

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 997**

51 Int. Cl.:

B01L 3/14 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2001** **E 01129402 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016** **EP 1221342**

54 Título: **Procedimiento de separación de células de una muestra**

30 Prioridad:

08.01.2001 US 756590

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

28.10.2016

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417, US

72 Inventor/es:

JURGENSEN, STEWART RUSSELL y
LLOYD, SHEILA ANN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 587 997 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de separación de células de una muestra

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a un procedimiento para separar un componente diana y, en particular, células diana de una muestra. Más en particular, la invención está dirigida a un procedimiento de separación de células diana de una muestra biológica mediante una separación positiva o negativa y un centrifugado.

Antecedentes de la invención

10 Se conocen numerosos procedimientos en la técnica para separar diversos constituyentes de líquidos biológicos y, en particular, muestras de sangre. Por ejemplo, el análisis de componentes sanguíneos normalmente implica el centrifugado de sangre completa anticoagulada para separar las células del plasma y para separar las diversas células en capas según la densidad de las células. Después del centrifugado, se retira la fracción de plasma de la muestra. La toma de muestras de sangre normalmente se lleva a cabo en un tubo al vacío y luego se consigue la separación de células mediante centrifugado del tubo de toma de muestras. El tubo puede contener un cuerpo separador que está fabricado de un material plástico con un peso específico que permitirá al separador asentarse durante la etapa de centrifugado sobre la parte superior de la capa componente formada en la muestra de sangre. El separador evita la mezcla de las fracciones componentes formadas y no formadas en la muestra de sangre centrifugada. El separador también estabiliza las capas centrifugadas para un su análisis y separación.

20 Otro procedimiento para recuperar células de una muestra de sangre utiliza un inserto adyuvante colocado en el tubo de centrifugado que contiene la muestra antes del centrifugado. El inserto está fabricado de un material plástico transparente y cabe en el interior del tubo de centrifugado. El inserto se desliza en el interior del tubo cuando es centrifugado para forzar a la muestra a entrar en el orificio del inserto. Las células a ser recolectadas de la muestra se juntan en el orificio del inserto, formando, de ese modo, capas de constituyentes que se separan según el peso específico de los constituyentes. El orificio del inserto tiene una dimensión para hacer que las capas se alarguen en comparación con el grosor de la capa que se formaría de lo contrario en el tubo sin el inserto. Las capas resultantes en el orificio pueden ser diferenciadas y retiradas del orificio utilizando una jeringa hipodérmica u otra cánula. En la patente U.S. nº 5.393.674 de Levine et al. se da a conocer un ejemplo de este procedimiento y de este dispositivo.

25 En la patente U.S. nº 5.707.876 de Levine se da a conocer otro procedimiento y otro aparato para separar constituyentes de una muestra. Este dispositivo utiliza uno o más marcadores de límite que se colocan en el tubo antes del centrifugado. Los marcadores se deslizan por el interior del tubo cuando es centrifugado e identifican los límites de las capas constituyentes que se separan gravimétricamente durante el centrifugado. Se inserta una cánula en el tubo a través de un tapón elastomérico para inyectar un líquido o gas en el tubo. Este material inyectado desplaza la muestra centrifugada y los marcadores de límite hacia un extremo del tubo para exprimir la muestra centrifugada del tubo.

35 Otros procedimientos para separar componentes de una muestra biológica utilizan microperlas paramagnéticas que tienen un antígeno acoplado a las mismas. Se mezcla la muestra con las microperlas y se incuban para asociar los constituyentes a la microperla. Entonces, se somete a la muestra a una separación magnética. En la patente U.S. nº 5.916.818 de Irsch et al. se da a conocer un ejemplo de este tipo de procedimiento.

40 Además, en la patente U.S. nº 5.834.217 de Levine et al. se da a conocer un procedimiento de diagnóstico que comprende muestras de sangre en un tubo transparente. El tubo contiene uno o más cuerpos tales como flotadores o perlas de plástico de distintas densidades. Cada uno de dichos cuerpos porta materiales de asociación con captura de analitos tales como anticuerpos. Se añade al menos un material de asociación marcado que también es específico para un epítipo en el analito diana a las muestras, de manera que se formen complejos de material de asociación marcado/analito/cuerpo en la muestra. Tras el centrifugado, los complejos se asentarán en distintas áreas en el tubo según la densidad respectiva de los cuerpos.

45 Estos procedimientos anteriores han sido eficaces, en general, para su fin concebido. Sin embargo, existe una necesidad continua en la industria de procedimientos mejorados para separar las células de una muestra biológica.

Sumario de la invención

50 La presente invención está dirigida a un procedimiento para separar células de una muestra y, en particular, una muestra biológica. En consecuencia, un objeto primario de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar un constituyente específico de una muestra biológica.

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la separación de un constituyente específico de un líquido biológico en concentraciones más elevadas que puede obtenerse mediante procedimientos anteriores.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar células seleccionadas de un líquido biológico con niveles reducidos de constituyentes contaminantes.

Otro objeto más de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar células raras de un líquido biológico, estando las células raras recolectadas sustancialmente libres de células mononucleares.

5 Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar células de una muestra biológica utilizando un soporte de material particulado que tiene un recubrimiento de un anticuerpo que tiene una afinidad para una célula diana en la muestra.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar un constituyente diana de una muestra biológica utilizando microperlas recubiertas de un anticuerpo que tiene una afinidad por los glóbulos blancos.

10 Otro objeto más de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar un componente diana de una muestra biológica centrifugando la muestra en presencia de un soporte de material particulado que tiene una selectividad positiva o negativa por el componente diana.

15 Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para recolectar células de una muestra biológica mezclando la muestra con una cantidad de partículas portadoras que contienen un anticuerpo que tiene una afinidad por los glóbulos blancos y teniendo las partículas una densidad mayor que la densidad de los glóbulos blancos para retirar los glóbulos blancos de la muestra.

Un objeto adicional de la invención es proporcionar un procedimiento de recolección de las células diana de una muestra biológica mezclando la muestra con una cantidad de perlas portadoras que contienen un anticuerpo que tiene una afinidad por las células diana y teniendo las perlas una densidad inferior a la densidad de los glóbulos blancos para retirar las células diana de la muestra.

20 Otro objeto más de la invención es proporcionar un procedimiento para separar las células diana de una muestra y detectar las células diana en un tubo, separándose las células diana mezclando la muestra con perlas portadoras que tienen una afinidad bien por las células diana o bien por las células contaminantes.

Se consiguen los objetos y las ventajas de la invención proporcionando un procedimiento de recolección de componentes de un material de muestra. El procedimiento comprende las etapas de:

- 25 (i) proporcionar un material de muestra en un recipiente de muestreo, teniendo dicho recipiente de muestreo un flotador con un paso para recibir y alargar capas de componentes de muestra a ser recolectados de dicha muestra, siendo recibido dicho flotador en dicho recipiente, que tiene una dimensión y una forma complementarios al interior de dicho recipiente, e incluye resaltes que definen un canal longitudinal entre dicho flotador y dicho recipiente para recibir y alargar dicho componente diana durante el centrifugado,
- 30 (ii) proporcionar en dicho recipiente de muestreo un soporte de material particulado que tiene al menos un anticuerpo con una afinidad para asociarse con al menos un componente en dicha muestra asociada a dicho soporte de material particulado, y mezclar dicho soporte de material particulado con dicha muestra,
- 35 (iii) centrifugar dicho recipiente y dicha muestra con suficiente fuerza G para separar componentes de dicha muestra y para forzar a dicho soporte de material particulado y al componente diana de dicha muestra a entrar en dicho paso, y
- (iv) retirar dicho componente diana de dicho paso.

El anterior procedimiento es adecuado para recolectar un componente diana de una muestra de sangre completa. En una realización preferente el procedimiento comprende las etapas de proporcionar una muestra de sangre completa en un tubo de muestreo, conteniendo el tubo de muestreo un flotador dimensionado para caber en el interior del tubo de muestreo y que tiene un paso para recibir y alargar capas de constituyentes de sangre a ser recolectados de la muestra, mezclando la muestra con al menos un soporte de material particulado que contiene un anticuerpo que tiene una afinidad de asociación con un constituyente específico de muestra, centrifugar el tubo y la muestra con suficiente fuerza G para mover el flotador hacia un extremo del tubo y para forzar a un componente diana de la muestra a entrar en el paso, y retirar el componente diana del paso.

45 Estos objetos, ventajas y otras características destacadas de la invención serán más evidentes a partir de la vista de los dibujos adjuntos y de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción del dibujo

Lo siguiente es una breve descripción de los dibujos en los que:

- 50 La Figura 1 es una vista lateral en corte transversal del tubo de centrifugado en una realización, que no se encuentra bajo la invención reivindicada, que se muestra como el miembro de flotador colocado en el tubo;
- la Figura 2 es una vista en corte transversal del tubo de la Figura 1 tras el centrifugado;
- la Figura 3 es una vista en perspectiva de un dispositivo de separación por centrifugado en otra realización de la invención;
- la Figura 4 es una vista en planta del flotador de la realización de la Figura 3; y
- 55 la Figura 5 es una vista lateral en corte transversal del flotador tomada a lo largo de la línea 5-5 de la Figura 4.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente invención está dirigida a procedimientos para recolectar un componente diana y, en particular, células diana de una muestra biológica. Más en particular, la invención está dirigida a procedimientos para recolectar células raras de una muestra biológica con menos células contaminantes presentes en las células raras recolectadas.

- 5 En una realización preferente, el procedimiento de recolección de un componente diana utiliza al menos un agente aglomerante con capacidad para asociarse con un componente de la muestra para contribuir a aislar o mejorar el componente diana durante la separación por centrifugado. El agente aglomerante puede ser un anticuerpo seleccionado para tener una afinidad bien por el componente diana o bien por uno o más componentes contaminantes. En realizaciones preferentes de la invención, se proporciona el agente de afinidad de unión, tal como un anticuerpo, como un recubrimiento sobre un soporte de material particulado que tiene un tamaño y una densidad de partícula que es compatible con el componente que está siendo recolectado para aumentar la separación y la recuperación del componente diana de la muestra. En las realizaciones de la invención expuestas a continuación con más detalle, el soporte de material particulado puede tener una densidad menor o mayor que la densidad del constituyente contaminante de la muestra.
- 10
- 15 En realizaciones adicionales, el procedimiento está dirigido a recolectar células raras y, en particular, células tumorales de muestras biológicas y, en particular, muestras de sangre completa anticoagulada. El procedimiento puede ser utilizado para recuperar una variedad de otros tipos de célula, tales como células madre y células fetales, de muestras de sangre.

- 20 El procedimiento de la invención en una realización somete a la muestra biológica a una separación por centrifugación, mezclándose la muestra con un soporte de material particulado que tiene un anticuerpo u otros agentes de afinidad de unión unidos a la superficie del soporte de material particulado. Preferentemente, la etapa de centrifugado utiliza un dispositivo de recolección por centrifugado. Preferentemente, se proporcionan el anticuerpo como un recubrimiento sobre la superficie del soporte de material particulado. El soporte de material particulado en las realizaciones preferentes es una cantidad de microperlas fabricada de una resina adecuada de plástico no reactivo. Ejemplos de resinas adecuadas de plástico incluyen el poliestireno, el polidivinilbenceno y el polivinilcloruro.
- 25

Se pueden producir las microperlas para ser utilizadas en el procedimiento de la invención mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. En realizaciones de la invención, las microperlas tienen un tamaño de partícula que varía desde 0,05 μm hasta 7 μm , y normalmente desde 4 μm hasta 5 μm .

- 30 El soporte de material particulado, tal como las microperlas de plástico, tiene una densidad que complementa los diversos componentes de la muestra para permitir un enriquecimiento del componente diana y, en particular, para permitir el enriquecimiento de las células raras. En una realización, el soporte de material particulado incluye un anticuerpo que tiene una afinidad de unión con el componente diana, tal como células tumorales. En realizaciones adicionales, se pueden utilizar otros agentes de afinidad de unión. En general, se creía que después del centrifugado, se concentraban las células tumorales en la superficie de contacto de la región plaqueta/plasma y por encima de la mayoría de glóbulos blancos más densos. En general, las células tumorales recolectadas tienen una concentración elevada de células mononucleares contaminantes. Ahora se ha descubierto que las células tumorales no se concentran siempre en la superficie de contacto entre las capas de células y son difíciles de recuperar sin una contaminación significativa de otras células interferentes. En una realización de la invención, el soporte de material particulado tiene una densidad que es menor que la densidad de los glóbulos blancos, de forma que el soporte de material particulado y las células tumorales que están asociadas al soporte, o capturadas en el mismo, están concentradas por encima de la capa de glóbulos blancos.
- 35
- 40

- 45 En una primera realización de la invención, el procedimiento de recolección y de enriquecimiento de un componente diana es un procedimiento de selección positiva que comprende las etapas de poner en contacto el líquido de muestra con un agente aglomerante que tiene capacidad de unirse con el componente diana, y centrifugar la muestra con un dispositivo con capacidad para expandir capas constituyentes y enriquecer el componente diana. Entonces, se puede recolectar el componente diana y puede ser procesado para identificar y cultivar el componente mediante procedimientos conocidos. Ejemplos de procedimientos adecuados de identificación incluyen una citometría de flujo y una amplificación molecular de ácido nucleico.

- 50 El centrifugado en una realización, que no se encuentra bajo la invención reivindicada, se lleva a cabo utilizando un dispositivo 10 de centrifugado según se muestra en las Figuras 1 y 2. El dispositivo 10 en la realización ilustrada, incluye un recipiente, tal como un tubo 12, que está fabricado, preferentemente, de vidrio u otro material transparente, tal como plástico. El tubo 12 tiene un extremo inferior cerrado 14 y un extremo superior abierto 16. Se coloca un tope 18 en el extremo superior abierto 16 para cerrar el tubo 12. Preferentemente, el tope 18 está fabricado de un material elastomérico o similar a caucho adecuado que puede ser perforado por medio de una cánula, aguja u otro dispositivo de perforación. El tope 18 tiene una porción 20 de cuerpo sustancialmente cilíndrica que tiene una dimensión externa para formar un encaje ajustado por fricción en el extremo superior 16 del tubo 12. Un reborde 21 se extiende radialmente hacia fuera desde un extremo superior del tope 18 para acoplarse con el extremo superior 16 del tubo 12.
- 55

El tubo 12 tiene una longitud y un diámetro adecuados para centrifugar un líquido de muestra. En una realización, el tubo 12 tiene una longitud de aproximadamente 75 mm, un diámetro interno de aproximadamente 40 mm y una capacidad de aproximadamente 0,9 ml.

5 Se dispone un flotador 22 en el tubo 12, según se muestra en la Figura 1. El flotador 22 está dimensionado para encajar ajustadamente en el tubo 12 y deslizarse por la longitud del tubo 12 durante el centrifugado de la muestra. El flotador 22, en la realización ilustrada, incluye un recubrimiento externo 24 que tiene una forma cilíndrica que complementa la superficie interna del tubo 12. El recubrimiento externo 24 está fabricado, preferentemente, de un material flexible, tal como resina de vinilo, que puede deformarse ligeramente durante el centrifugado. El recubrimiento externo 24 puede expandirse y contraerse en respuesta a la fuerza centrífuga, de forma que el flotador 10 22 pueda deslizarse en el interior del tubo 12. El material flexible vuelve a su forma y a sus dimensiones originales en condiciones estáticas, de forma que el recubrimiento externo 24 contacte ajustadamente con la superficie interna del tubo 12 y pueda deslizarse en el interior del tubo 12 bajo la fuerza centrífuga. Se puede aplicar un lubricante de silicona a la superficie interna del tubo 12 para contribuir al movimiento deslizante del flotador 22.

15 El flotador 22 incluye un recubrimiento interno 26 que tiene un paso u orificio axial 28 que forma un paso. El recubrimiento interno 26 está acoplado al recubrimiento externo 24 por medio de un agente adherente u otro procedimiento adecuado. El recubrimiento interno 26 está fabricado de un material rígido que es estable dimensionalmente durante el centrifugado, de forma que no se produzca sustancialmente ninguna distorsión durante el centrifugado. El orificio axial 28 tiene una longitud y un diámetro adecuados para expandir una fracción del material de muestra durante el centrifugado. En una realización de la invención, el orificio axial 28 tiene un diámetro 20 interno de aproximadamente 1,265 mm y una longitud de aproximadamente 4,0 mm. Preferentemente, el recubrimiento interno 26 está fabricado de un plástico tal como poliestireno que no interfiere con los componentes de la muestra. Se concibe que el flotador 22 sea ejemplar de un dispositivo adecuado de centrifugado con capacidad para separar y expandir una fracción celular. Se comprenderá que hay otros dispositivos que pueden utilizarse durante el centrifugado para separar fracciones de células raras. Normalmente, los dispositivos adecuados incluyen un paso o un área estrechados para alargar capas constituyentes durante el centrifugado para permitir la separación 25 de las capas constituyentes.

El flotador 22 está dimensionado para caber en el tubo 12 y deslizarse por el interior del tubo 12 mientras se centrifuga para asentarse entre las capas de densidad seleccionada del líquido de muestra y forzar al componente 30 diana a entrar en el orificio axial 28 del flotador 22. El orificio axial 28 del flotador 22 tiene un volumen interno adecuado para recoger una porción sustancial del componente diana. El volumen interno y el diámetro del flotador expanden de forma eficaz la capa del componente diana. En la patente U.S. nº 5.393.674 de Levine et al. se da a conocer un ejemplo de este tipo de dispositivo de recolección de células.

Se selecciona el flotador 22 para que tenga una densidad para complementar el componente diana y la muestra, de forma que el componente diana se junta en el orificio axial 28 permitiendo que el flotador 22 se asiente en un punto 35 predeterminado en la muestra. En una realización de la invención, el flotador 22 tiene una densidad para asentarse entre la capa resultante de plasma y la capa de glóbulos rojos después del centrifugado. En la presente realización, las células raras que se juntan normalmente en la superficie de contacto entre las capas de plasma y de glóbulos rojos que se juntan en el orificio axial 28 donde pueden ser recuperadas.

Se centrifuga la muestra a una tasa suficiente para separar los diversos constituyentes en capas. El centrifugado 40 puede ser a una velocidad para producir una fuerza de centrifugado de 400 G hasta 800 G, dependiendo del líquido de muestra. En realizaciones, el centrifugado puede producir una fuerza de 1.000 G o más.

El procedimiento de la invención puede ser una selección positiva o una selección negativa para recolectar componentes, y en particular células raras. En el procedimiento de selección positiva, se mezcla un líquido de muestra con al menos un anticuerpo que tiene una afinidad por el componente diana. Una selección negativa mezcla 45 la muestra con un anticuerpo que tiene una afinidad por las células contaminantes, tales como leucocitos y/o glóbulos rojos. Los reactivos de anticuerpos adecuados de selección negativa en forma de conjugados y complejos especializados están disponibles en StemCell Technologies Inc. y Miltenyi BioTech GmbH. Los anticuerpos no derivados están disponibles en otras fuentes, tales como Pharmagen, Inc. Entonces, se puede centrifugar la mezcla resultante utilizando el dispositivo flotador de recolección para recolectar el componente diana enriquecido. Antes del 50 centrifugado, se puede combinar la muestra con un medio de gradiente de densidades como se conoce en la técnica para aumentar la separación del componente diana.

El procedimiento de recolección de selección positiva en una realización de la invención utiliza un soporte de material particulado que tiene un recubrimiento de anticuerpo con una afinidad hacia el componente diana. En realizaciones preferentes, el soporte de material particulado es una cantidad de microperlas de plástico con un 55 recubrimiento de un anticuerpo con una afinidad de asociación con las células raras a ser recolectadas y, en particular, células tumorales.

La densidad de las microperlas y la densidad del flotador están coordinadas para recoger las microperlas en el orificio axial del flotador. La recolección de selección positiva utiliza microperlas que tienen un tamaño de partícula de: 0,05 µm a 7 µm, y normalmente de 4 a 5 µm, y una densidad inferior a la de los glóbulos blancos. Las

microperlas pueden tener una densidad en el intervalo de 1,00 a 1,05 y, preferentemente, 1,02 a 1,03. Las microperlas y las células raras capturadas tienen una densidad de forma que están concentradas en el flotador cuando se centrifuga la muestra y el flotador. El flotador tiene una densidad apropiada, de forma que el flotador se asienta en la muestra después del centrifugado, donde se asientan normalmente las células raras. En la presente realización, las microperlas son suficientemente ligeras para flotar por encima de las capas centrifugadas de glóbulos blancos y rojos. Preferentemente, el flotador tiene una densidad para flotar por encima de las capas de glóbulos blancos y rojos para recolectar las microperlas.

Las microperlas están fabricadas de un material adecuado que es no reactivo con el componente diana y, en particular, es no reactivo con las células raras. Los materiales adecuados incluyen poliacrilamidas, poliuretanos, polisulfonas, resinas fluoradas o cloradas, tales como polivinilcloruro, polietileno, polipropileno, policarbonatos y poliésteres. El tamaño de partícula es normalmente de 4 a 5 μm , aunque el tamaño de partícula puede variar dependiendo del componente diana y del diámetro interno del flotador. Un número de microperlas disponibles comercialmente tienen un antígeno adherido a la superficie de las microperlas. El anticuerpo puede estar unido directamente a la superficie de la microperla o por medio de un agente de adherencia intermedio. Las microperlas adecuadas recubiertas de anticuerpos están disponibles comercialmente en Miltenyi Biotec GmbH. Un ejemplo de microperla adecuada está disponible en Miltenyi Biotec con el nombre comercial MACS CD 27.

El anticuerpo en el procedimiento de selección positiva tiene una afinidad de asociación con las células raras y está seleccionado según las células raras diana a ser recolectadas de la muestra. Ejemplos de células raras a ser recolectadas incluyen células tumorales, células fetales. Ejemplos de células tumorales que pueden estar asociadas al soporte de material particulado pueden ser de origen epitelial y pueden estar localizadas o no localizadas. Las células tumorales pueden ser de la vejiga, del cerebro, de la mama, del colon, del riñón, del hígado, del pulmón, del ovario, del páncreas, de la próstata, del recto y del estómago. Las células tumorales también pueden tener la forma de sarcoma, tal como fibrosarcoma o rabdosarcoma, tumor hematopoyético del linaje linfóide o mielóide, melanoma, teratocarcinoma, neuroblastoma o glioma.

Preferentemente, las microperlas tienen un área superficial suficiente para contener una cantidad del anticuerpo seleccionado para unirse con una cantidad eficaz de las células raras que están siendo seleccionadas. La cantidad de las microperlas combinadas con la muestra puede variar con la afinidad del anticuerpo, con la concentración de las células raras en la muestra, con la naturaleza de la muestra y con el volumen de la muestra.

El procedimiento de la invención es adecuado para ser utilizado en la recolección de células raras de diversos líquidos corporales y, en particular, sangre anticoagulada. Otros líquidos que pueden ser analizados en busca de un contenido de células raras incluyen la orina, la saliva, el líquido linfático, el líquido espinal, el semen, el líquido amniótico, los líquidos de cavidades y los extractos de tejido.

Un procedimiento, que no se encuentra bajo la invención reivindicada, se lleva a cabo utilizando el tubo 12 de centrifugado y el flotador 28. En realizaciones preferentes, se vacía o se llena el tubo 12 con un gas inerte a una presión interna subatmosférica. La muestra que ha de ser sometida a ensayo es transferida de un tubo primario de toma de muestras por medio de un dispositivo de transferencia que tiene una aguja o cánula doble de perforación. La aguja se extiende desde el dispositivo de transferencia hasta el tubo perforando el tope en el tubo 12. La presión reducida en el tubo 12 succiona la muestra de líquido al interior del tubo 12. Se puede proporcionar un gel tixotrópico en el tubo 12 según se conoce en la técnica para preservar la formación de bandas en la muestra cuando es centrifugada. Se pueden añadir diversos agentes de separación adicionales, tinciones y similares al tubo 12 para promover la separación y la identificación de componentes. Se proporcionan las microperlas que contienen el anticuerpo en el tubo 12 y son mezcladas con la muestra de líquido mediante una sacudida o agitación suave. Entonces, se incuba la muestra para unir el componente diana a las microperlas.

Se centrifuga el tubo, el flotador y la muestra a una velocidad suficiente y durante un tiempo necesario para separar los constituyentes de la muestra en capas y forzar a las microperlas y al componente diana atrapado a entrar en el orificio axial del flotador. La muestra puede ser centrifugada a una velocidad para proporcionar suficiente fuerza de centrifugado para provocar la separación de las capas. Se detiene lentamente y se retira el tubo de la centrifugadora. Entonces, una aguja o cánula perfora el tope y se inserta en el orificio axial para retirar la muestra que contiene las microperlas. La muestra recolectada es procesada y analizada adicionalmente mediante diversos procedimientos según se conoce en la técnica. En una realización, las células recolectadas son analizadas utilizando un citómetro de flujo. Las células raras u otros componentes diana pueden ser lavados y separados de las microperlas y del anticuerpo de unión mediante procedimientos conocidos. Las células raras recolectadas resultantes están significativamente enriquecidas en comparación con muchos procedimientos anteriores y tienen un nivel sustancialmente inferior de contaminante de glóbulos rojos y blancos.

En una realización de la invención, el procedimiento es un procedimiento de selección negativa para el enriquecimiento de células raras. Las células raras son enriquecidas utilizando un agente aglomerante que puede unirse con las células no raras contaminantes, tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos.

En realizaciones preferentes, el agente aglomerante puede unirse a uno o más glóbulos blancos y/o glóbulos rojos o unirse a antígenos de superficie en las células. Los agentes aglomerantes pueden ser anticuerpos que pueden

aglutinar los glóbulos blancos o unir los glóbulos blancos a los glóbulos rojos. Se pueden separar las partículas más grandes y más densas resultantes de las células no raras durante el centrifugado. Los anticuerpos adecuados que pueden unirse con las células no raras, y capturarlas, incluyen anticuerpos antihumanos. Ejemplos de anticuerpos adecuados que pueden ser utilizados para unirse con los glóbulos blancos (leucocitos) incluyen los anticuerpos leucocitarios CD tales como CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD28, CD36, CD42a, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD45RA, CD45RB, CD45RO, CD57 y CD61. Otros agentes aglomerantes que pueden ser utilizados incluyen una mezcla de CD45 antihumano, CD 19 antihumano, CD 14 antihumano y CD3 antihumano.

Preferentemente, los anticuerpos están asociados a la superficie de las microperlas como en las realizaciones anteriores. Las microperlas en el procedimiento de selección negativa tienen un tamaño de partícula adecuado para la muestra y el componente diana. En general, el tamaño de partícula varía desde 0,05 μm hasta 7 μm y, preferentemente desde 4 μm hasta 5 μm . En la presente realización, las perlas tienen, preferentemente, una densidad superior a la densidad de los glóbulos blancos y, más preferentemente de: 1,07 hasta 1,09 g/ml, y normalmente en el intervalo de 1,08 hasta 1,09 g/ml. De esta forma, las microperlas se hunden durante el centrifugado y las células raras se asientan por encima de las capas de glóbulos rojos y blancos. El flotador tiene una densidad para flotar sobre las capas de células no raras, de manera que las células raras se asienten en el orificio axial del flotador del que pueden ser retiradas.

El procedimiento de recolección de selección negativa es similar a la sección positiva expuesta anteriormente. Se proporciona el líquido de muestra en el tubo y es mezclado con las microperlas que contienen los anticuerpos de células no raras. Después de la incubación, se incuba y se centrifuga el tubo que contiene la mezcla durante un tiempo suficiente para provocar que las capas se separen y las células raras se junten en el orificio axial del flotador del que se pueden retirar las células raras.

En realizaciones adicionales de la invención, el procedimiento emplea dos microperlas que tienen distintos agentes de afinidad de unión para capturar dos componentes distintos. En una realización, se mezcla con la muestra una cantidad de primeras microperlas que tienen un agente de afinidad de unión con una afinidad por células raras, tales como células tumorales. Las primeras microperlas tienen una densidad para separarse de los glóbulos blancos y rojos. Las primeras microperlas tienen un tamaño de partícula, una densidad y un agente de afinidad de unión sustancialmente idénticos que las microperlas de la selección positiva de la anterior realización. También se mezcla con la muestra una cantidad de segundas microperlas que tienen un agente de afinidad de unión con una afinidad por los glóbulos blancos, glóbulos rojos o una combinación de los mismos proveniente de las células raras. Se centrifuga la mezcla resultante con el flotador, de forma que las primeras microperlas con las células raras capturadas se asientan en el paso axial, del que pueden ser recuperadas. Las segundas microperlas tienen un tamaño de partícula, una densidad y un agente de afinidad de unión sustancialmente idénticos que el procedimiento de selección negativa de la anterior realización. De esta forma, las segundas microperlas se separan de las primeras microperlas durante el centrifugado para separar las células contaminantes, tales como los glóbulos rojos y/o blancos de las células diana y de las primeras microperlas. Las primeras microperlas tienen un tamaño de partícula y una densidad para ser recogidas en el paso axial del flotador para recuperar las células diana.

Con referencia a la Figura 3, se muestra una realización del dispositivo 30 de centrifugado para ser utilizado en el procedimiento según la invención. El dispositivo 30 es particularmente adecuado para diversas manipulaciones de células después de la separación de una muestra. Por ejemplo, se pueden separar las células raras de una muestra y pueden ser sometidas a diversos procedimientos de detección y de verificación con el dispositivo 30. En la presente realización, el dispositivo 30 incluye un recipiente hueco 32 que tiene una forma sustancialmente rectangular. El recipiente 32 incluye una pared frontal 34, y una pared trasera opuesta 36 que tiene una longitud y una anchura. Las paredes laterales opuestas 38 y una pared inferior 40 se extienden entre la pared frontal 34 y la pared trasera 36 para formar una cavidad abierta 42. El recipiente 32 incluye un extremo abierto 44 para recibir un tope 46 para cerrar la cavidad 42. Preferentemente, el recipiente 32 está fabricado de un material transparente tal como vidrio o plástico.

El recipiente 32 está dimensionado para recibir un volumen de una muestra biológica adecuada para el análisis de un componente diana. En general, el recipiente 32 tiene un volumen de 8 ml a 10 ml y, preferentemente, aproximadamente de 9 ml. En la realización ilustrada, las paredes laterales 38 del recipiente 32 tienen una dimensión para definir un grosor de la cavidad 42 que es suficientemente delgado para visualizar, detectar y analizar un componente diana a través de la pared frontal 34. Ejemplos de procedimientos adecuados de detección y de análisis incluyen la microscopía para visualizar las células en la muestra. El recipiente 32 tiene, normalmente, una longitud de 7 cm a 8 cm, y una anchura aproximada de 3 cm a 4 cm. Las paredes laterales 38 están dimensionadas de manera que la cavidad 42 tenga un grosor de 3 mm a 6 mm y, preferentemente, aproximadamente de 4 mm.

El recipiente 32 incluye un flotador amovible 48 que puede deslizarse por el interior del recipiente 32 en la dimensión longitudinal de una forma similar a la anterior realización. El flotador 48 está dimensionado para caber en el interior de la cavidad 42 del recipiente 32 y tiene una dimensión externa que se corresponde con la dimensión interna del recipiente 32. Según se muestra en las Figuras 3-5, el flotador 48 tiene una base 50 con una superficie inferior 54

sustancialmente plana. La base 50 incluye un extremo anterior inclinado 56 y un extremo posterior inclinado 58. Hay acoplados varios resaltes 60 a la superficie superior 54 de la base 50.

5 Según se muestra en la Figura 5, los resaltes 60 se extienden en la dirección longitudinal con respecto a la dimensión longitudinal de la base 50. Los resaltes 60 están alineadas en pares para formar canales 62 que se extienden la longitud de la base 50 entre resaltes adyacentes. Los resaltes 60 tienen una altura para encajar estrechamente en la superficie interna del recipiente 32. Los canales 62 están dimensionados para separar y alargar las capas durante el centrifugado.

10 En la presente realización, se coloca una muestra biológica, tal como una muestra de sangre, en el recipiente 32. Se mezcla con la muestra una cantidad de microperlas 64 que tienen un agente de afinidad de unión por un componente diana. Entonces, se centrifuga el recipiente 32 como en la anterior realización para recoger las microperlas 64 con el componente diana capturado en los canales longitudinales 62 del flotador 48. Entonces, se pueden analizar las microperlas 64 y el componente diana capturado visualizando el componente diana en el interior del recipiente 32 mediante procedimientos de microscopía según se conoce en la técnica.

15 En las realizaciones mostradas en la Figura 5, la muestra de sangre después del centrifugado, se separa formando una capa de glóbulos rojos 66, una capa de fracción celular 68 de granulocitos, una fracción 70 de célula mononuclear, una fracción 72 de plasma y una superficie 74 de contacto plaqueta/plasma. En un procedimiento de selección positiva, las microperlas 64 tienen una afinidad por el compuesto diana y se recogen en los canales 62. De forma alternativa, las microperlas 64 pueden tener una afinidad por los glóbulos blancos y/o rojos en un procedimiento de selección negativa. Los canales 62 están formados entre resaltes 60 y están rodeados por la pared superior 34 del recipiente 32. El borde anterior inclinado 56 y el borde posterior inclinado 58 desvían la muestra a través de los canales 62 según se desliza el flotador 48 por el recipiente 32. Se retienen las microperlas en una capa delgada en los canales 62 cerca de la pared superior 34 del recipiente 32, de forma que se puedan visualizar las microperlas 64 a través de la pared superior 34 mediante microscopía u otros procedimientos analíticos, según se conoce en la técnica. Preferentemente, la pared frontal 34 del recipiente 32 es sustancialmente plana para evitar la distorsión óptica asociada normalmente con los recipientes cilíndricos.

Ejemplo

30 Este ejemplo compara las células tumorales recolectadas de una muestra con y sin una selección negativa. Se compararon las separaciones del recolector de 6,0 ml de sangre completa recién recogida que fueron adicionadas con 0, 50 y 500 células tumorales de próstata PC-3 cultivadas. Se mezcló un cóctel de anticuerpos obtenido de StemCell Technologies, Inc. con el nombre comercial RosetteSep con cada una de las muestras de sangre y fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se preparó una muestra de sangre de control sin el tratamiento de anticuerpos. El cóctel de anticuerpos proporcionó una selección negativa para retirar los glóbulos blancos no deseados.

35 Las muestras de sangre fueron estratificadas sobre un medio de densidad en un tubo 16 × 100 PET Vacutainer obtenido en Becton Dickinson que contiene un flotador recolector y 2 ml de medio de densidad POLYMORPHPREP™. Se centrifugaron las muestras en una centrifugadora de cubo oscilante durante 30 minutos a 20°C a un tasa de aproximadamente 650 g. La muestra de control mostró la presencia de glóbulos blancos con las células tumorales en el flotador recolector. El tratamiento con anticuerpos demostró células tumorales recogidas en el flotador recolector con una población muy reducida de glóbulos blancos. Se retiraron las células tumorales del flotador recolector. Una citometría de flujo demostró la recuperación de aproximadamente un 90% de células tumorales.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de recolección de componentes de un material de muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 5 (i) proporcionar un material de muestra en un recipiente (32) de muestreo, teniendo dicho recipiente (32) de muestreo un flotador (48) con un paso para recibir y alargar capas de componentes de muestra a ser recolectados de dicha muestra, recibiendo dicho flotador (48) en dicho recipiente (32), que tiene una dimensión y una forma que complementan el interior de dicho recipiente (32), e incluye resaltes (60) que definen un canal longitudinal (62) entre dicho flotador y dicho recipiente para recibir y alargar dichos componentes diana durante el centrifugado,
 - 10 (ii) proporcionar en dicho recipiente (32) de muestreo un soporte (64) de material particulado que tiene al menos un anticuerpo con una afinidad para asociarse con al menos un componente en dicha muestra asociada con dicho soporte (64) de material particulado, y mezclar dicho soporte (64) de material particulado con dicha muestra,
 - 15 (iii) centrifugar dicha muestra (32) con suficiente fuerza G para separar componentes de dicha muestra y para forzar a dicho soporte (64) de material particulado y al componente diana de dicha muestra a entrar dicho paso (62), y
 - (iv) retirar dicho componente diana de dicho paso (62).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo tiene una afinidad por capturar dicho componente diana, comprendiendo dicho procedimiento centrifugar dicho recipiente durante suficiente tiempo y a una velocidad suficiente para recoger dicho soporte de material particulado y el componente diana capturado en dicho canal longitudinal.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho recipiente tiene una superficie interna, y dicho flotador tiene una superficie externa que complementa dicha superficie interna.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho al menos un anticuerpo está asociado a una superficie de dicho soporte de material particulado.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho soporte comprende una cantidad eficaz de microperlas que tienen una densidad superior a una densidad de los glóbulos blancos y en el que dicho anticuerpo tiene una afinidad por los glóbulos blancos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 30 (i) proporcionar la muestra en un tubo de muestreo, conteniendo dicho tubo de muestreo un flotador dimensionado para caber en el interior de dicho tubo de muestreo y teniendo un paso para recibir y alargar capas de constituyentes de sangre a ser recolectados de dicha muestra,
 - (ii) mezclar dicha muestra con al menos un soporte de material particulado que contiene un anticuerpo que tiene una afinidad de asociación con un componente específico de muestra,
 - 35 (iii) centrifugar dicho tubo y dicha muestra con suficiente fuerza G para mover dicho flotador hacia un extremo de dicho tubo y para forzar a un componente diana de dicha muestra a entrar en dicho paso, y
 - (iv) retirar dicho componente diana de dicho paso.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 40 (i) proporcionar una muestra en un tubo de muestreo, conteniendo dicho tubo de muestreo un flotador dimensionado para caber en el interior de dicho tubo de muestreo y teniendo un paso para recibir y alargar capas de constituyentes de sangre a ser recolectados de dicha muestra,
 - (ii) mezclar dicha muestra con una cantidad de primeras perlas portadoras que tienen un recubrimiento de un primer anticuerpo que tiene una afinidad de asociación con un componente diana en dicha muestra, y una cantidad de segundas perlas portadoras que tienen un recubrimiento de dicho segundo anticuerpo que tiene una afinidad de asociación con un componente distinto de dicho componente diana,
 - 45 (iii) centrifugar dicho tubo y dicha muestra con suficiente fuerza G para mover dicho flotador hacia un extremo de dicho tubo y para forzar a dichas primeras perlas portadoras y componente diana a entrar en dicho paso, y
 - (iv) retirar dichas primeras perlas portadoras y componente diana de dicho paso.
- 50 8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, que comprende, además, la etapa de incubar dicha muestra antes del centrifugado.
9. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, que comprende, además, la etapa de separar dicho componente diana de dicho soporte de material particulado.
- 55 10. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra es una muestra de sangre completa, y dicho procedimiento comprende las etapas de:

- 5
- 10
- (i) proporcionar la muestra de sangre completa en un tubo de muestreo, conteniendo dicho tubo de muestreo un flotador dimensionado para caber en el interior de dicho tubo de muestreo y teniendo un paso para recibir y alargar capas de constituyentes de sangre a ser recolectados de dicha muestra,
 - (ii) mezclar dicha muestra con una cantidad de primeras perlas portadoras que tienen un recubrimiento de un primer anticuerpo que tiene una afinidad de asociación con un constituyente diana en dicha muestra, y una cantidad de segundas perlas portadoras que tienen un recubrimiento de dicho segundo anticuerpo que tiene una afinidad de asociación con los glóbulos blancos,
 - (iii) centrifugar dicho tubo y dicha muestra con suficiente fuerza G para mover dicho flotador hacia un extremo de dicho tubo y forzar a dichas primeras perlas portadoras y constituyente diana a entrar en dicho paso, y
 - (iv) retirar dichas primeras perlas portadoras y constituyente diana de dicho paso.

FIG. 1

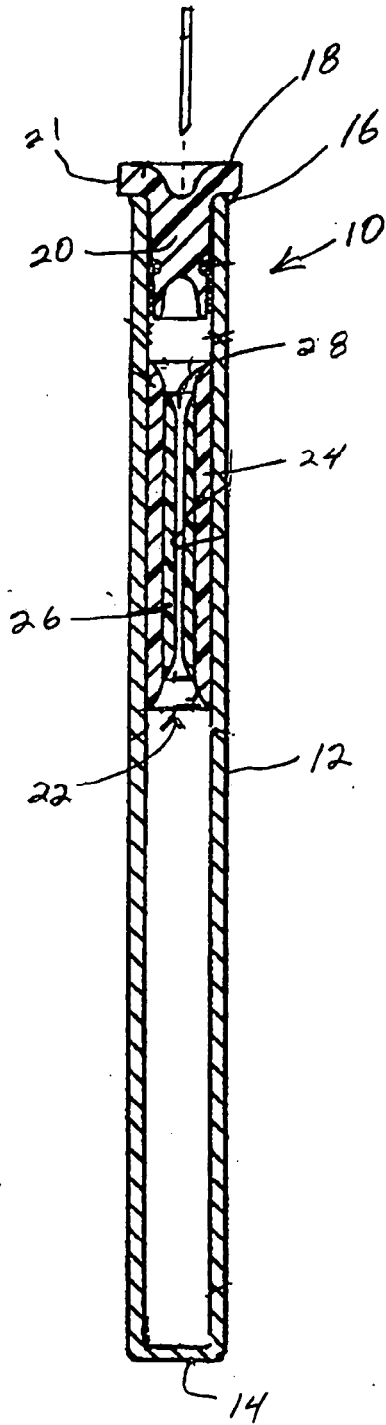
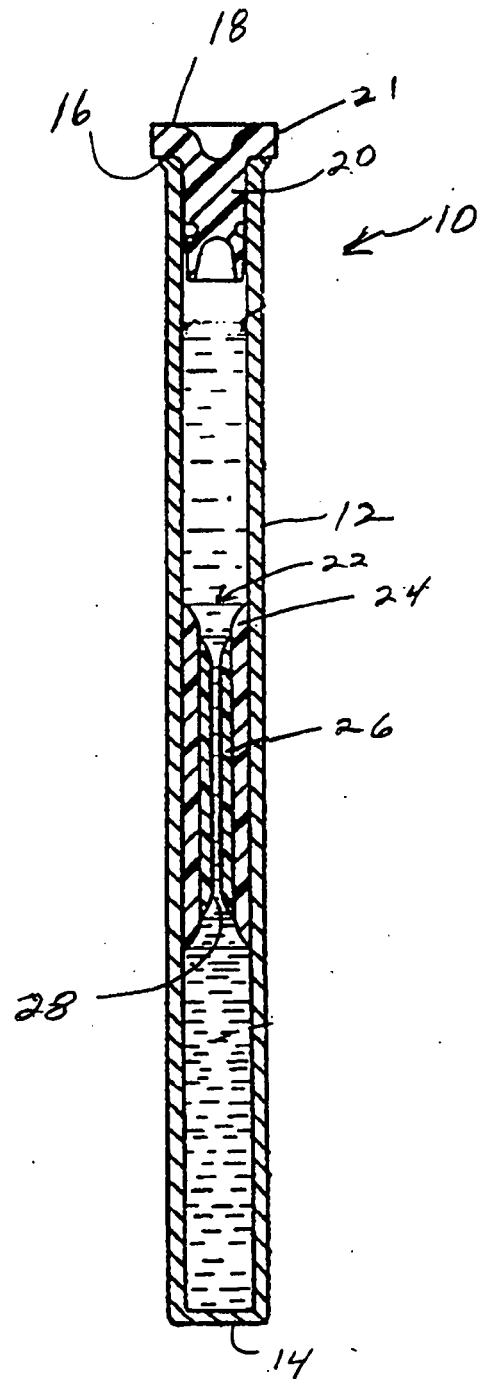


FIG. 2



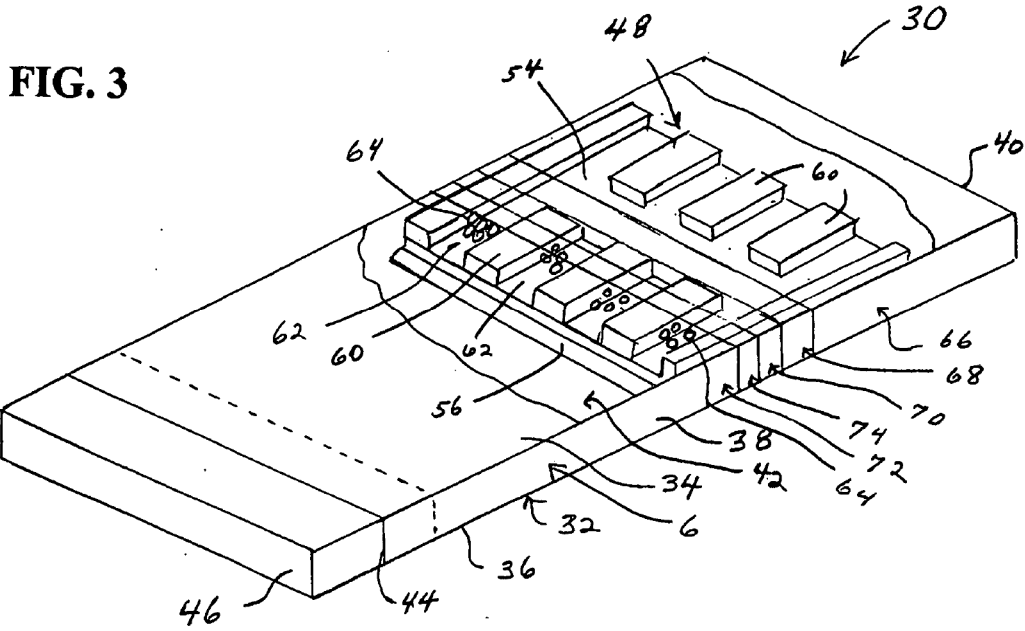


FIG. 4

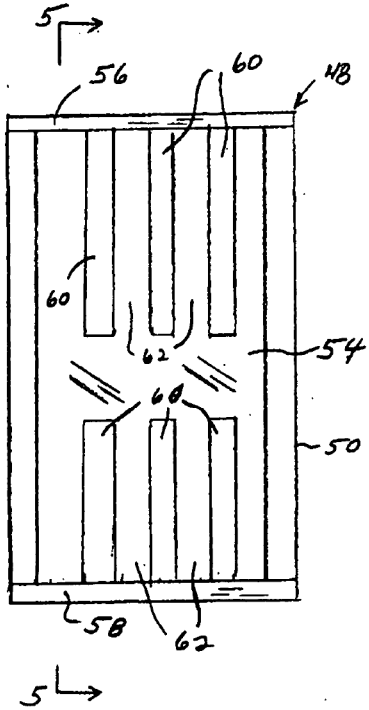


FIG. 5

