección habituales cuando se utilizan cócteles de anticuerpos para unirse simultáneamente a varios tipos celulares de cáncer diferentes. Mientras que la tinción de citoqueratina funciona bien para las células epiteliales, algunas células epiteliales han perdido la expresión de citoqueratina como se describe
30 en el Ejemplo 6. Con otros tipos de células, tales como células madre, no hay ningún método específico para la tinción de estas células que no tenga una reactividad cruzada significativa con otros tipos de células sanguíneas que pueden estar unidos de forma no específica al canal. Sin embargo, altos niveles de anticuerpos primarios o secundarios biotinilados en la superficie de las células son frecuentes para todas las células capturadas específicamente por la avidina en el microcanal. La ventaja de utilizar cócteles de anticuerpos conjugados con
35 biotina es el efecto aditivo en el aumento de biotinas de superficie sobre las células diana, que es útil para aumentar la captura de células de expresión baja de antígeno o de células de niveles de expresión variable de uno o más antígenos en una población celular heterogénea, tales como los encontrados en pacientes con tumores. Véanse las Figuras 8, 9 y 13.

40 La ventaja adicional inesperada del uso de múltiples anticuerpos en un cóctel es que esto proporciona un método de detección habitual para una población heterogénea de células que tienen un nivel variable de expresión del antígeno. Un ejemplo de esto se muestra en las Figuras 15.

La Figura 15A muestra el porcentaje de captura de células Skov, que se sabe que expresan un alto nivel de antígeno EpCAM (aproximadamente 40-70.000 antígenos de EpCAM por célula (apc)), con EpCAM sola o con una
45 mezcla de anticuerpos específicos para otros antígenos de superficie expresados por las células, incluyendo EpCAM, Trop-2, EGFR, MUC-1, CD318 y HER-2. Los resultados muestran que no hay una mejora significativa en el número en porcentaje de de células SKOV capturadas con el anticuerpo EpCAM solo o una mezcla de anticuerpos específicos para otros antígenos, además de EpCAM.

50 En contraste, la Figura 15B muestra la intensidad de la tinción de fluorescencia de las mismas células SKOV mediante FACS y en los portaobjetos. Estas células se tiñen con intensidades muy diferentes dependiendo de si se han mezclado previamente con EpCAM sola (-66.000 antígenos de superficie) o con una mezcla de anticuerpos que están dirigidos contra Her-2, CD24, CD44, el nivel del antígeno de superficie combinado de ~ 600.000 antígenos
55 según lo determinado por el análisis FACS. El anticuerpo anti-ratón marcado con fluorescencia se utilizó para marcar los anticuerpos primarios. Si bien hubo un aumento mínimo en la captura de estas células SKOV incubadas con el cóctel de anticuerpos usando el anticuerpo secundario biotinilado como se muestra en la Figura 15A, el uso del anticuerpo secundario marcado con fluorescencia en la Figura 15B muestra que la intensidad de la tinción es significativamente mayor cuando se usa la mezcla de anticuerpos. De una manera similar, este diferencial se obtendría si las células se hicieran reaccionar con el anticuerpo primario, seguido de anticuerpo secundario biotinilado y avidina reactiva-biotina marcada con fluorescencia. Por lo tanto existe una ventaja significativa en el uso
60 de mezclas de cóctel de anticuerpos, incluso cuando no son necesarios anticuerpos adicionales para la captura de las células. . En el caso de células de expresión baja de EpCAM, la captura utilizando el anticuerpo de EpCAM solo se reduce (Figuras 4-6, 14), pero se incrementa significativamente cuando se utiliza un cóctel de anticuerpos. En este caso, la intensidad de la tinción basada en el número de anticuerpos unidos a la superficie de las células también aumentaría. Por lo tanto, el uso de moléculas marcadas con fluorescencia dirigidas a los múltiples
65

anticuerpos utilizados para capturar mejor las células tiene la ventaja universal de una mejor detección de esas mismas células. El uso de cócteles de anticuerpos tiene la ventaja única de que permite la detección de las células para las cuales no puede ser un marcador específico conocido para la detección, tales como citoqueratina en las células epiteliales, o cuando la citoqueratina se ha perdido como se muestra en la Figura 14. Los múltiples anticuerpos utilizados en una mezcla para una mejor captura de células con expresión variable de marcadores de superficie todavía puede ser objeto de marcaje con fluorescencia basado únicamente en sus mayores niveles de anticuerpos unidos desde el cóctel de anticuerpos.

La Figura 16 muestra el efecto aditivo de múltiples anticuerpos en un cóctel, que contienen anticuerpos específicos para las células diana SKOV y que se muestra que están asociados mínimamente a las células no específicas presentes en una muestra de sangre, cuando la muestra de sangre estaba enriquecida con células diana SKOV. El cóctel de anticuerpos contenía anticuerpos dirigidos contra CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCAM, Mov-18, MSC, c-met y N-cadherina. Aunque algunas de las células no específicas en la muestra pueden haber adsorbido algunos de los anticuerpos biotinilados (ya sea primarios o secundarios) añadidos a las muestras, el nivel de anticuerpos adsorbidos es demasiado bajo como para visualizarse utilizando neutravidina marcada con fluorescencia. La tinción diferencial entre las células diana específicas y las células no específicas favorece la visualización de las células diana que tienen un mayor número de anticuerpos biotinilados a partir de la mezcla de anticuerpo unido o capturado por las células diana. Las figuras 15 y 16 demuestran que la adición de múltiples anticuerpos en un cóctel proporciona un método habitual y universal de detección de tipos de células inusuales que expresan niveles bajos de antígenos en el microcanal. Por lo tanto, el cóctel de anticuerpos utilizado para mejorar y aumentar así la captura de las células tumorales circulantes que son altamente variables en la población celular heterogénea en una muestra, también mejora la detección de cualquiera de las células capturadas.

Ejemplo 8: El dispositivo de microcanales es superior en la captura de células de muestras biológicas que están presentes en un número bajo de células.

En la Figura 17, las muestras de sangre se enriquecieron con un número variable de células SKBR3, una línea celular que expresa altos niveles de EpCAM, que van desde aproximadamente 10 - 250 células por 10 ml de muestra de sangre. Se añadieron anticuerpos de EpCAM a la muestra de sangre enriquecida y las células unidas al Ac de EpCAM se capturaron en un dispositivo de microcanales utilizando el método descrito en el Ejemplo 1.

Los resultados de la Figura 17 muestran que aproximadamente un 100 % de las células SKBR3 fueron recuperados de las muestras enriquecidas. Los datos muestran que el porcentaje de captura de las células por el dispositivo de microcanales es independiente de la entrada de la célula.

Ejemplo 9: El cóctel de anticuerpos es superior en la captura de células tumorales circulantes (CTC) de las muestras de sangre de pacientes usando el dispositivo de microcanales

Tabla 2 muestra los resultados de las células tumorales circulantes (CTC) capturadas en un dispositivo de microcanales a partir de muestras de sangre de 10 ml de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata, de pulmón, de páncreas, de células renales, colorrectal, de mama y de ovarios. Las muestras de sangre se marcaron previamente con un cóctel de anticuerpos solubles que contienen anticuerpos dirigidos contra CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCam, Mov-18 y MSC, o un anti-EpCAM únicamente. Las células se identificaron mediante tinción con anti-citoqueratina marcada con fluorescencia.

TABLA 2

Nº de muestra*	Anti-EpCAM solo	Cóctel de AcMo
1 (16283 – Próstata)	0	2
2 (16302 – Próstata)	0	3
3 (16318 – Próstata)	95	77
4 (16291 – de ovarios)	1	1
5 (16278 – colorrectal)	0	4
6 (16288 – pulmonar)	0	5
7 (16297 – de mama)	1	3
8 (16296 – de mama)	0	3

* Muestras de cáncer de próstata, de pulmón, de páncreas, de células renales, colorrectal, de mama y de ovario

La TABLA 2 muestra que las muestras de sangre premarcadas con un cóctel de anticuerpos solubles son superiores en la captura de CTC en comparación con las muestras premarcadas con un único tipo de anticuerpo de forma individual.

Ejemplo 10: El dispositivo de microcanales es superior en la captura de CTC cuando las muestras de sangre obtenidas de pacientes de cáncer de mama que están premarcadas con un cóctel de anticuerpos solubles en un dispositivo de microcanales en comparación con la captura de CTC usando un anticuerpo marcador

ferromagnético

Las muestras de sangre se preincubaron con el anticuerpo anti-EpCAM para la captura en un dispositivo de microcanales o se preincubaron con anticuerpos que se unen a partículas de hierro microscópicas (immunoferrromagnetic Abs) y se capturaron utilizando CellSearch® (Veridex, LLC). Las células capturadas se tiñeron para CK, marcadores CD45 y DAPI, una tinción nuclear. Las células que se tiñeron *in situ* con CK+/ CD45-/DAPI*se contaron.

TABLA 3

ID de la muestra	CTC totales mediante CEE (CK+/CD45-/DAPI+)*	Veridex
16163	0	0
16170	0	0
16171	60 (34)	54
16172	5	0
16173	0	1
16176	549 (325)	1267
16187	104 (37)	54
16196	0	0
16198	87 (27)	32
16202	5	8
16203	2008	923
16205	78	51

* No hay diferencia significativa mediante una prueba t de dos colas (P = 0,715)

Los recuentos totales de CTC indicados en negrita incluyen robustas, apoptóticas y micronúcleos; mientras que los números entre paréntesis indican CTC robustas.

La TABLA 3 muestra que el número total de CTC capturadas en el dispositivo de microcanales que son CK+/ CD45-/DAPI*son consistentemente más de las CTC capturadas por los sistemas VERIDEX, lo que indica que la invención proporciona una captura superior de CTC.

Ejemplo 11: El análisis molecular posterior a la captura de células capturadas aumenta la identificación de CTC como células cancerosas en pacientes de cáncer de mama en estadios III y IV

Las células tumorales circulantes (CTC) fueron capturadas a partir de muestras de sangre de pacientes de cáncer de mama en estadio IV (TABLA 4) y III (TABLA 5). Las CTC se premarcaron con un cóctel de anticuerpos, que contiene anticuerpos frente a CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCAM, Mov-18, y el MSC, y se liberaron del dispositivo de microcanales. Las células capturadas se analizaron mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para determinar aneuploidía en los cromosomas 8 y 17, y la amplificación del marcador de cáncer de mama, *Her2* (TABLA 4). Estas células no se liberaron nunca desde el microcanal y toda la FISH se realiza en el canal con las células reubicadas siguiendo la enumeración para el análisis FISH. El número total de CTC halladas positivas para aneuploidía se comparó con el número total de células teñidas positivas para el marcador CK.

TABLA 4

Nº de muestra	Nº de CTC (CK+)	Nº de células aneuploides (crom. 17 y 18)	Proporción Her2/ cromosoma 17
1	3	7 (6 CK ⁻)	1,05
2	1	1 (CK ⁻)	1,0
3	0	3 (CK ⁻)	1,0
4	0	3 (CK ⁻)	1,0
5	0	4 (CK ⁻)	1,0
6	2	13 (CK ⁻ /GK ⁺)	Mixta
7	1	1 (CK)	1,0
8	1	7 (CK ⁻)	0,95
9	510	7 (CK ⁺)	1,0
10	16	16 (CK ⁻ /CK ⁺)	>6
11	1	2 (CK ⁻)	1,0
12	0	4 (CK ⁻)	1
13	0	2 (CK ⁻)	1
14	0	14 (CK ⁻)	1
15	0	1 (CK ⁻)	1,5
16	0	24 (CK)	1,98
17	3	9 (CK ⁻)	5,714

La TABLA 4 muestra que el análisis molecular posterior a la captura de las CTC de pacientes con cáncer de mama en estadio IV para detectar aneuploidía y el estado de amplificación de Her2 es superior en la detección de células de cáncer de mama a partir de las CTC capturadas en comparación con la tinción de CK.

- 5 En la TABLA 5, las CTC capturadas de las muestras de sangre de pacientes diagnosticados con cáncer en estadio III se analizaron para detectar aneuploidía en los cromosomas 8, 11 y 17. El número total de CTC encontrado positivo para aneuploidía se comparó con el número total de células teñidas positivas para el marcador CK. Se muestran los detalles de aneuploidía en los cromosomas 8, 11 y 17.

10

TABLA 5

ID de la muestra	Nº de CTC (CK ⁺)	Nº de células aneuploides	Detalles aneuploides (cromosomas 8, 11 y 17)
16610	0	93	4– Monosomía 8; 6– Monosomía 11; 83– Monosomía 17
16620	0	55	26– Monosomía 8; 11– Monosomía 11; 16– Monosomía 17, complejo 2 de aneuploidía
16621	0	54	8– Monosomía 8; 22– Monosomía 11; 23– Monosomía 17, 1-trisomía 17
16631	0	169	11– Monosomía 8; 11– Monosomía 11; 265– Monosomía 17, 3-monosomías complejas
16632	0	61	9– Monosomía 8; 10– Monosomía 11; 40– Monosomía 17, 2-monosomías complejas 8, 11, 17
16633	0	6	2– Monosomía 8; 1– Monosomía 11; 3– Monosomía 17
16686	0	55	13– Monosomía 8; 13– Monosomía 11; 21– Monosomía 17, 1-trisomía 8; 1-trisomía 11; 1-trisomía 17
16687	0	686	12– Monosomía 8; 82– Monosomía 11; 582– Monosomía 17
16720	0	56	8– Monosomía 8; 23– Monosomía 11; 25– Monosomía 17
16747	0	58	11– Monosomía 8; 19– Monosomía 11; 26– Monosomía 17, 1-tetraploidía 8; 1-trisomía 17
16754	0	531	21– Monosomía 8; 123– Monosomía 11; 380– Monosomía 17, complejo 7 de aneuploidía

- 15 Aunque ninguna de las CTC capturadas de la sangre de pacientes con cáncer de mama en estadio III se tiñeron positivas para el marcador CK (CK⁺), los análisis posteriores a la captura para detectar aneuploidía en los cromosomas 8, 11 y 17, mostraron que un gran número de las CTC capturadas son células aneuploides que indican que estas CTC son células tumorales. El estudio de hibridación *in situ* mediante FISH para detectar amplificación de Her2 (tabla 4) y aneuploidía (Tabla 4 un 5) confirma que las CTC capturadas que son CK⁺ son células del cáncer de mama. Los resultados de las Tablas 4 y 5 muestran que los análisis moleculares posteriores a la captura, tales como la amplificación del marcador Her2 y la detección de aneuploidía de las células capturadas liberadas desde el dispositivo de microcanales, identifican positivamente células cancerosas en células CK⁺ de pacientes con cáncer en estadios III y IV. Este estudio muestra que las CTC capturadas dentro del dispositivo de microcanales proporcionan un método robusto para identificar células cancerosas que, de otro modo, quedarían sin ser detectadas.

25 **Ejemplo 12: El análisis molecular posterior a la captura de células capturadas aumenta la identificación de CTC como células cancerosas en pacientes de cáncer de vejiga urinaria**

- 30 Las células tumorales circulantes (CTC) se capturaron a partir de muestras de sangre de pacientes con cáncer de vejiga. Las CTC se premarcaron con un cóctel de anticuerpos que contenía anticuerpos dirigidos contra CD340, EGFR, CD318, Muc-1, Trop-2, EpCAM, Mov-18, MSC, c-met y N-cadherina. Las células capturadas se analizaron directamente en el dispositivo de microcanales mediante hibridación fluorescente *in situ* para detectar aneuploidía en los cromosomas 3, 7 y 17, y en comparación con la tinción para el marcador CK en las CTC capturadas.

TABLA 6

ID de la muestra	Nº de CTC (CK ⁺)	Nº de células aneuploides	Detalles aneuploides (cromosomas 3, 7 y 17)
16660	0	17	12– Monosomía 3; 1– Monosomía 3; 2– Monosomía 7; 2-monosomía 17
16664	0	13	1– Monosomía 3; 2– Monosomía 3; 4– Monosomía 7; 6-monosomía 17
16708	0	27	14– Trisomía 3; 2– Monosomía 3; 8– Monosomía 17; 2-monosomía 7; 1-Tetraploide 3
16714	0	78	7– Monosomía 3; 3– Monosomía 7; 68– Monosomía 17
16719	0	8	2– Monosomía 3; 1– Monosomía 7; 5– Monosomía 17

16729	0	29	2- Monosomía 3; 5- Monosomía 7; 10- Monosomía 17, 12- trisomía 3
16746	0	20	13- Monosomía 17; 13- Trisomía 3; 1- Trisomía 7; 2- trisomía 17; 1- monosomía 3; 2- monosomía 7
16762	0	18	2- Monosomía 3; 12- Monosomía 17; 3- Trisomía 3; 1- aneuploide completo aneuploide (triploide para 3, 7, 17)
16761	0	46	5- Monosomía 3; 5-0 Monosomía 7; 8- Monosomía 17; 26- Trisomía 3; 2- Trisomía 17; 4- Tetraploide 3

5 La tabla 6 muestra que las muchas células capturadas a partir de las muestras obtenidas de pacientes con cáncer de vejiga que se tiñen negativas para CK (2ª columna) son células aneuploides (monosomía, trisomía y/o tetraploides en los cromosomas 3, 7 y 17). Los resultados de la Tabla 6 muestran que el método es capaz de identificar CTC a partir de sangre obtenida a partir de diferentes tipos de cáncer.

10 Los resultados de estos experimentos muestran que la capacidad de identificar aneuploidía y la expresión de marcadores específicos en las CTC capturadas en un dispositivo de microcanales proporciona un medio para predecir y controlar enfermedades, como el cáncer, durante las primeras etapas de la tumorigénesis o las etapas tardías de la tumorigénesis en las que las células tumorales han metastatizado escapado a la circulación. Además, el método descrito es aplicable también para el seguimiento de la eficacia o fracaso del tratamiento.

15 Se entiende que la invención divulgada no se limita a la metodología, protocolos y materiales descritos concretos, ya que éstos pueden variar. También se entiende que la terminología usada en la presente memoria descriptiva es para los fines de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención, que solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

20 Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán contribuir usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descrita en la presente memoria descriptiva. Dichos equivalentes están destinados a estar dentro de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la captura de una célula diana en una muestra, que comprende

5 poner en contacto una muestra, que se sospecha que contiene una célula diana, con una primera entidad de unión para formar una mezcla de precarga, en la que la primera entidad de unión es un anticuerpo primario que se une específicamente a una entidad diana en la superficie de la célula diana,
 poner en contacto la mezcla de precarga con una tercera entidad de unión,
 10 hacer pasar la mezcla de precarga a través de un microcanal, en donde la superficie del microcanal está recubierta con una segunda entidad de unión que se une específicamente de manera indirecta a través de la tercera entidad de unión a la primera entidad de unión, en donde la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario que se une específicamente a la primera entidad de unión y está marcado con biotina, digoxigenina, epítipo FLAG o polihistidina y la segunda entidad de unión se une al marcador, y
 capturar la célula diana, si está presente en la muestra, en la superficie del microcanal.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que la primera entidad de unión es un anticuerpo o cóctel de anticuerpos.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana es una célula inusual en una muestra biológica, estando opcionalmente presente en la muestra biológica en la proporción de 1 de cada 10^{10} células, 1 de 5×10^7 o 1 de cada 10^4 células.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la célula diana es una célula tumoral circulante (CTC) y/o una célula cancerosa seleccionada de una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovarios, una
 25 célula de cáncer de vejiga, una célula de cáncer endometrial, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer renal, una célula de cáncer de tiroides, una célula de cáncer de huesos, una célula de linfoma, una célula de melanoma y una célula de cáncer que no es de melanoma.

5. El método de la reivindicación 1, en el que la primera entidad de unión:

- 30 a) incluye un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de superficie de células epiteliales; o
 b) es un anticuerpo frente a la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM).

6. El método de la reivindicación 3, en el que la célula diana es una célula de cáncer de melanoma y en el que la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a antígenos de diferenciación de melanocitos, antígenos oncofetales, antígenos específicos de tumor, antígenos SEREX o una combinación de los mismos.

7. El método la reivindicación 6, en el que:

- 40 a) los antígenos de diferenciación de melanocitos consisten en tirosinasa, gp75, gp100, MelanA/MART1 o Trp2 y/o
 b) los antígenos oncofetales consisten en MAGE-A1, MAGE-A4, BAGE, GAGE o NY-ESO1; y/o
 c) los antígenos específicos de tumor consisten en CDK4 y β -catenina.

45 8. El método de la reivindicación 3, en el que la célula diana se selecciona de:

- a) una célula de cáncer de mama y en el que la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a Her2/neu, EpCAM, MUC-1, EGFR, TAG-12, IGF1R, TACSTD2, CD318, CD 104 o N-cadherina, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;
 b) una célula de cáncer de próstata y en el que la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a EpCAM, MUC-1, EGFR, PSMA, PSA, TACSTD2, PSCA, PCSA, CD318, CD104 o N-cadherina, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una
 55 combinación de los mismos;
 c) una célula de cáncer colorrectal y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a EpCAM, CD66c, CD66e, CEA, TACSTD2, CK20, CD104, MUC-1, CD318 o N-cadherina, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;
 d) una célula de cáncer de pulmón y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a
 60 CK18, CK19, TACSTD2, CD318, CD104, CEA, EGFR o EpCAM, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;
 e) una célula de cáncer de páncreas y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a MUC-1, CEA, TACSTD2, CD104, CD318, N-cadherina, MUC-1 o EpCAM, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;
 65 f) una célula de cáncer de ovarios y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a MUC-1, TACSTD2, CEA, CD318, CD104, N-cadherina o EpCAM, o la primera entidad de unión es un cóctel de

anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;

g) una célula endotelial de cáncer de vejiga urinaria y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a CD34, CD146, CD62, CD105, CD106, receptor de VEGF o MUC-1, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;

5 h) una célula epitelial de cáncer de vejiga urinaria y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a TACSTD2, EpCAM, CD318, EGFR, 6B5, receptor de unión a N-cadherina o a folato, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos

10 i) una célula madre de cáncer y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a CD133, CD135, CD 117 o CD34, o la primera entidad de unión es un cóctel de anticuerpos que se unen específicamente a una combinación de los mismos;

15 j) una célula de cáncer circulante que expresa antígenos mesenquimatosos y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a FGFR1, FGFR4, EGFR, receptor de unión a folato, N-cadherina o MSC, o la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a un combinación de los mismos;

k) una célula de cáncer circulante que expresa antígenos de superficie de la angiogénesis y la primera entidad de unión es un anticuerpo que se une específicamente a un receptor de VEGF.

20 9. El método de la reivindicación 1, en el que la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario biotinilado y la segunda entidad de unión es avidina.

25 10. El método de la reivindicación 1, en el que la primera entidad de unión es una mezcla de al menos un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo, y en el que el primer anticuerpo se une específicamente a un primer epítipo de la entidad diana y el segundo anticuerpo se une específicamente a un segundo epítipo de la entidad diana; en el que opcionalmente:

a) el primer anticuerpo se une específicamente a un antígeno de células madre y el segundo anticuerpo se une a un antígeno de célula de cáncer, en el que preferentemente el primer anticuerpo se une específicamente a CD133, CD135, CD117, CD34 o combinaciones de los mismos;

30 b) el primer anticuerpo se une específicamente a un marcador mesenquimatoso y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de célula de cáncer, en el que preferentemente el primer anticuerpo se une específicamente a FGFR1, FGFR4, MSC o combinaciones de los mismos; o

35 c) el primer anticuerpo se une específicamente a un marcador de la angiogénesis y el segundo anticuerpo se une específicamente a un antígeno de célula de cáncer, en donde preferentemente el primer anticuerpo se une específicamente al receptor de VEGF.

11. El método de la reivindicación 1, en el que el microcanal comprende una población de postes distribuidos sobre la superficie del microcanal siguiendo un patrón irregular.

40 12. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende adicionalmente la reticulación de la célula diana unida a la superficie del microcanal.

13. Un método para detectar una célula diana en una muestra biológica, que comprende:

45 poner en contacto una muestra biológica, que se sospecha que contiene una célula diana, con una primera entidad de unión para formar una mezcla de precarga, en donde la primera entidad de unión es un anticuerpo primario que se une específicamente a una célula diana en la muestra biológica,

50 poner en contacto la mezcla de precarga con una tercera entidad de unión, hacer pasar la mezcla de precarga a través de un microcanal, en donde la superficie del microcanal está recubierta con una segunda entidad de unión que se une específicamente de manera indirecta, a través de la

tercera entidad de unión, a la primera entidad de unión, en donde la tercera entidad de unión es un anticuerpo secundario que se une específicamente a la primera entidad de unión y está marcado con biotina, digoxigenina, epítipo FLAG o polihistidina y la segunda entidad de unión se une al marcador, y

55 detectar la presencia de la célula diana, si está presente en la muestra, en la superficie del microcanal.

14. El método de la reivindicación 1, en el que la célula diana se evalúa para detectar aneuploidía, preferentemente aneuploidía en uno o más de los cromosomas 1, 3, 4, 7, 8, 11 y/o 17.

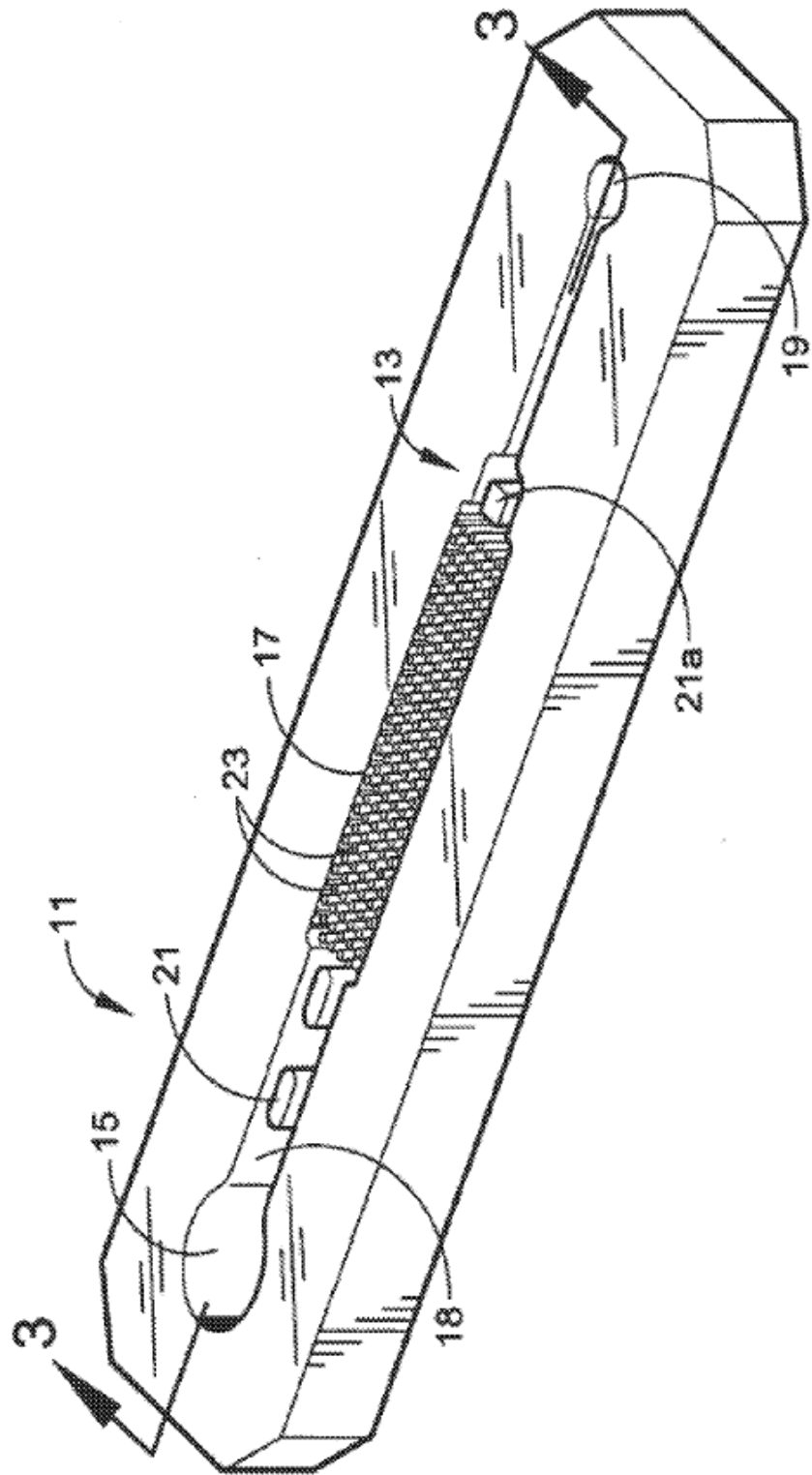


FIGURA 1

Canales premarcados con Ac antes del paso de la célula por el canal

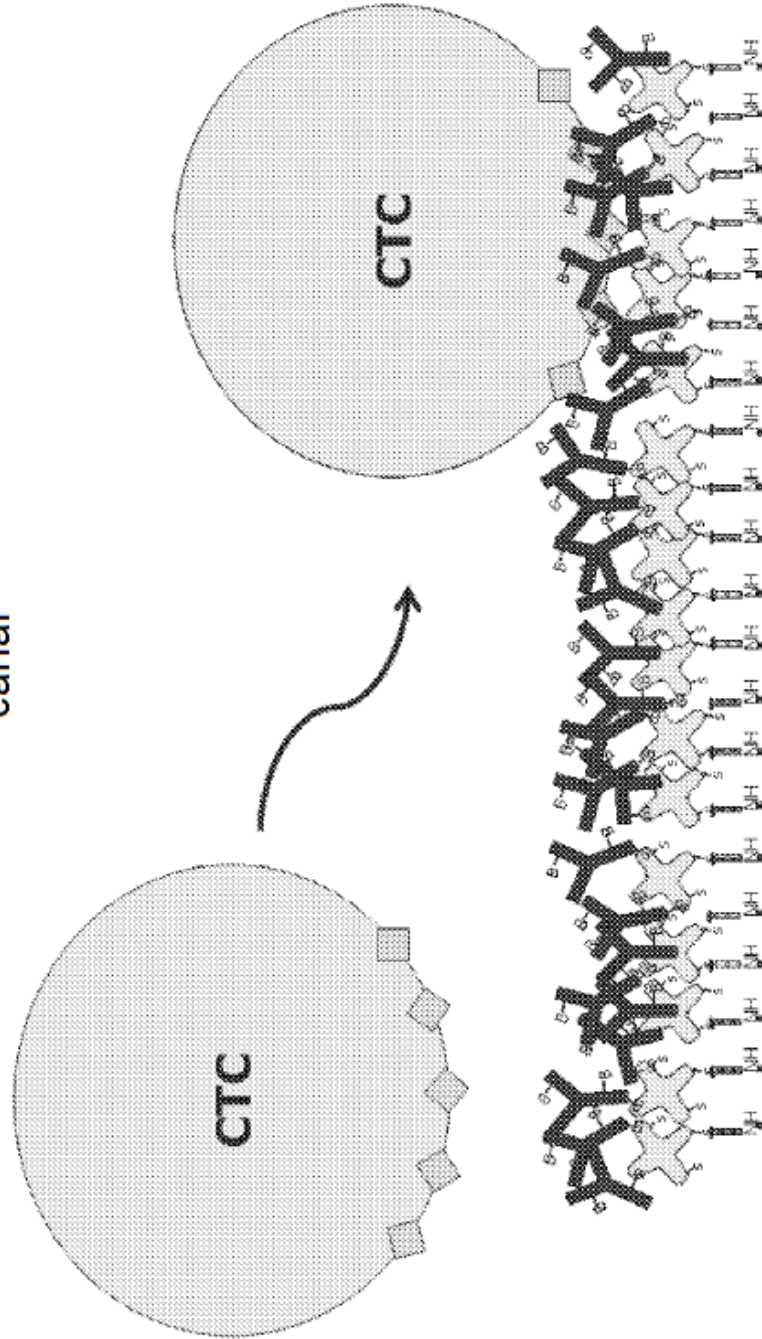


FIGURA 2

FIGURA 3

Células premarcadas con Ac antes del enriquecimiento en el canal de estreptavidina

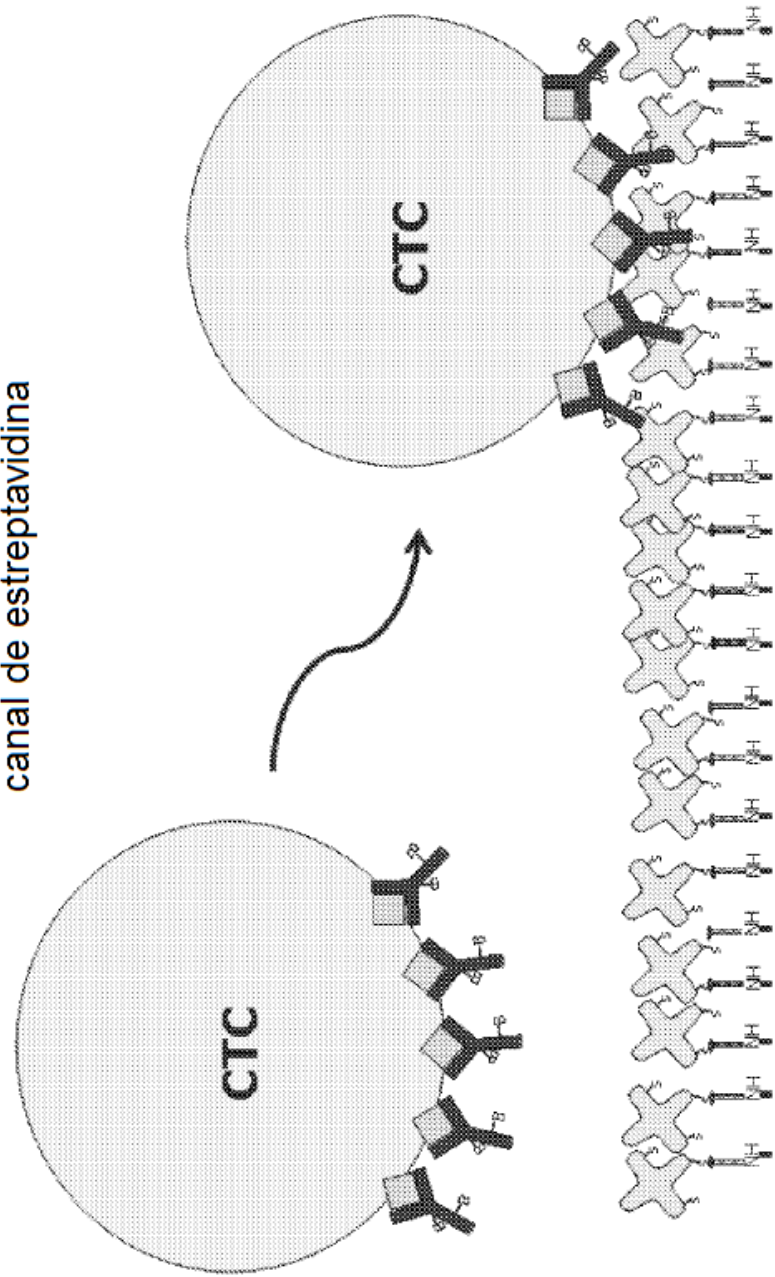


FIGURA 4

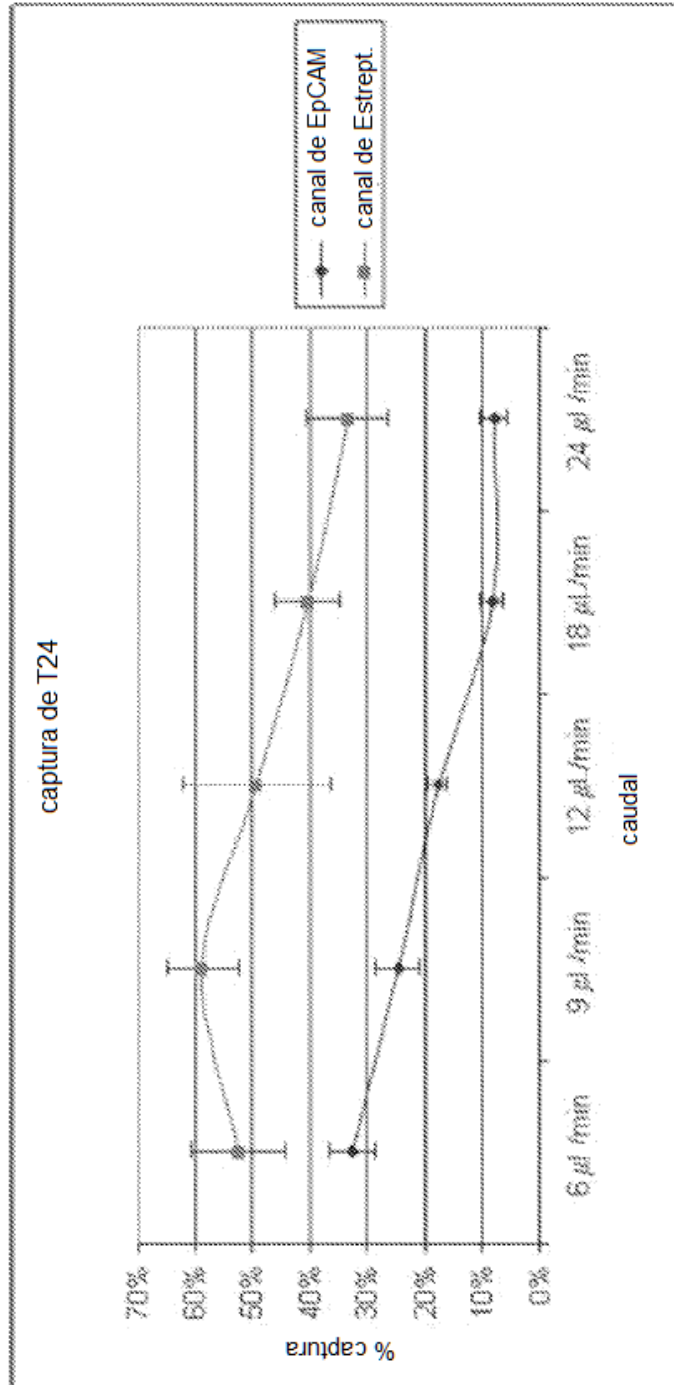


FIGURA 5

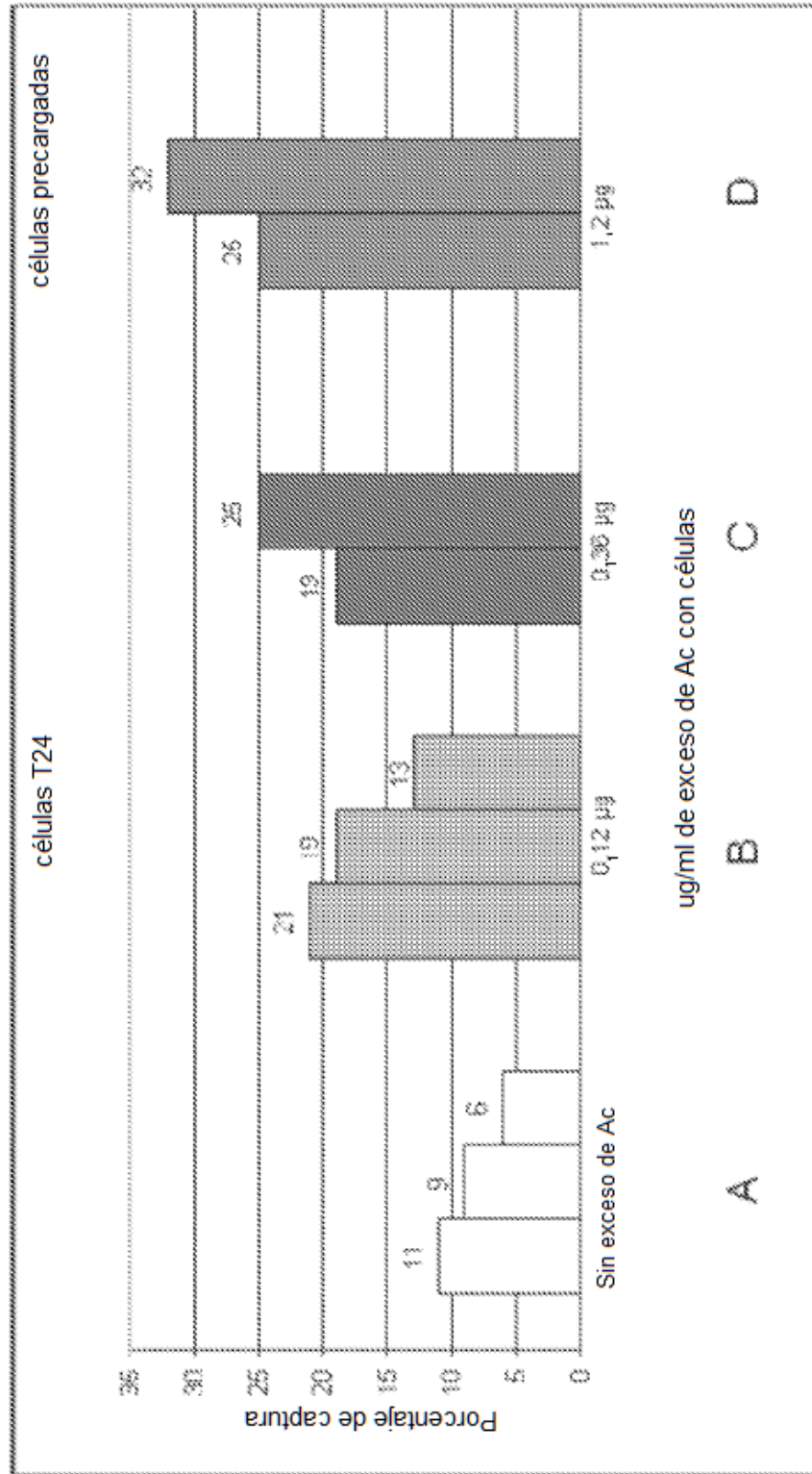


FIGURA 6

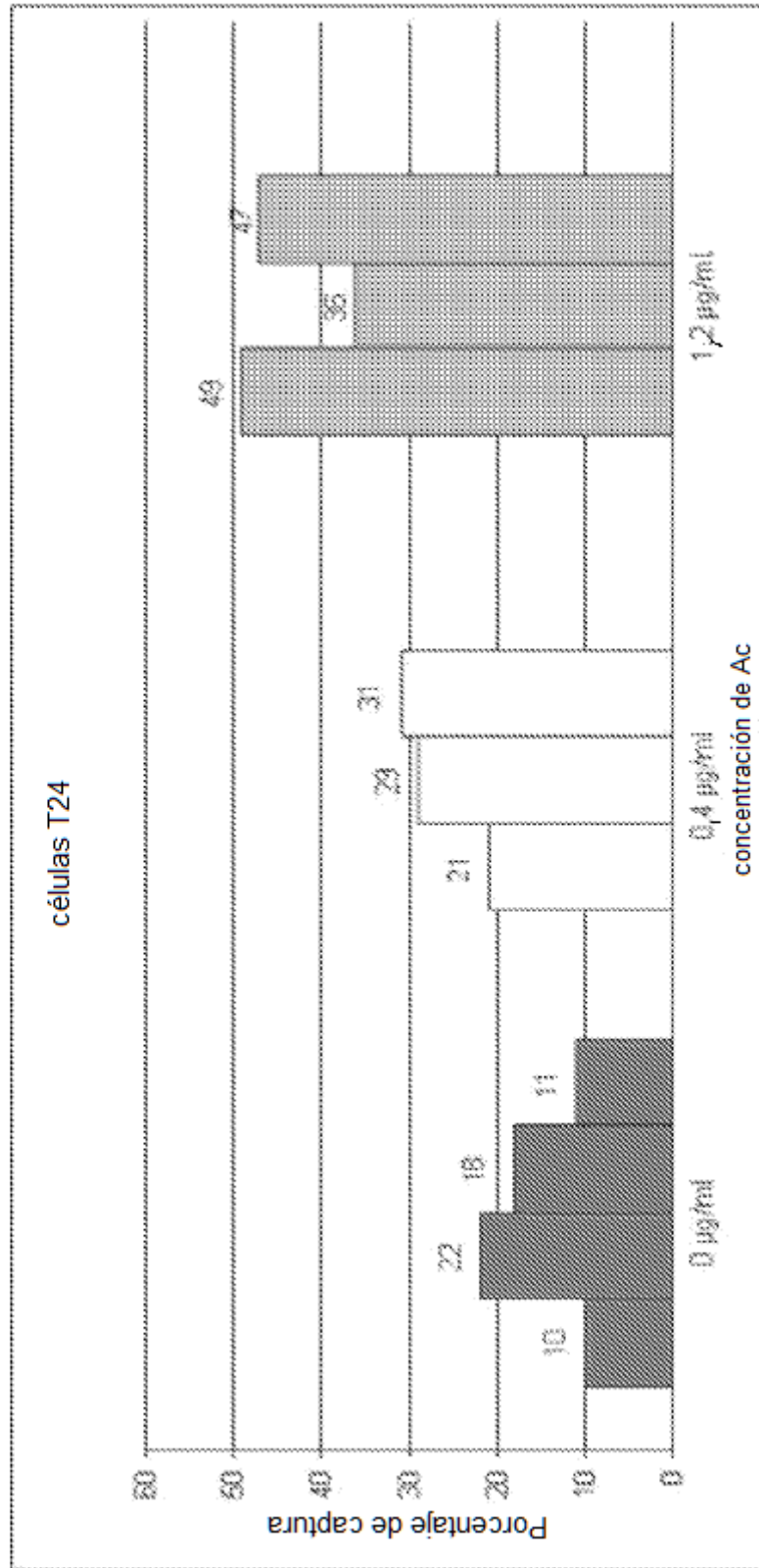


FIGURA 7

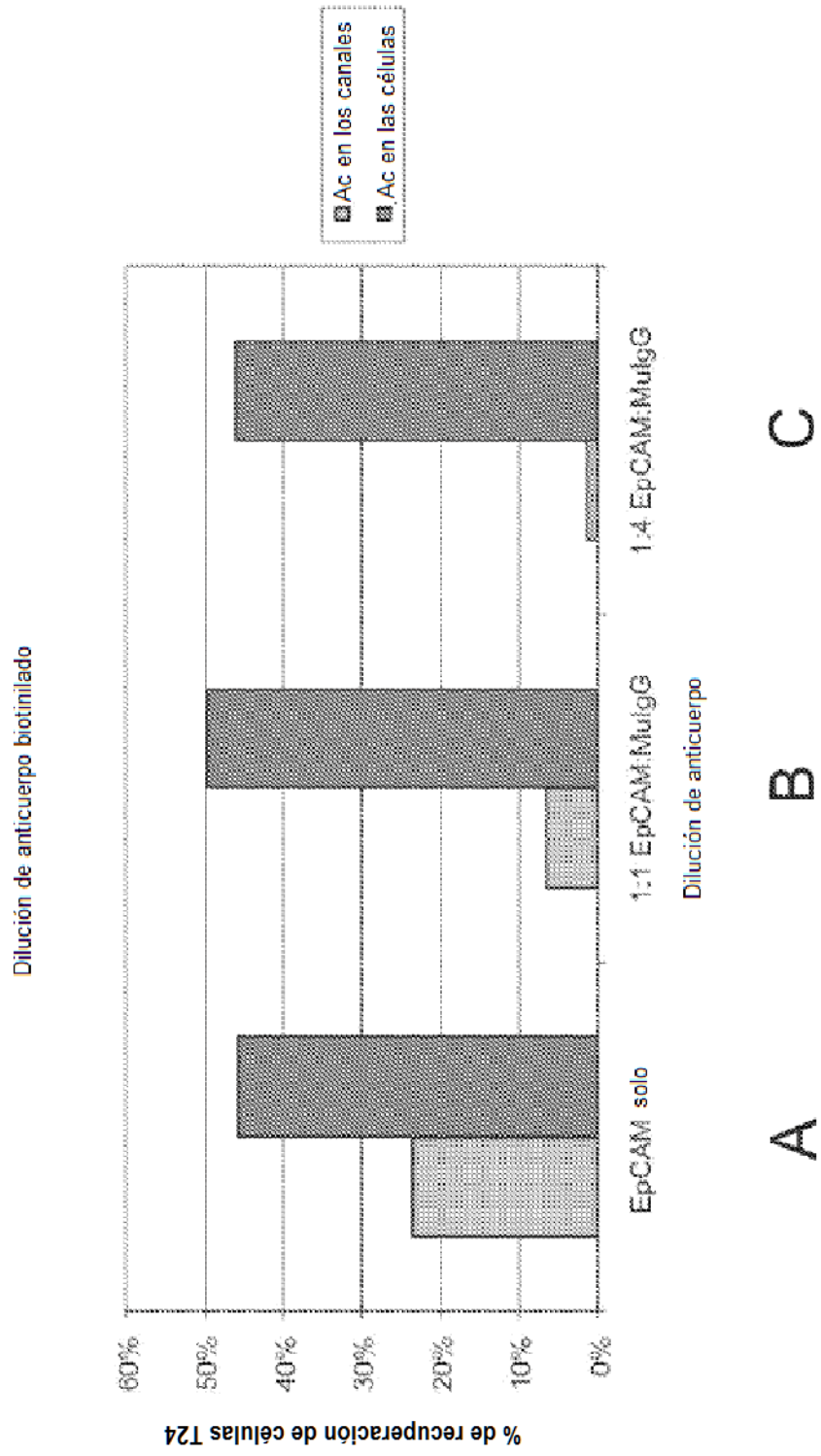
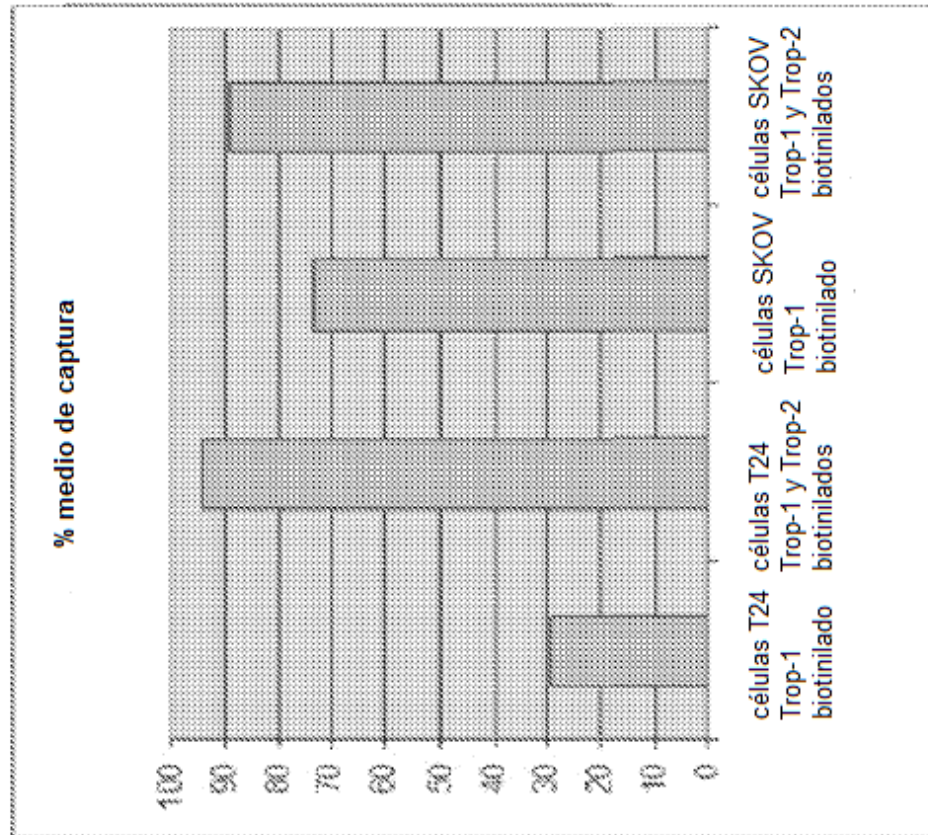


FIGURA 8



	% PROM	% D.E.
células T24 Trop-1 biotinilado	28,8	1,01
células T24 Trop-1 y Trop-2 biotinilados	94,2	1,15
células SKOV Trop-1 biotinilado	73,7	3,08
células SKOV Trop-1 y Trop-2 biotinilados	89,1	3,6

FIGURA 9

Captura en microfluidos de células MDA-MB-231 enriquecidas durante la noche en 100 ml de sangre

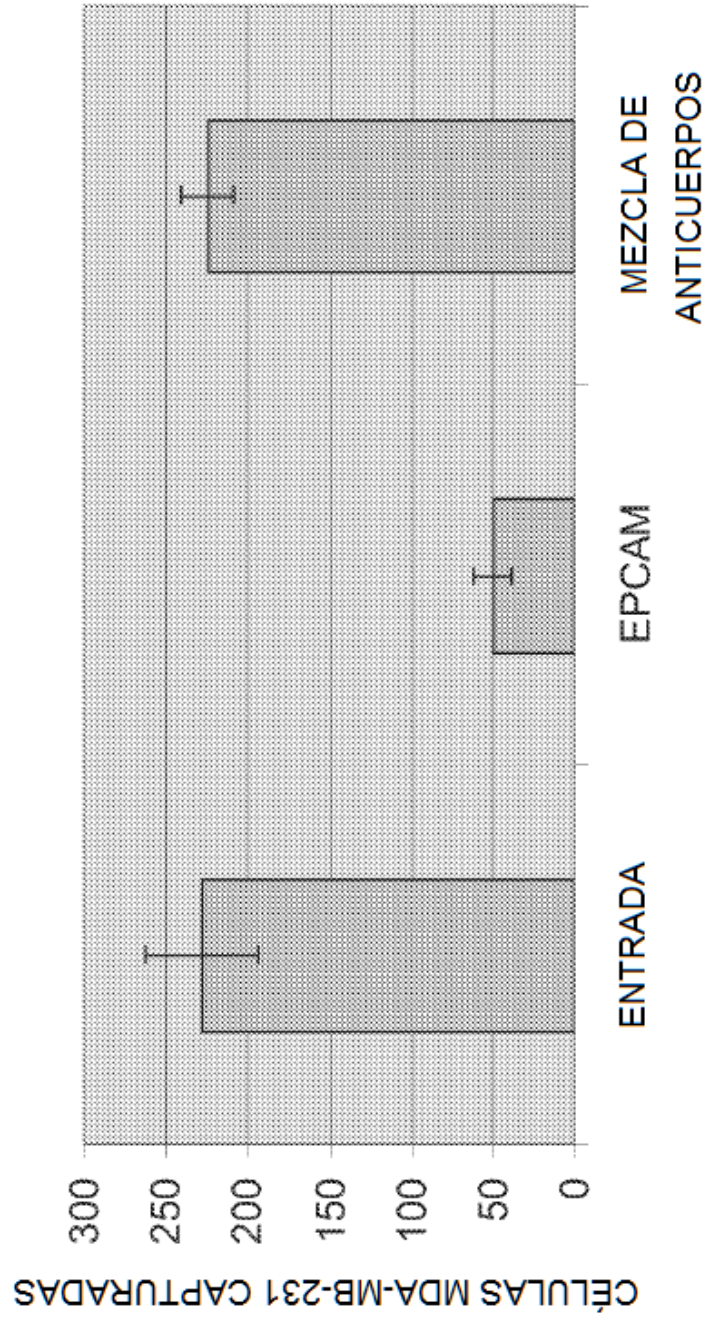


FIGURA 10

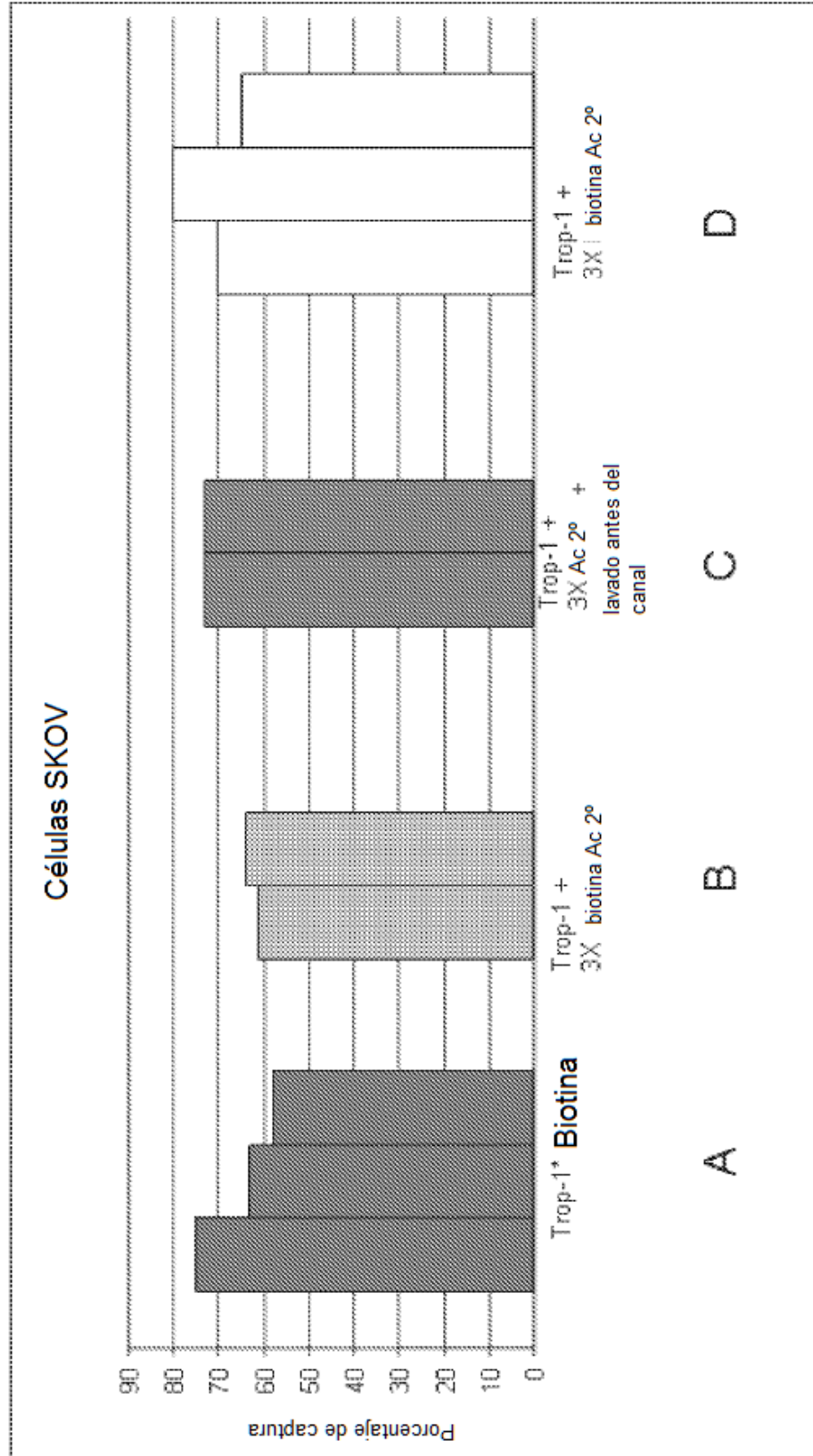


FIGURA 11

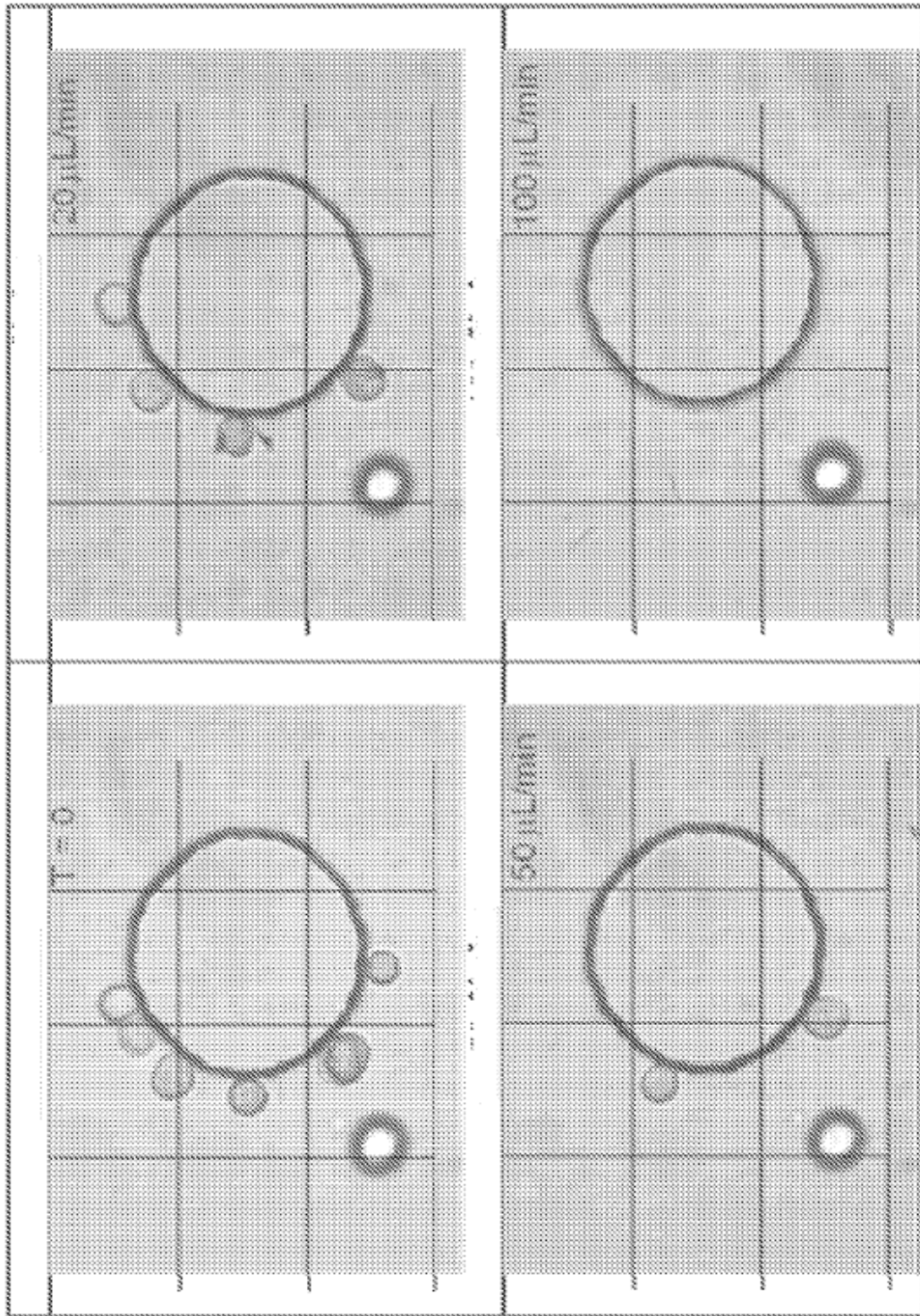


FIGURA 12

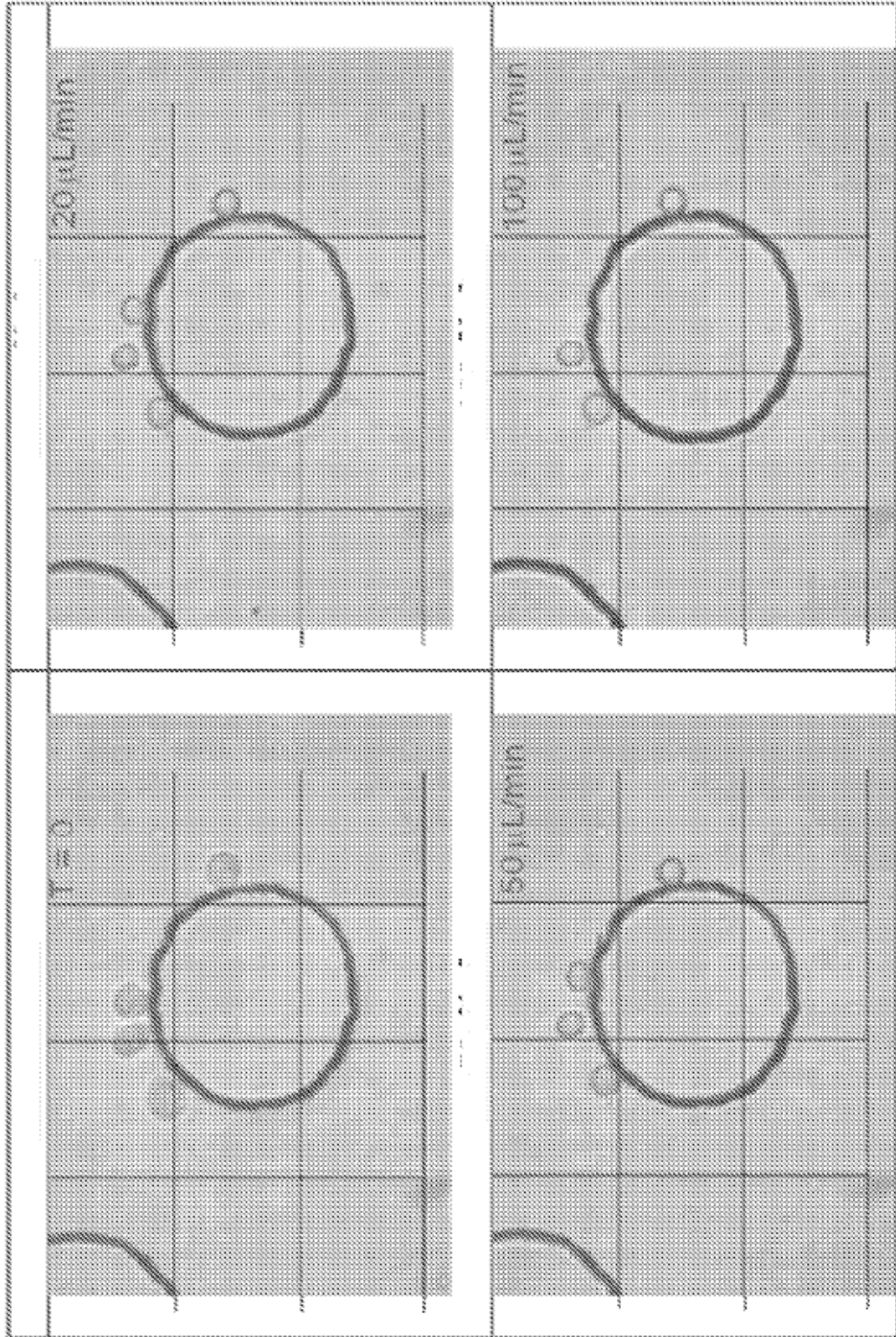


FIGURA 13

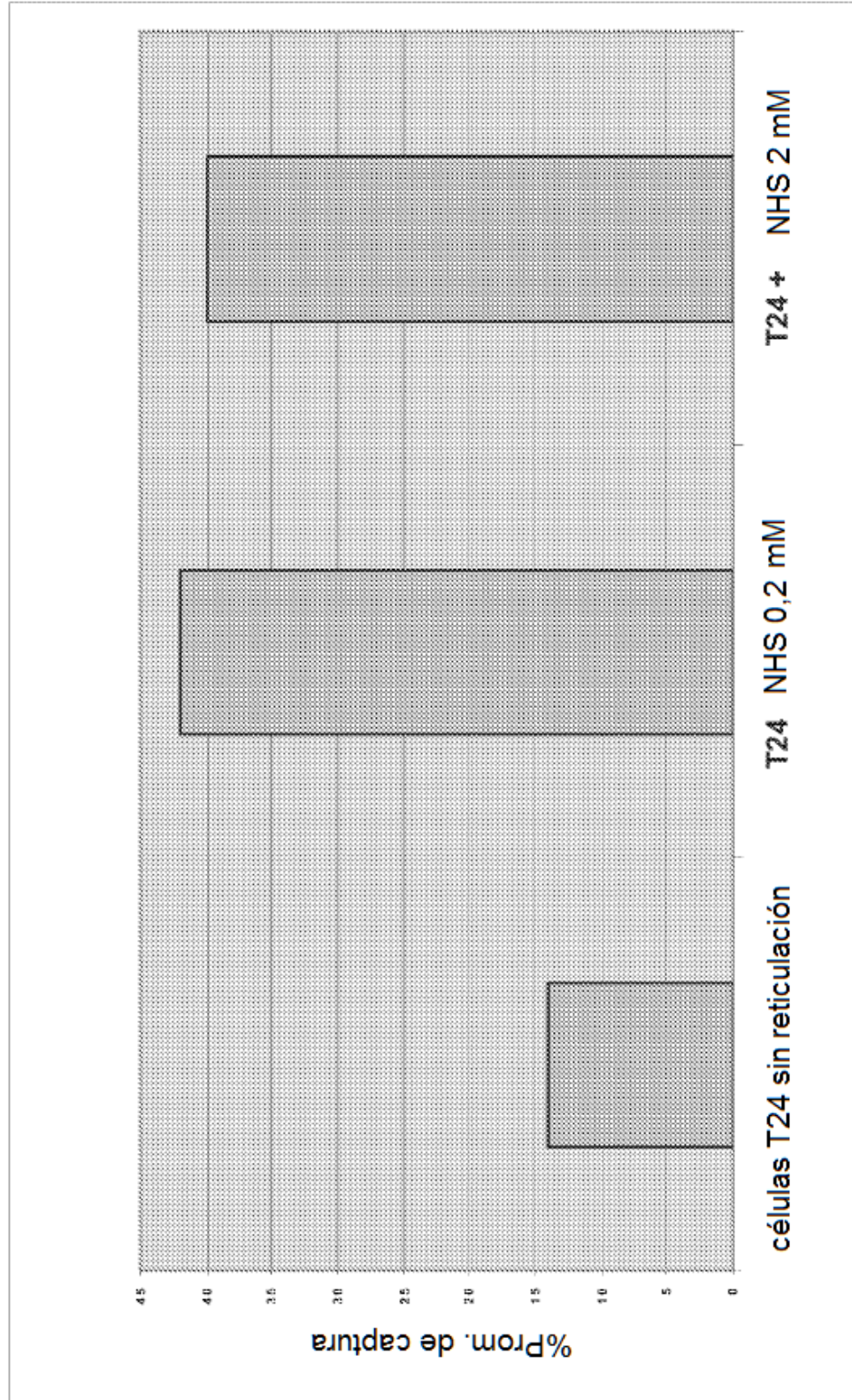
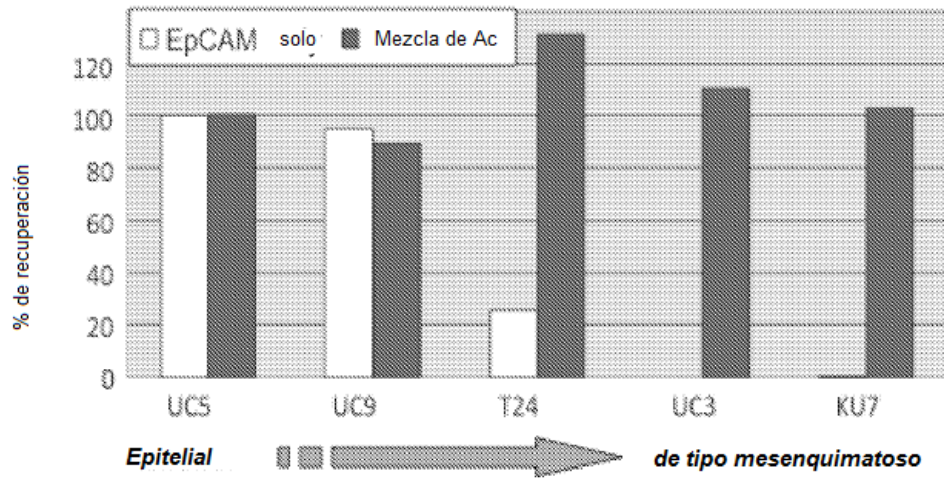
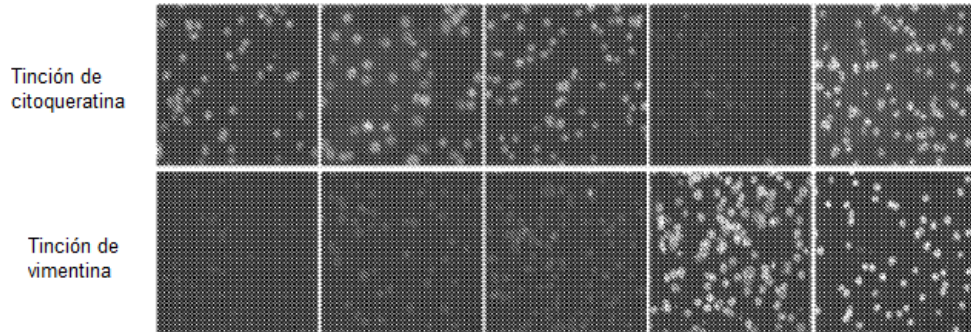


FIGURA 14 :



6B5	↑	↑	↑		
CD318	↑	↑	↑	↑	
EGFR	↑		↑	↑	↑
MOV18					↑
Trop-2	↑	↑	↑		
EpCAM	↑	↑			

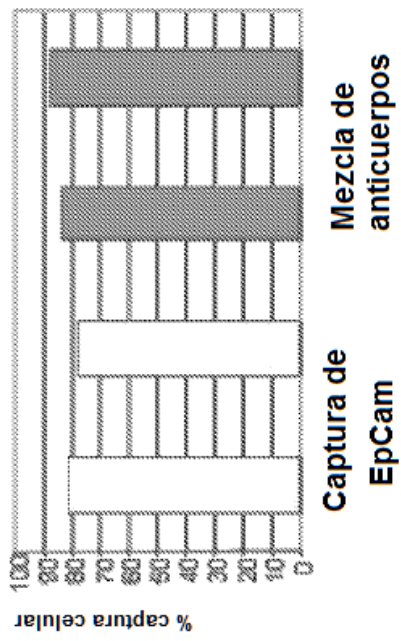


Figura 15A

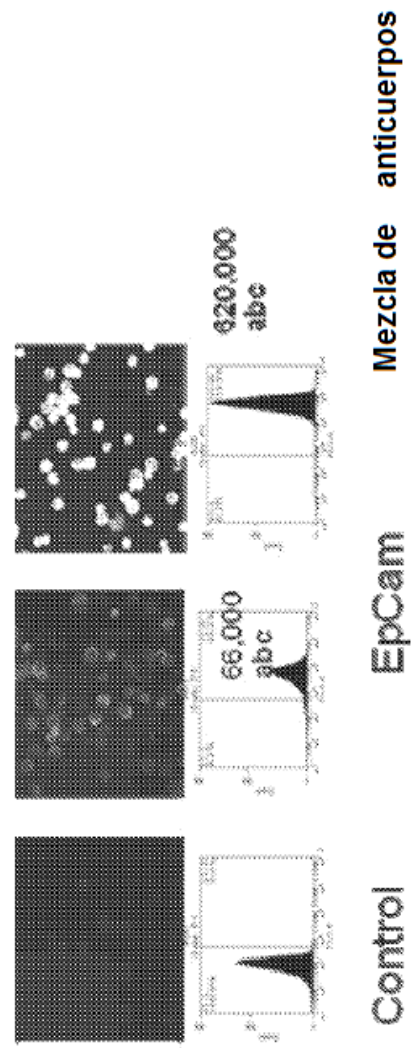


Figura 15B

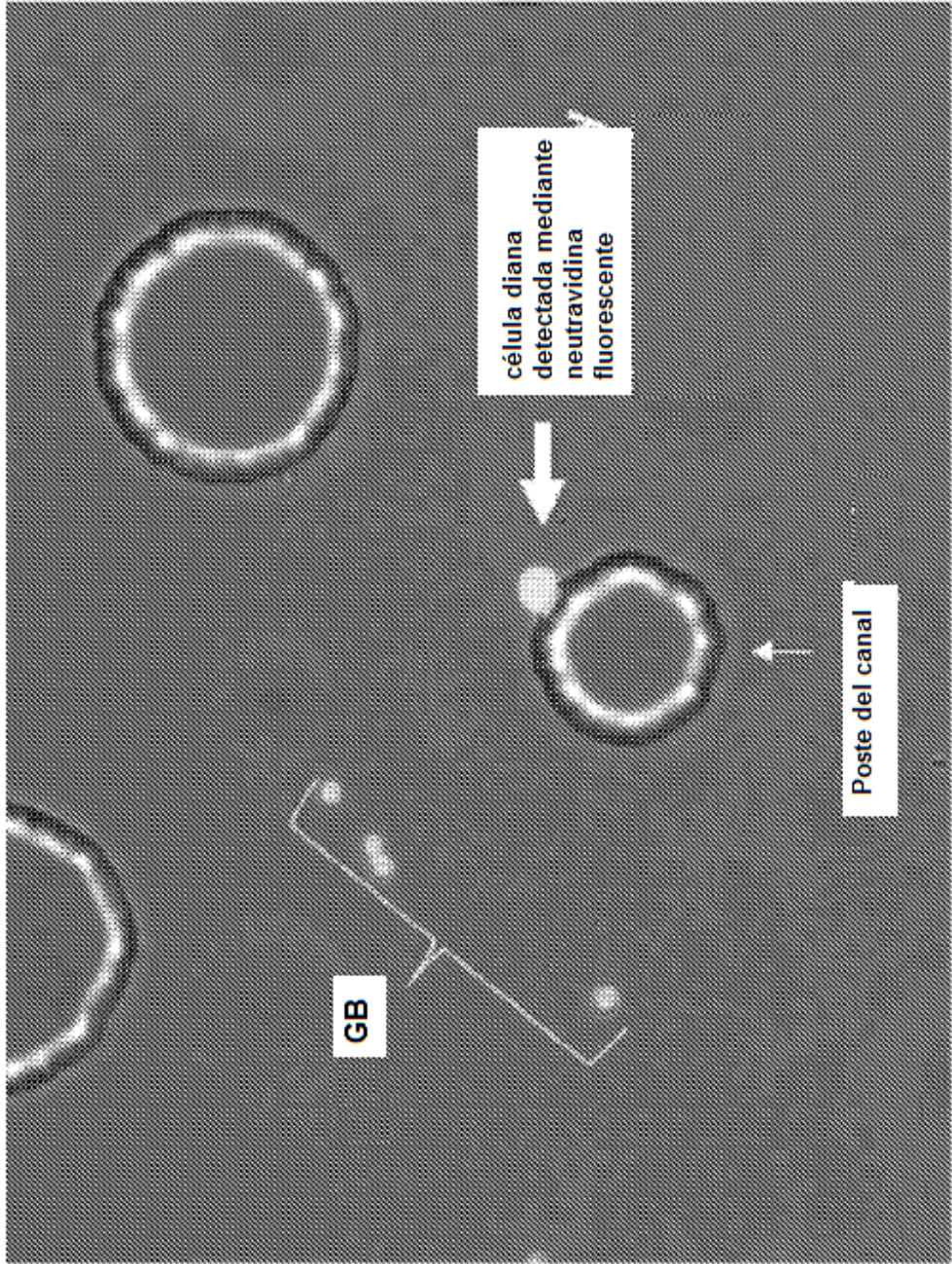


FIGURA 16

FIGURA 17

