

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 827**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2009 PCT/IB2009/007316**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO2010052543**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2009 E 09775275 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2350647**

54 Título: **Método para la identificación, la selección y el análisis de células tumorales**

30 Prioridad:

04.11.2008 IT TO20080814

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

17.07.2017

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via dei Lapidari, 12
40129 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**MANARESI, NICOLÒ;
MEDORO, GIANNI y
GIORGINI, GIUSEPPE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 624 827 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

Método para la identificación, la selección y el análisis de células tumorales

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere, en general, a métodos diagnósticos basados en la identificación, el aislamiento y el posterior análisis de las células raras en circulación o diseminadas. En particular, la invención se refiere a métodos diagnósticos que encuentran aplicación en el sector de la oncología, y que por lo tanto implican la identificación y el aislamiento de las células tumorales (CTC) o de las células tumorales diseminadas (DTC) en circulación.

Estado de la técnica

10 El diagnóstico de numerosas afecciones patológicas, en particular el de los tumores, normalmente se lleva a cabo según los métodos caracterizados, por un lado, por diferentes grados de invasividad, y por otro, por diferentes niveles de rendimiento en términos de especificidad, sensibilidad y fiabilidad.

15 Algunos métodos de cribado se basan en análisis que aspiran a detectar la presencia de biomarcadores en el flujo sanguíneo periférico (por ejemplo, CA-125, CEA, PSA) o en otros fluidos biológicos (por ejemplo, el ensayo de sangre oculta en las heces o el ensayo de ADN fecal). Sin embargo, dichos métodos se basan en una evaluación indirecta que depende de la concentración de un biomarcador y no en el análisis directo, por ejemplo, de un tejido tumoral. Consecuentemente, su sensibilidad y su especificidad no son particularmente altas

20 En el caso, considerado a modo de ejemplo, del cáncer de próstata, una de las formas más extendidas de cáncer en la población masculina (aproximadamente un cuarto de todos los casos de cáncer, 300.000 nuevos casos al año en Europa), está extendido el cribado sobre la base de los parámetros serológicos (la cantidad de PSA), pero tiene una sensibilidad y una especificidad bajas.

Algunos procedimientos más invasivos, tales como una evaluación rectal digital, pueden en algunos casos completar el cuadro clínico, pero más frecuentemente es necesario llevar a cabo una biopsia de próstata para tener un diagnóstico más preciso, en un aumento de la invasividad que da como resultado una creciente incomodidad para el paciente y un coste no despreciable para el sistema sanitario.

25 En otros contextos se producen unas situaciones similares, tales como en el cáncer colorrectal, en el que el recurso es frecuentemente la evaluación de sangre oculta las heces, o bien se realiza un análisis invasivo a través de una colonoscopia, y posiblemente, una biopsia con muestras de tejidos tomada directamente del colon-recto.

30 Dado que, en este contexto, un diagnóstico temprano permite normalmente un tratamiento más eficaz, obviamente resulta de interés la evaluación de la aparición del cáncer en una fase temprana y con un elevado grado de sensibilidad y de especificidad.

35 En este sentido, algunos estudios recientes (por ejemplo, Zieglschmid et al., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 42, 155-196 (2005)) sobre células tumorales en circulación (CTC) han demostrado que, en el flujo sanguíneo periférico, se encuentran células que derivan del tumor primario. A pesar de que son extremadamente raras, la posibilidad de identificarlas y de aislarlas constituye una alternativa potencialmente muy interesante frente a los métodos invasivos descritos previamente para la obtención de muestras de tejido tumoral que va a ser caracterizado, posteriormente, con fines diagnósticos. Los cuerpos administrativos, tales como la FDA, ya han aprobado algunos sistemas de uso clínico basados en las CTC para la evaluación de pacientes que presentan metástasis.

40 Para la mayoría de los pacientes afectados por un cáncer, de hecho, no es el tumor principal el que provoca la muerte en la medida en que, si es identificado en una etapa lo suficientemente temprana, puede ser eliminado quirúrgicamente, mediante una radioterapia, una quimioterapia o mediante una combinación de dichos métodos. Más bien, la causa más frecuente de muerte son las metástasis, es decir, las colonias tumorales originadas por células malignas que se desprenden del tumor principal y migran hacia otras zonas del cuerpo, incluso a una distancia considerable del sitio del tumor principal. Dado que son difíciles de identificar y de eliminar, frecuentemente es imposible tratar con éxito todas las metástasis. Consecuentemente, desde el punto de vista clínico, su formación debe ser considerada como el acontecimiento concluyente en el progreso natural de un cáncer.

45 Consecuentemente, dado que se ha demostrado, en el caso del cáncer de mama, del cáncer de colon y del cáncer de próstata, una correlación entre el número de CTC y un aumento en el riesgo de un resultado no favorable de la enfermedad, parece evidente que la posibilidad de aislarlas, y mediante un análisis molecular, de obtener una imagen informativa completa de las mismas con importancia clínica, tendría unas repercusiones diagnósticas muy significativas.

Además se ha demostrado que el análisis de las células tumorales diseminadas (DTC), es decir, de las células tumorales que pueden encontrarse en la médula ósea o en los nódulos linfáticos, es, en ciertos contextos, incluso más significativo que el análisis del tumor primario. Algunos grupos de investigación, por ejemplo, han apreciado (Klein et al., *Tumour cell.* 13(5), 441-53 (2008)) que la sobreexpresión de HER2, que puede ser detectada en una única DTC pero no en el tumor primario, es una prueba predictiva de un riesgo de muerte muy elevado.

Adicionalmente, se sabe, por ejemplo, a partir de la patente nº EP1109938, que el análisis de múltiples células individuales puede ser más informativo en comparación con el análisis de un conjunto de células. En particular, se ha averiguado (Klein et. al., *Proc. Natnl. Acad. Sci. EE.UU.* 96, 4494-4499 (1999)) que las diferentes DTC de un único y mismo paciente tienen diferentes variaciones cromosómicas (pérdidas y amplificaciones en diferentes sitios).

En el estado actual de la técnica, para el aislamiento de las células tumorales diseminadas y en circulación, sin embargo, hay disponibles estrategias de una naturaleza fundamentalmente analítica que son muy complejas y laboriosas, que sin embargo, tienen unos rendimientos limitados y generan unas muestras que se distinguen por un bajo grado de pureza. Consecuentemente, dichas muestras de CTC o de DTC no son compatibles con algunos de los procedimientos diagnósticos más refinados y fiables, tales como la secuenciación. La limitada pureza determina de hecho un elevado riesgo de falsos positivos y de falsos negativos causados por fragmentaciones erróneas en las bases de la secuencia.

Se han llevado a cabo intentos (Nagrath et al., *Nature*, 450, 1235-1241 (2007)) para aislar las CTC mediante dispositivos microfluidos con una superficie interna recubierta con anticuerpos anti-EpCAM (expresadas en las células epiteliales pero no en los leucocitos) que son capaces de procesar volúmenes de sangre del orden de mililitros, sin tener que recurrir a tratamientos previos que implican operaciones con un elevado riesgo de pérdida de parte de las células de interés (por ejemplo, centrifugación, lavado e incubación). Sin embargo, dichos métodos han producido unos niveles de pureza con un promedio del 50 % - 60 %, que no resultan ser suficientes para llevar a cabo, proceso abajo, análisis para los cuales la pureza es crucial, tales como, por ejemplo, la evaluación de las variaciones en el número de copias, la inestabilidad microsatélite, la pérdida de heterocigosis (LoH), la expresión génica en la que es fundamental una mejor proporción entre señal y ruido (S/N) para aplicaciones diagnósticas, o la identificación de nuevos fármacos, o de nuevo en el sector de la investigación en células iniciadoras del cáncer.

Similares consideraciones pueden extenderse a otros métodos cuyo enorme potencial diagnóstico se ha destacado, que sin embargo, no pueden ser implantados concretamente dado que los procedimientos conocidos de enriquecimiento de muestras biológicas y aislamiento de una población de células raras de los mismos no permiten la obtención de unos niveles suficientes de pureza, si no es siguiendo una carga de trabajo analítico pesada y costosa, y consecuentemente, no hallan aplicación en la práctica médica. Por ejemplo, (Bonci et al. "The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities", 19 de octubre de 2008; doi:10.1038/nm.1880), incorporado en el presente documento como simple referencia con respecto a la parte pertinente, se ha demostrado recientemente que algunos microARN (miARN), es decir, fragmentos de ARN monocatenarios no codificantes, que contienen aproximadamente 22 nucleótidos, están implicados directamente en el desarrollo y el progreso del cáncer. A partir de un estudio de la expresión de miR-15a y de miR-16 en células de un tumor primario (cáncer de próstata) mediante una PCR cuantitativa, se ha apreciado una considerable subregulación del miARN en comparación con el correspondiente tejido sano. Dicho dato ha sido confirmado mediante una hibridación *in situ* (ISH). Además, se ha demostrado que la delección del agrupamiento miR-15a-miR-16 generalmente está asociada con etapas avanzadas de la enfermedad, a pesar de que en algunos casos la subregulación de estos miARN ya se ha registrado durante las etapas iniciales del desarrollo del cáncer. Consecuentemente, desde un punto de vista diagnóstico, la posibilidad de aislar las células tumorales y de evaluar si presentan una subregulación de estos miARNs proporcionaría una indicación precisa de lo avanzado del estado de la enfermedad, que es útil para el médico también para la elección de la forma de tratamiento más apropiada.

Para proceder a consideraciones adicionales de naturaleza terapéutica, merece la pena recordar que algunas estrategias terapéuticas en el sector de la oncología se basan en el uso de anticuerpos monoclonales que son capaces de tener una influencia directa sobre la supervivencia de las células tumorales, privándolas de las señales esenciales de proliferación extracelular, tales como las mediadas por factores de crecimiento a través de sus receptores celulares. Por ejemplo, uno de los objetivos de interés, en este contexto, es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr). La unión entre el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el correspondiente receptor EGFr desencadenó una cascada de acontecimientos bioquímicos celulares, que incluyen una autofosforilación y una internalización del EGFr, que culmina en la proliferación celular.

Se ha demostrado que tanto el EGF como el factor de crecimiento transformante α (TGF- α) se unen al EGFr y dan lugar a la proliferación y el crecimiento celular del tumor. En muchos casos, el aumento en la expresión del EGFr ha estado acompañado por la producción de TGF- α o de EGF por parte de las células tumorales, sugiriendo por tanto la implicación de un control del crecimiento autocrino en el progreso del cáncer. Consecuentemente, se ha propuesto el uso de anticuerpos contra el EGF, el TGF- α y el EGFr en el tratamiento de tumores en los que son expresados o sobreexpresados. Recientemente se ha demostrado, según se describe en la solicitud de patente internacional publicada con el nº WO28112274, la presencia de una mutación en la que en el gen K-RAS o en el gen B-RAF de

las células tumorales constituye una indicación del hecho de que el tumor no responderá al tratamiento con un agente diseñado para unirse a un polipéptido del EGFr.

Se comprenderá que la posibilidad de detectar, partiendo de una muestra de células tumorales tomada a partir del paciente mediante un procedimiento no invasivo, la presencia de dicha mutación, proporcionaría al médico una herramienta de enorme importancia para la evaluación de si se procede con un tratamiento basado en el uso de un anticuerpo monoclonal anti-EGFr o si se rechaza, conociendo de antemano que no será eficaz. También en esta perspectiva, sin embargo, las metodologías de enriquecimiento, identificación y aislamiento de células raras en la sangre, o en algún fluido biológico, tales como las divulgadas en el documento WO 2008/131035A, en el documento WO 2007/147076A, en el documento WO 2007/147018A, en el documento US 2007/172903A1, en el documento US 2007/059683A1, en el documento US 2007/026415A1, en el documento US 2007/026413A1 y en el documento US 2006/223178A1, permiten la obtención de una pureza suficiente para garantizar que el posterior análisis será fiable (la exclusión de falsos positivos, de falsos negativos, etc.) y, en algunos casos, que puedan incluso realmente llevarse a cabo (por ejemplo, para los casos en los que, dado que la pureza es demasiado baja, la proporción entre señal y ruido es demasiado baja como para obtener una lectura válida).

15 Sumario de la invención

Consecuentemente, una aspiración de la presente invención es proporcionar un método para la identificación, el aislamiento y el posterior análisis de células raras en circulación o diseminadas obtenidas mediante una toma de muestras de naturaleza no invasiva que superará los inconvenientes de la técnica conocida descrita previamente.

Consecuentemente, según la presente invención se proporcionan procedimientos con fines diagnósticos para ser llevados a cabo sobre una muestra de células de interés obtenida partiendo de un fluido orgánico tomado a partir de un paciente, que son identificadas y posteriormente aisladas hasta que se obtiene una pureza de al menos un 90 %, operando según el método especificado en la Reivindicación 1.

Preferiblemente, la etapa de aislar al menos una célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas, se lleva a cabo de forma que se obtenga una muestra de células tumorales o porciones de las mismas que tenga una pureza de al menos un 95 %. Aun más preferentemente, la etapa de aislar al menos una célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas se lleva a cabo de forma que se obtenga una muestra de células tumorales o porciones de las mismas que tenga una pureza del 100 %.

En particular, según una realización preferente de la presente invención, la etapa de aislamiento de las células raras se lleva a cabo según una tecnología desarrollada por el presente solicitante y que se basa en el uso de un microchip de silicio que integra varios cientos de miles de electrodos de dimensiones micrométricas mediante la manipulación de las células individuales, de forma que se aíslan las células de interés con una pureza unitaria que las habilita para un análisis molecular. De esta forma, el método según la invención proporciona células con una elevada pureza, está muy automatizado para la parte más delicada del proceso (el aislamiento de las células individuales), y permite la implementación de técnicas analíticas con una elevada fiabilidad diagnóstica y predictiva. A la luz de lo que se ha descrito previamente, surgirá claramente el ámbito innovador, a nivel diagnóstico y terapéutico, de la presente invención, que permite la mejora del tratamiento oncológico en las diferentes etapas del curso de la enfermedad, haciendo posible tanto un diagnóstico temprano no invasivo que tiene un nivel de fiabilidad comparable con el de una biopsia, como un seguimiento sensible preciso en el curso del tratamiento con fármacos específicos para el cáncer, y/o en la fase postoperatoria con objeto de seguir la evolución de la enfermedad y la calidad de la respuesta a los tratamientos clínicos, tanto en la fase metastásica como en la etapa con adyuvante.

Según la presente invención, se procesa en primer lugar un fluido orgánico tomado de una forma no invasiva a partir de un paciente, mediante la realización de uno o más pasos de enriquecimiento de las células de interés según una o más de las metodologías conocidas en la materia, tales como Ficoll®, una lisis selectiva de los eritrocitos, una filtración con filtros basados en el tamaño de las células – obtenidas mediante un micromecanizado fotolitográfico u otra técnica, tal como membranas con surcos grabados, depleción o enriquecimiento magnético. Después, las células enriquecidas son marcadas con anticuerpos específicos para la identificación de las células de interés y/o de las células contaminantes, etc.

En este contexto, mediante la expresión "fluido orgánico" o "fluido corporal" se hace referencia a un fluido obtenido partiendo de una muestra corporal en la que hay una elevada probabilidad de encontrar las células de interés. El fluido orgánico puede obtenerse a partir de una muestra corporal, tanto directamente – tal como, por ejemplo, del flujo sanguíneo periférico, de la médula ósea, la orina - como indirectamente, tal como, por ejemplo, mediante una tripsinización de un tejido procedente de un nódulo linfático.

En este contexto, mediante la expresión "células de interés" se hace referencia a células, cuyas características, detectables mediante las apropiadas técnicas de análisis, pueden proporcionar indicaciones de una naturaleza

diagnóstica o terapéutica sobre una afección patológica del paciente.

Por ejemplo, el fluido corporal es sangre periférica, que puede ser extraída del paciente de una forma sustancialmente no invasiva, según las metodologías de uso habitual, y las células de interés son células tumorales en circulación (CTC).

- 5 Como ejemplo adicional, el fluido orgánico es sangre procedente de la médula ósea, y las células de interés son células tumorales diseminadas (DTC).

10 El método de la invención se caracteriza por tanto por el uso de un sistema microfluído que es capaz de seleccionar las células de forma individual a partir de la muestra enriquecida, y aislarlas de una forma automática o semiautomática, no manual. La etapa de aislar al menos una célula o una porción de la célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas, se lleva a cabo mediante la captura de las células individuales, preferentemente cada una en un sitio específico de una pluralidad de sitios del dispositivo microfluído, dispuestas en el dispositivo microfluído según una matriz, y posteriormente, mediante la selección de las células individuales de entre las células capturadas, sobre la base de la evaluación de las imágenes de dichas células.

15 En lo sucesivo en el presente documento, por razones de simplicidad, se usa el término "células individuales", pero debe entenderse que este término incluye una célula individual o un agregado individual de células en tanto en cuanto, en general, pueda suceder que las células de interés no están presentes de forma aislada, sino unidas a una o más de otras células, ya sean células tumorales o no tumorales. Adicionalmente, también debe entenderse la posibilidad del análisis de porciones de una célula, tal como de núcleos aislados.

20 A través de dicho aislamiento de las células en el sistema microfluído, se obtiene un conjunto que contiene únicamente las células de interés, es decir, una muestra con una pureza igual al 100 %, que por lo tanto demuestra ser adecuada para ser sometida a una pluralidad de procedimientos de análisis molecular.

En el anteriormente mencionado sistema microfluído para la selección individual de células individuales, la selección se lleva a cabo sobre la base de las imágenes de las propias células.

25 Preferiblemente, dichas imágenes de las células son adquiridas en ausencia de flujo en el medio de suspensión de las propias células.

Preferiblemente, dichas imágenes comprenden imágenes adquiridas en fluorescencia.

30 Por "dispositivo microfluído" se entiende, en el presente documento, un dispositivo diseñado para manejar volúmenes de líquido en un régimen de flujo laminar, en el que el espacio para contener el líquido durante el análisis tiene al menos una dimensión menor de 1 mm.

Por "dispositivo capaz de seleccionar células individuales de forma individual" se tiene aquí un dispositivo que es capaz de llevar a cabo la selección de una o más células individuales, una cada vez o simultáneamente, sobre la base de parámetros evaluados individualmente sobre cada célula.

35 Por "aislamiento no manual" se entiende un movimiento de las células en el que la actividad manual del operador no es necesaria, tal como, por ejemplo, en el caso del movimiento por medio de jaulas dielectroforéticas móviles.

Por "aislamiento automático" se entiende un movimiento de las células en el que la intervención del operador no es necesaria, tal como, por ejemplo, en el caso del movimiento por medio de jaulas dielectroforéticas manejadas por un programa ejecutado de una forma sustancialmente no interactiva a través de un microprocesador.

40 Por "aislamiento semiautomático" se entiende un movimiento de las células en el que la interacción con el operador permite ejercer un control indirecto sobre la manipulación, tal como, por ejemplo, en el caso del movimiento, por ejemplo, por medio de jaulas dielectroforéticas, manejadas por un programa interactivo ejecutado a través de un microprocesador.

Preferiblemente, la anteriormente mencionada selección se lleva a cabo de una forma automática o semiautomática.

45 Por "selección automática" se entiende en el presente documento una selección de las células en la que la intervención del juicio del operador no es necesaria, tal como, por ejemplo, en el caso en el que se determina de forma automática con un clasificador automático qué células se corresponden efectivamente con las células tumorales de interés. Por ejemplo, esto podría llevarse a cabo con un clasificador de imágenes que procesa las imágenes adquiridas de las células, extrae las características discriminativas de las mismas y las clasifica sobre la

base de un algoritmo.

Por "selección semiautomática" se entiende en el presente documento una selección de las células en la que es necesaria la intervención del juicio del operador. Por ejemplo, esto podría llevarse a cabo con un sistema que adquiere las imágenes de las células, extrae las características discriminativas de las mismas, y se las propone al operador para la decisión final de si deben ser seleccionadas.

5 El análisis molecular de las células recuperadas es ejecutado preferentemente a través de diferentes técnicas – gracias a la elevada pureza de la muestra recuperada –:

- una secuenciación (por ejemplo, para la identificación de mutaciones);
- un análisis microsatélite (por ejemplo, con una PCR Fluorescente Cuantitativa, es decir, una QF-PCR);

10 - una hibridación genómica comparativa (CGH);

- una CGH en matriz;
- una PCR de punto final;
- una PCR en tiempo real;
- un análisis de la metilación:

15 ° un análisis de la metilación cuantitativo con pirosecuenciación;

° una PCR de secuenciación genómica con bisulfito (BSP);

° una PCR específica de metilación (MSP);

° un análisis de ADN combinado con restricción de bisulfito (COBRA)

° una extensión con cebadores oligonucleotídicos individuales sensibles a la metilación (MS-SNuPE)

20 - un análisis de la expresión génica;

° una RT-PCR;

° una expresión génica de la célula individual;

° una PCR digital.

25 La etapa del análisis molecular comprende preferentemente la evaluación de la presencia de mutaciones puntuales (de nucleótidos individuales). Las mutaciones puntuales (de nucleótidos individuales) preferentemente relativas al gen K-RAS y/o B-RAF y su presencia es un índice de la insensibilidad del paciente a un tratamiento predeterminado. La etapa de análisis molecular comprende preferentemente la evaluación de la presencia de la hipermetilación de genes supresores tumorales.

30 La etapa de análisis molecular comprende preferentemente la evaluación de la presencia de deleciones y/o de duplicaciones.

La etapa de análisis molecular comprende preferentemente la evaluación de la presencia de deleciones en la región del cromosoma 13q14 en las células tumorales de pacientes con sospecha de cáncer de próstata.

La etapa de análisis molecular comprende preferentemente la evaluación de la sobreexpresión de al menos uno de los genes BCL2, CCND1 y WNT3A en las células tumorales de pacientes con sospecha de cáncer de próstata.

35 La etapa de enriquecimiento de la muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas, comprende preferentemente al menos la etapa de llevar a cabo una selección positiva y/o negativa a través de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos, según al menos una de las siguientes modalidades:

- a) CD45 negativo
- b) CD45 y GPA negativos
- c) CD45 y CD14 negativos
- d) CD45, CD14 y GPA negativos
- 5 e) EpCAM positiva
- f) CK positiva.

10 La etapa de enriquecimiento de la muestra del fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas comprende la etapa de tratamiento de la muestra de dicho fluido orgánico de forma que se separen las células con núcleo y se enriquezca posteriormente en células con núcleo.

La etapa de enriquecimiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas, comprende preferentemente al menos la etapa de centrifugar dicha muestra de dicho fluido orgánico en un gradiente de densidad.

15 El método de la invención comprende la etapa de marcar las células tumorales en circulación o las células tumorales diseminadas o porciones de las mismas, con al menos un anticuerpo conjugado con un marcador elegido entre el grupo que consiste en fluoróforos, cromógenos, (fluorescentes o no fluorescentes) microesferas, reconociendo el anticuerpo el antígeno CD45, la citoqueratina o la EpCAM.

20 La al menos una etapa de enriquecimiento se lleva a cabo junto con la etapa de aislamiento en ese mismo dispositivo microfluído usado para la realización de la etapa de aislamiento.

Un dispositivo microfluído se usa equipado con una pluralidad de diferentes cámaras, separadas entre sí y conectadas hidráulicamente, delimitadas en al menos una cara por un único chip o por una pluralidad de chips individuales.

25 Las características y ventajas adicionales de la invención surgirán claramente a partir de la siguiente descripción de algunos ejemplos de realización no limitantes de la misma, proporcionados con referencia a las figuras de los dibujos anexos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo que resume una realización del método de diagnóstico no invasivo según la presente invención;

30 La Figura 2 es una ilustración esquemática de un ejemplo del dispositivo para la implementación del método (o de la parte sustancial y característica del mismo) según la invención;

Las Figuras 3A, 3B y 3D muestran las imágenes adquiridas en el transcurso del cribado de las células tumorales en circulación según el método de la invención;

35 Las Figuras 4A, 4B, 4C y 4D muestran una serie de electroferogramas obtenidos en el transcurso del análisis genético de las células tumorales en circulación identificadas y aisladas según el método de la invención;

La Figura 5 muestra las imágenes adquiridas en el transcurso del cribado de las células tumorales en circulación seleccionadas y aisladas según el método de la invención a partir del flujo sanguíneo periférico de pacientes afectados por un CRC metastásico;

40 Las Figuras 6 y 7 muestran, respectivamente, los espectros relativos a la detección de una mutación Gly2Val en K-RAS de las CTC aisladas a partir del flujo sanguíneo periférico de un paciente afectado por un CRC metastásico según el método de la invención;

La Figuras 8, 9 y 10 muestran, cada una, cinco imágenes adquiridas en el transcurso del cribado de una muestra enriquecida, dichas imágenes se refieren al contenido de cinco jaulas dielectroforéticas en un chip DEPArray™. Las células de cada figura se recuperaron conjuntamente y por separado a partir de las células de las otras figuras. La

Figura 10 muestra células tumorales en circulación según el método de la invención, y las Figuras 8 y 9 los correspondientes controles negativos (leucocitos normales).

Descripción detallada

5 El sujeto de la presente invención es un método para la identificación, el aislamiento y el posterior análisis de células raras, en particular de células tumorales en circulación o de células tumorales diseminadas, obtenidas preferentemente mediante una toma de muestras de una naturaleza no invasiva.

Toma de muestras

Las muestras pueden obtenerse a partir de la circulación periférica del paciente, o también a partir de la médula ósea a través de diversas técnicas conocidas en el sector.

10 Enriquecimiento previo

La proporción de células tumorales en la muestra tomada puede ser enriquecida mediante el uso de diversos métodos, tales como, por ejemplo: una centrifugación en un gradiente de densidad, constituido por soluciones tales como, Ficoll® o Percoll®; un enriquecimiento mecánico, tal como filtros de diversos tipos; un enriquecimiento por medio de una separación a través de una dielectroforesis a través de un dispositivo provisto para este fin – un clasificador de células activadas por dielectroforesis (DACS); una lisis selectiva, tal como, por ejemplo, la lisis selectiva de los eritrocitos que no son de interés; una separación inmunomagnética, a través de microesferas inmunomagnéticas con una selección positiva (mediante el uso de microesferas unidas a anticuerpos específicos para la población que se va a recuperar) o con una selección negativa (la depleción de las poblaciones celulares que no son de interés), y en el que pueden acoplarse los dos tipos de selección con objeto de aumentar la especificidad del procedimiento; una FACS, con células marcadas con un anticuerpo fluorescente específico; una inmunoseparación en fase sólida, ventajosamente por medio de sistemas microfluidos que presentan las superficies recubiertas con anticuerpos específicos para receptores epiteliales (tal como las EpCAM).

15 La mayoría de estos procedimientos pueden ser automatizados, y todos los procedimientos de clasificación pueden estar precedidos por una separación mediante una centrifugación en un gradiente de densidad, o como alternativa, pueden ser aplicados sobre sangre completa.

En general, el proceso comienza con una dilución, pero esto no es estrictamente necesario para todas las técnicas.

Otras técnicas de enriquecimiento

Una técnica adicional bien conocida por las personas expertas en el ramo es la conocida como MACS, desarrollada por Miltenyi Biotech, o también Easy-sep, desarrollada por Stem-cell technologies.

30 Alternativamente, es posible el uso de microesferas paramagnéticas con un tamaño mayor, que no requieren el uso de una columna especial, pero también pueden usarse cuando se trabaja con pocillos o tubos de ensayo (tales como, por ejemplo, anti-Ep-CAM Dynabeads).

35 Para resumir, la etapa de enriquecimiento de la muestra en la población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales se lleva a cabo preferentemente a través de un método que consiste en etapas sucesivas por medio de una selección de las células realizada sobre la base de al menos un parámetro elegido entre el grupo que consiste en:

a. densidad de la masa;

b. morfología;

c. propiedades eléctricas;

40 d. propiedades químicas;

e. propiedades mecánicas;

f. expresión de los antígenos de superficie;

g. expresión de los antígenos intracitosólicos;

- h. propiedades dieléctricas;
- i. propiedades magnéticas;
- l. propiedades geométricas (tamaño, etc.); y
- m. propiedades ópticas.

5 o combinaciones de los mismos.

Ventajosamente, el enriquecimiento de las células tumorales se obtiene después adicionalmente por medio de una segunda etapa, en la cual se lleva a cabo la selección positiva o negativa de las células a partir de las células mononucleadas recuperadas en la primera etapa. Obviamente, la segunda etapa de enriquecimiento puede comprender una selección realizada sobre la base de la capacidad para expresar o no un antígeno específico, evaluada con una de las siguientes técnicas:

- a. MACS, es decir, clasificador de células activadas por magnetismo;
- b. DACS, es decir, clasificador de células activadas por dielectroforesis;
- c. FACS, es decir, clasificador de células activadas por fluorescencia.

Aislamiento de las células tumorales individuales

15 Después, la muestra que contiene las células tumorales es insertada en un dispositivo microfluído que es capaz de seleccionar individualmente las células individuales y aislarlas de una forma automática o semiautomática no manual. Para este fin, es posible el uso de un aislamiento dielectroforético (DEPArray, mediante el uso de, por ejemplo, las técnicas descritas en el documento PCT/IB2007/000963 o en el documento PCT/IB2007/000751, o de nuevo en Manaresi et al., IEEE J. Solid-State Circuits, 38, 2297-2305 (2003) y en Romani et al., Proceedings of the International Solid State Circuit Conference, 1, 224-225 (2004)), o también de trampas opto-electrónicas o de un aislamiento optoforético o de nuevo, de pinzas láser (véase, por ejemplo, Reichle et al., Electrophoresis, 22, 272-82 (2002) o Fiedler et al., Anal. Chem., 70, 1909-15 (1998)).

La identificación de las células de interés puede llevarse a cabo, por ejemplo, a través de sensores:

- sensores externos;
- 25 - sensores ópticos, tal como un microscopio de fluorescencia; o también
- sensores internos;
- sensores ópticos, según se divulga en las patentes nº WO2007049103 y WO2007010367, que describen un método integrado de identificación de las células fluorescentes;
- 30 - sensores impedenciométricos, según se divulga en las patentes nº WO2007049103 y WO2007010367, para la detección de las características impedenciométricas de las células.

La señal para la detección de las células también puede ser indirecta, tal como, por ejemplo, la presencia de una micromicroesfera acoplada a un anticuerpo, que a su vez está acoplado a la célula. La presencia de una o más microesferas acopladas a una célula puede ser detectada como ya se ha descrito previamente, por medio de sensores impedenciométricos o de sensores ópticos (de campo claro o de fluorescencia).

35 Según la invención, mediante la manipulación individual de las células tumorales individuales por medio de un dispositivo microfluído, preferentemente de una forma automatizada, las células tumorales contenidas en la muestra enriquecida tomadas previamente son aisladas para constituir una muestra que se va a analizar que tiene una pureza de al menos un 90 %.

40 Preferiblemente, las células tumorales son aisladas para constituir una muestra que se va a analizar que tiene una pureza mayor del 95 %. Incluso más preferentemente, las células tumorales son aisladas para constituir una muestra que se va a analizar que tiene una pureza del 100 %.

Análisis genético

Sobre las células tumorales recuperadas según la invención pueden llevarse a cabo diversos tipos de análisis que permiten la caracterización genética o cromosómica de las mismas a diferentes niveles de resolución y sensibilidad, y según el fin diagnóstico del estudio, de acuerdo con lo que se ha descrito previamente.

5 Por ejemplo, es posible proceder a la secuenciación de las CTC tomadas a partir de pacientes que presentan metástasis con objeto de detectar la presencia de mutaciones en el gen K-RAS.

En el caso del cáncer de próstata, es posible evaluar la presencia de deleciones en las CTC por medio de una amplificación del genoma completo de una célula individual.

10 De nuevo, en el caso de los cánceres de origen primario desconocido (CUP) es posible la identificación del tejido original a través del perfil genético y/o del perfil de expresión de las CTC, obteniendo por lo tanto una información que es fundamental para la elección del tratamiento más apropiado.

En el caso de las células tumorales diseminadas, es entonces posible llevar a cabo un análisis de la expresión génica de las CTC y/o de las DTC individuales con objeto de identificar los indicadores pronósticos y los potenciales objetivos terapéuticos.

Ejemplos de realizaciones preferidas de la invención

15 A modo de ejemplo no limitante, a continuación se describe una realización preferente del método según la presente invención, siguiendo el diagrama de flujo representado en la Figura 1.

Muestra de partida

En una muestra de 17 ml de sangre completa tomada a partir de un donante voluntario varón se introdujeron mediante una adición 2.000 células pertenecientes a la línea celular de cáncer de mama MCF7.

20 Enriquecimiento preliminar

La realización preferente de la invención contempla un proceso que consiste en etapas sucesivas.

25 (a) FICOLL®. La muestra se trató con un anticoagulante (por ejemplo, EDTA) y se transfirió, preferentemente en las siguientes 8 h, a un tubo de ensayo estéril de 50 ml hecho de polipropileno. A partir de esto se extrajo un volumen de 50 µl, que se usó para el recuento de los glóbulos blancos sanguíneos (WBC) y de los glóbulos rojos sanguíneos (RBC) mediante el uso de un contador Coulter.

Después la muestra se diluyó a 1:4 con PBS y EDTA (2 mM) que tiene un pH de 7,2.

Se estratificó de forma precisa un volumen (< 30 ml) de sangre diluida en 15 ml de Ficoll-Hypaque (densidad = 1,077 g/ml).

Después la muestra se centrifugó a 654 g durante 30 min a 22 °C en una centrifuga de rotor inclinado (sin freno).

30 El plasma se extrajo con una pipeta (del tipo Pasteur) – pero también puede usarse un pipeteador automático – teniendo cuidado de no interferir en la capa de linfocitos de la interfase. La capa fue recogida cuidadosamente con un cuentagotas y transferida a un tubo de ensayo cónico estéril de 50 ml de polipropileno.

El tubo de ensayo se llenó con PBS y EDTA (2 mM), se agitó y se centrifugó a 300 g durante 10 min a 10 °C.

Se rechazó la porción del sobrenadante.

35 El tubo de ensayo se llenó con PBS y EDTA (2 mM), y se agitó de nuevo y se centrifugó a 300 g durante 10 min a 10 °C. Se extrajo la porción de sobrenadante.

A partir de la muestra se recogió el sedimento de células (es decir, el complejo de las células mononucleadas del flujo sanguíneo periférico, las PBMNC), para ser resuspendido en 5 ml de tampón. A partir de esto se tomó una alícuota de 50 µl para llevar a cabo el recuento de los WBC con un Coulter.

40 El tubo de ensayo se llenó con tampón, se agitó y se centrifugó a 200 g durante 10 min a 10 °C. Se rechazó la porción del sobrenadante.

Una alternativa al Ficoll® como primera etapa de enriquecimiento previo para la eliminación de los eritrocitos está representada por la lisis selectiva de los eritrocitos, que explota las propiedades químicas de las células.

(b) DEPLECIÓN EN CD45 MEDIANTE MACS

El sedimento de células se resuspendió en 80 µl de tampón para un total de 10^7 células.

- 5 Se añadió una cantidad de 20 µl de microesferas de anti-CD45 para un total de 10^7 células. Siguieron las etapas de agitación y de incubación durante 15 min a 4 °C.

Las células se lavaron rellenando el tubo de ensayo con tampón y centrifugando a 300 g durante 10 min a 10 °C.

La porción de sobrenadante se rechazó y el sedimento de células se resuspendió en 500 µl de tampón para un total de 10^8 células.

- 10 La columna MACS de tipo LS (Miltenyi) se posicionó en el interior del campo magnético de un separador MACS adecuado, según las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

Se posicionó un prefiltro en cada columna.

Tanto el prefiltro como la columna se prepararon mediante un aclarado con 3 ml de tampón.

Se aplicó la suspensión de células a la columna (o al prefiltro).

- 15 El tubo de ensayo que contenía la suspensión de células, ahora vacío, se llenó con 9 ml de tampón.

Se recogieron las células no marcadas y la columna se lavó mediante la adición, tres veces, de 3 ml de tampón, tomando cada vez del tubo de ensayo rellenado en la etapa previa.

La columna se retiró del separador y se colocó en un tubo de ensayo.

Se introdujo una cantidad de 5 ml de tampón en la columna mediante el uso de una pipeta.

- 20 La fracción que contiene las células marcadas magnéticamente fue inmediatamente expulsada a continuación mediante la manipulación del émbolo.

Para reducir el número de células contaminantes adicionales, es posible el uso de un cóctel de depleción con microesferas magnéticas adicionales funcionalizadas con anticuerpos que reconocen los antígenos presentes selectivamente en las células que se van a deplecionar, tales como, por ejemplo, microesferas anti-GPA (para la eliminación de los eritrocitos residuales del Ficoll).

- 25

Para reducir aún más el número de células contaminantes, es posible llevar a cabo un segundo pase en una columna magnética.

(c) FIJACIÓN Y MARCAJE

Las células post-MACS se centrifugaron a 300 g durante 10 min; el sedimento se resuspendió en 40 µl de tampón.

- 30 La muestra se transfirió a un tubo de ensayo de 1,5 ml. A esto se añadieron 760 µl de paraformaldehído al 4 % recién preparado, seguido de una incubación durante 20 min a la temperatura ambiente.

Después de una centrifugación a 0,2 r.c.f. durante 5 min en la microcentrífuga, se extrajo la fracción de sobrenadante.

- 35 Esto fue seguido por un lavado con 1 ml de PBS, una centrifugación a 0,2 r.c.f. durante 5 min en la microcentrífuga, y de nuevo se aspiró la fracción del sobrenadante.

A esto se añadieron 100 µl de PBS/BSA al 3 % (tampón de bloqueo).

La muestra se incubó durante 10 min a la temperatura ambiente.

Después de una centrifugación adicional a 0.2 r.c.f. durante 5 min en la microcentrífuga, seguido de la aspiración de

la fracción del sobrenadante, la tinción se llevó a cabo con EpCAM-FITC y CD45-PE (Miltenyi, según el protocolo recomendado por el fabricante).

Para completar el proceso se llevó a cabo un lavado final con 1.000 µl de Super Buffer (Hepes 400 mM, BSA al 1 %) y 1 µl de Hoechst 33324 diluido con agua (100 µg/ml) y la muestra se agitó vorticialmente.

5 La muestra se sometió a un control de calidad para verificar la intensidad de la fluorescencia del marcador y la concentración total de células. Una parte de la muestra marcada se resuspendió en un volumen mínimo de tampón específico, útil para la manipulación dielectroforética, y se cargó en un dispositivo para el control de calidad de la muestra y se controló bajo un microscopio de fluorescencia: se apreció la intensidad de la fluorescencia de las células en los diferentes canales y se realizó el recuento de las células marcadas con Hoechst 33324 (células con núcleo totales). Si la concentración de células era mayor que la óptima para una apropiada operación del dispositivo para el aislamiento de las células individuales, la siguiente etapa era la dilución de la muestra para obtener la concentración deseada.

Aislamiento

15 Las células así obtenidas se insertan después en el chip DEPArray® CONV600K (fabricado por Silicon BioSystems, véase, por ejemplo, el documento nº WO0069525) para la manipulación dielectroforética y el aislamiento de las células tumorales. El dispositivo como un todo está ilustrado en la Figura 2.

La muestra se sometió a un cribado, una identificación y una selección, una clasificación y una recuperación de las células tumorales.

20 Las células enjauladas fueron cribadas de una forma automática o manual en el microscopio con 3 canales de fluorescencia diferentes (es decir, en 3 longitudes de onda diferentes). La observación en el canal DAPI (donde por "canal DAPI" se entiende la excitación y la emisión UV en el azul, que por lo tanto se usa para la visualización de Hoechst 33324) permite la identificación de las células con núcleo (positivas), mientras que la observación en los canales de EpCAM y de CD45 permite la diferenciación entre las células tumorales (DAPI+, Ep-CAM+ y CD45-, con una morfología compatible), los linfocitos (DAPI+, EpCAM-, CD45+) y las señales falsas (DAPI+, EpCAM+ y CD45+ o también DAPI-, Ep-CAM+ y CD45+, o DAPI+, EpCAM+ y CD45- con una morfología incompatible con las células tumorales).

30 Las Figuras 3 A-B-C muestran las imágenes adquiridas en el transcurso del cribado de la muestra en el DEPArray® CONV600K. Más en particular, la Figura 3A muestra las imágenes de tres células tumorales en los tres canales tomados en consideración. La Figura 3B muestra las imágenes de una célula falsa en los tres canales tomados en consideración. La Figura 3C muestra las imágenes de dos linfocitos en los tres canales tomados en consideración.

Después se llevó a cabo la selección de las células mediante la selección de las jaulas que contienen las células que han sido positivas en DAPI (células con núcleo), positivas en EpCAM y negativas en CD45. Se identificaron dieciséis células en el chip, algunas de las cuales eran dobles. Finalmente se recuperaron quince células, algunas de las cuales eran dobles, en unos pocos microlitros (< 40 µl) en un tubo de PCR de 0,2 ml.

35 El análisis final se llevó a cabo mediante el uso de un Applied Biosystems Minifiler Kit.

En las Figuras 4 A-B-C-D se proporcionan los resultados del análisis de los fragmentos (QF-PCR) llevado a cabo mediante el uso de un Minifiler Kit. En los cuatro canales de fluorescencia tomados en consideración se analizaron diferentes microsatélites. Puede apreciarse como en ningún caso había restos de contaminación por alelos procedentes del sujeto varón en cuya sangre se introdujeron las células tumorales mediante una adición.

40 Como una alternativa al anticuerpo anti-EpCAM, es posible el uso de un tipo diferente de anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo que reconozca uno o más tipos de citoqueratina, que no sea expresado en las células sanguíneas.

Alternativamente, es posible el uso de un anticuerpo que sea más característico del cáncer (específico tumoral), tal como, por ejemplo:

- 45
- para la próstata, el antígeno específico prostático (PSA);
 - para el pulmón, el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1);
 - para la mama, el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu)

Posibilidades de aplicación

La obtención de una muestra de CTC que tenga una pureza del 100 %, siguiendo un procedimiento automatizable de selección y aislamiento, hace posible rutas diagnósticas para una pluralidad de afecciones que, de otro modo, no podrían ser analizadas de una forma exacta, fiable y precisa.

5 **Ejemplo 1** Evaluación no invasiva de mutaciones (por ejemplo, en el gen K-RAS) en pacientes con cáncer.

A continuación se describe el caso del aislamiento de CTC a partir del flujo sanguíneo periférico de pacientes afectados de cáncer colorrectal metastásico (mCRC).

Se extrajo una muestra de 7,5 ml de flujo sanguíneo periférico del paciente en tubos Vacutainer con anticoagulante de EDTA (Beckton Dickinson). La muestra fue analizada con un contador Coulter (Beckman Coulter) y presentaba 10 42 x 10⁶ leucocitos (WBC) y 43,95 x 10⁹ eritrocitos (RBC). Las PBMC se aislaron después a través de una centrifugación (en Ficoll 1077). Las PBMC recuperadas (16,5 x 10⁶ sobre la base del recuento con el contador Coulter) se lavaron en PBS con BSA y EDTA (Running Buffer, Miltenyi) y se seleccionaron a través de una depleción con microesferas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD45 y anti-GPA (Miltenyi) según las instrucciones del fabricante. Las células resultantes (fracción negativa para CD45 y GPA) se fijaron con PFA al 2 % en PBS durante 20 min a la temperatura ambiente (TA). Esto fue seguido por un lavado con PBS y una incubación en PBS/BSA al 3 % (tampón de bloqueo), durante 10 min a la temperatura ambiente. Después de un aclarado con PBS, se llevó a cabo el marcaje de CD45 con 10 µl de anticuerpo anti-CD45 conjugado con PE (Miltenyi) en 100 µl de tampón de análisis Miltenyi (RB) durante 10 min a 4 °C. La reacción fue bloqueada mediante la adición de 1 ml de RB, una centrifugación y la extracción de la porción del sobrenadante. Después, las células se permeabilizaron con 90 µl de InsidePerm (Miltenyi) y se marcaron simultáneamente con 10 µl de anticuerpo anti-CK conjugado con FITC-durante 10 min a la temperatura ambiente. La reacción fue finalizada mediante la adición de 1 ml de Inside Perm, una centrifugación y la eliminación de la fracción de sobrenadante. El sedimento se resuspendió en tampón optimizado para la manipulación de células fijadas y permeabilizadas con dielectroforesis - Hepes (400 mM) + BSA (al 2 %) en agua (SB) - y DAPI (1 mg/ml) y, se lavó con SB y se resuspendió para su inyección en el chip DEPArray™ CONV600K (con 100.000 jaulas dielectroforéticas). En el chip había presentes aproximadamente 16.000 células. Después de un cribado de DAPI/FITC/PE, se identificaron las CTC. La Figura 5 contiene imágenes de las CTC (indicadas por una flecha blanca) seleccionadas y aisladas por medio del método de la invención, siendo dichas imágenes apropiadamente procesadas de forma que se destacara la fluorescencia en los tres canales respectivos: AcMc anti-CK conjugados con FITC (Miltenyi) en el canal verde; AcMc anti-CD45 conjugados con PE (Miltenyi) en el canal rojo; y un marcaje con DAPI del ADN para la identificación de los núcleos en el canal azul.

Debería apreciarse cómo es posible distinguir claramente entre los diversos tipos de posibles acontecimientos a partir de un análisis de las imágenes procesadas, mientras que en un análisis menos refinado que no está basado en las imágenes, sino sólo en la intensidad de la fluorescencia global, las imágenes podrían ser rechazadas como falsos positivos.

35 Por ejemplo, la jaula con el ID 382 contiene un par de CTC. Éstas estaban evidentemente ya unidas al comienzo, dado que la probabilidad de que dos de las tres CTC presentes terminen en una misma jaula es despreciable. Sin el análisis de imagen, este acontecimiento podría haber sido rechazado dado que, en general, los agrupamientos de células pueden dar lugar a señales falsas de fluorescencia, dado que el anticuerpo - por ejemplo, anti-CK - queda atrapado de una forma no específica. La recuperación de las dos células ID382 tiene por lo tanto una pureza del 100 % (y es compatible con la mayoría de los análisis moleculares).

45 La jaula con el ID 11439 indica un acontecimiento DAPI+/CK+/CD45+. Sin el análisis de imagen, dicho acontecimiento podría haber sido rechazado como falso, pero en su lugar, dado que la imagen hace posible la detección de la distribución de fluorescencia en el acontecimiento, es posible interpretar el dato como haciendo referencia a una jaula DAPI+/CK+/CD45-CTC (indicada por una flecha blanca) junto con otras tres células CK con núcleo, dos de las cuales son CD45+. El contenido de dicha jaula puede ser recuperado por separado. Mediante el uso de un sistema basado en jaulas dielectroforéticas móviles, puede llevarse a cabo la segregación en las jaulas individuales de las células que inicialmente comparten la misma jaula mediante la aplicación de los apropiados patrones de jaulas. Si no es posible la segregación de las CTC de las demás células contaminantes de la jaula, es posible en cualquier caso recuperar el contenido de la jaula, asociando a dicha recuperación la información de la presencia de contaminantes. Esto es una ventaja adicional de la técnica de la invención. La pureza de las células recuperadas está indicada abajo, y esto debe tenerse en cuenta en el análisis posterior. En el caso en cuestión, la célula podría por lo tanto recuperarse junto con las otras tres (con una pureza del 25 %), o también ser separada y recuperada individualmente para obtener una recuperación pura del 100 % (si se aísla individualmente), o también del 50 % si se aísla junto con un contaminante, o del 90 % si se aísla junto con un contaminante y otras nueve CTC adicionales, sin contaminantes posiblemente presentes en otras jaulas (no en este caso).

La jaula con el ID 5007 muestra un acontecimiento que, sobre la base de la fluorescencia total, parecería similar al de la ID 11439 dado que es un acontecimiento DAPI+/CK+/CD45+. Sin embargo, sobre la base de la imagen, es

posible determinar cómo éste es un acontecimiento falso en tanto en cuanto está unido a un agrupamiento que ha atrapado los anticuerpos anti-CK.

5 La jaula con el ID 13103 muestra un acontecimiento que, sobre la base de la fluorescencia total, parecería similar al de la ID 11439 dado que es un acontecimiento DAPI+/CK+/CD45+. Sin embargo, sobre la base de la imagen, es posible determinar cómo éste es un acontecimiento falso en tanto en cuanto está unido a una célula doble positiva individual con una señal CD45+ (no CTC).

Las jaulas con el ID 8614 muestran un acontecimiento CK+/CD45- pero DAPI-, no clasificado como CTC. La jaula con el ID 7796 muestra un acontecimiento de control (dos glóbulos blancos sanguíneos) que comprende dos células que no son clasificadas como CTC, debido a que son CK-, y una es también CD45+.

10 Las células de interés pueden por lo tanto ser aisladas u otra cosa, dependiendo del propósito del experimento, en términos de pureza de la muestra y según la facilidad de separación de la célula desde un aglomerado de células en el que está comprendida. En este sentido, la selección basada en las imágenes es particularmente eficaz para la exclusión de falsos positivos y de falsos negativos.

15 Como alternativa al Ficoll®, es posible el uso de una técnica basada en la lisis selectiva de los glóbulos rojos sanguíneos (RBC). En este caso, en la muestra sigue habiendo en el primer caso también granulocitos. Después de dicha eliminación de los RBC, las células tumorales pueden ser adicionalmente enriquecidas a través de una selección inmunomagnética positiva (por ejemplo, con microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-EpCAM), o de una selección inmunomagnética negativa (por ejemplo, a través de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD45 o a un cóctel con anticuerpos anti-CD45 y con otros anticuerpos contra los antígenos que no están presentes en las CTC). En cualquier caso, las pocas CTC presentes se obtienen en una muestra que contiene decenas de miles o cientos de miles de leucocitos.

25 El aislamiento de las CTC a partir del flujo sanguíneo periférico es asimismo compatible con los procedimientos de enriquecimiento y marcaje aprobados por la FDA, tales como el sistema Veridex CellSearch™. En este caso, el sistema CellSearch también puede usarse para llevar a cabo el marcaje y el enriquecimiento de una forma automatizada (con la máquina AutoPrep). Con este sistema se obtienen las pocas CTC presentes (con un rendimiento óptimo de aproximadamente el 90 %) de una muestra, normalmente con únicamente unos pocos miles de leucocitos contaminantes (valores típicos de 1.000-5.000). El Cell-Search AutoPrep representa un excelente sistema de enriquecimiento, y tiene su principal limitación en el hecho de que se basa en una selección inmunomagnética positiva para la EpCAM. Consecuentemente, en algunos tipos de tumores, en los que las CTC no sobreexpresan la EpCAM, sería posible encontrar únicamente unas pocas CTC. En dichos casos, la selección negativa es más indicada para la detección de las células CD45+.

35 La detección del estado de mutación del gen K-RAS tiene una considerable importancia clínica, dado que se ha demostrado que algunas mutaciones del K-RAS están relacionadas con la ineficacia de los tratamientos basados en anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor EGFr. Dichas mutaciones activan, de hecho, cascada abajo, el mecanismo de proliferación celular a pesar de la inhibición cascada arriba del EGFr. Los tratamientos con Cetuximab y Panitumumab ya están indicados únicamente para los pacientes con el KRAS natural. La posibilidad de identificar la mutación en las CTC proporciona la posibilidad de no tener que recurrir a una biopsia, en particular en todos aquellos casos en los que la biopsia no es posible o es muy compleja de realizar. Incluso cuando hay disponibles tejidos extraídos quirúrgicamente, la posibilidad de analizar las CTC es interesante en cualquier caso.

40 Los tumores son intrínsecamente inestables desde el punto de vista genético, y las metástasis pueden derivar de células ubicadas en sitios distintos al del tumor primario; consecuentemente, las CTC pueden reflejar mejor el perfil molecular de las células que están experimentando metástasis.

45 Con objeto de verificar la posibilidad de detectar las mutaciones del K-RAS a partir de las CTC, se analizaron las CTC procedentes del flujo sanguíneo periférico de pacientes afectados por cáncer colorrectal metastásico (mCRC). Siguiendo el procedimiento de enriquecimiento descrito anteriormente, se identificaron y aislaron las CTC con la DEPArray™. La pureza del 100 % permite la detección de la posible presencia de la mutación a través de la secuenciación: después de la amplificación previa de las copias iniciales, por ejemplo con una PCR con cebadores internos, se lleva a cabo la secuenciación mediante el uso de las técnicas conocidas.

50 En el caso en cuestión, se llevó a cabo el análisis cascada abajo mediante el uso de la técnica DOP-PCR con el kit Omniplex producido por Sigma. Después de la amplificación, el producto fue analizado con un secuenciador de electroforesis capilar fabricado por Applied Biosystems.

La Figura 6 muestra un ejemplo de detección de una mutación en una de las muestras analizadas, que se corresponde con una mutación de glicina a valina en el codón 12 (en la Figura 7 se muestra el correspondiente control negativo).

5 **Ejemplo 2** - Evaluación en las CTC de las deleciones (por ejemplo, en el cáncer de próstata) a través de la amplificación del genoma completo de una célula individual y una CGH en matriz. En este caso, se lleva a cabo ventajosamente el aislamiento de las células individuales que van a ser recuperadas en diferentes pocillos. De esta forma, el análisis tiene en cuenta la heterogeneidad de la población, y no sólo proporciona la media sino también múltiples señales relativas a cada célula, de forma que es más fácil la identificación de las mutaciones presentes únicamente en algunas de las células tumorales.

Ejemplo 3 – Identificación no invasiva del tejido original en tumores CUP, a través del perfil genético y/o del perfil de expresión de las CTC.

10 **Ejemplo 4** - Análisis de la expresión génica en células tumorales diseminadas (DTC) individuales para la identificación de los indicadores pronósticos y de los potenciales objetivos terapéuticos. También en este caso, se lleva a cabo ventajosamente el aislamiento de las células individuales que van a ser recuperadas en diferentes pocillos. De esta forma, el análisis tiene en cuenta la heterogeneidad de la población, y no sólo proporciona la media sino también múltiples señales para cada pocillo, de forma que es más fácil la identificación de las mutaciones presentes únicamente en algunas de las células tumorales.

15 **Ejemplo 5** – Como ya se ha mencionado, en general, debe entenderse que lo que se ha dicho anteriormente relativo al "aislamiento de células" también se aplica al "aislamiento de porciones de una célula", tal como, por ejemplo, el núcleo. De hecho, esto permite en cualquier caso, para ciertos tipos de información biomolecular, la obtención de una información significativa (por ejemplo, mediante la evaluación del ADN genómico contenido en el núcleo).

20 En el ejemplo del aislamiento de un núcleo, la selección de las células puede llevarse a cabo a través de técnicas que marcan de una forma distinguible los núcleos de las células tumorales (CTC o DTC) con respecto a las células no tumorales, tal como, por ejemplo, una FISH. En este caso, la presencia de múltiples señales revela la presencia de duplicaciones en el ADN genómico (una característica de las células tumorales que en general no está presente en las células normales).

25 En particular, en el ejemplo del cáncer de mama, es de interés la evaluación de la duplicación de la región genómica relativa al gen HER2, ubicado normalmente en el cromosoma 17. Por lo tanto, se aplican dos tipos de sondas, una para el centrómero del cromosoma 17, y una para el gen HER2. Si la proporción gen/cromosoma es mayor de dos, la célula es considerada de forma convencional positiva en la prueba. Dicha información tiene implicaciones, por ejemplo, en el uso de fármacos tales como, Trastuzumab (Herceptin) que presentan eficacia únicamente en el caso de una sobreexpresión del correspondiente receptor HER2. No sólo el recuento, sino también la identificación y el
30 aislamiento de dichas células en una forma purificada, permiten la adquisición de información adicional sobre las características genéticas del tumor.

Ejemplo 6

35 La presencia de variaciones en el número de copias (CNV) en el ADN constituye una característica típica de un tumor. Para la evaluación de nuevos fármacos, es de considerable interés ser capaces de evaluar las CNV con objeto de asociarlas al curso de la enfermedad, y potencialmente, a las áreas del genoma en las que las CNV tienen una influencia significativa sobre el curso de la enfermedad (tanto en el caso de un pronóstico favorable como en el caso de un pronóstico desfavorable). Esta información puede ser de ayuda en la identificación de los genes que podrían ser objetivos para la acción farmacológica. Adicionalmente, en la fase de diagnóstico del cáncer, puede ser posible después la identificación de una forma mínimamente invasiva, del perfil de CNV de las CTC del paciente con
40 objeto de orientar el tratamiento sobre la base de la experiencia adquirida.

Para demostrar la posibilidad de determinar las CNV, se separaron y aislaron pequeñas muestras de CTC y, consecuentemente, pequeñas muestras de control negativo.

45 A partir de un paciente que padece un cáncer de mama metastásico (mBrCa), se obtuvo una muestra de 7,5 ml de sangre periférica y se puso en un tubo CellSave (Veridex). La muestra fue enriquecida y marcada con anticuerpos fluorescentes (anti-CK conjugados con PE, anti-CD45 conjugados con APC) y DAPI, con el CellSearch AutoPrep, según el procedimiento habitual. Se extrajeron las células enriquecidas del cartucho Veridex y se resuspendieron en un volumen reducido. Dicha muestra se inyectó en el chip DEPArray™ A300K (Silicon Biosystems S.p.A.) - con 307.200 electrodos y varias jaulas programables, normalmente entre 19.200 y 76.800. Después del barrido, se aislaron dos controles negativos con cinco células, dos muestras con cinco CTC, una muestra con una única CTC.

50 Las Figuras 8 y 9 ilustran las células recuperadas, respectivamente, en una primera y una segunda recuperación con cinco leucocitos cada una (DAPI+/CD45+/CK-) como control negativo para la detección de las CNV. La Figura 10 ilustra las cinco CTC recuperadas por separado, que forman el sujeto del análisis de las CNV.

Después de una selección y un aislamiento llevados a cabo mediante el uso del método según la invención, y dado

5 que ahora hay disponible una muestra con un grado de pureza mayor del 90 % (en el caso en cuestión, del 100 % para la recuperación de las CTC ilustradas en la Figura 10), es posible llevar a cabo un análisis con éxito basado en la amplificación del genoma total, según una metodología ilustrada en el documento nº EP1109938, una PCR mediada por ligación, seguido de una hibridación genómica comparativa en metafase (CGH) o una CGH en matriz que, con muestras con una pureza inferior, serían imposibles o intrínsecamente poco fiables en tanto en cuanto la señal detectada sería demasiado débil o confusa en presencia de células no tumorales.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico de afecciones tumorales y/o del correspondiente estado de avance, que comprende las etapas de:

5 a. El enriquecimiento de una muestra de un fluido orgánico obtenido a partir de un paciente, teniendo dicho fluido orgánico una elevada probabilidad de contener al menos una célula tumoral en circulación o una célula tumoral diseminada o porciones de las mismas en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas;

b. La obtención de una muestra purificada a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas;

10 c. La realización de un análisis molecular sobre dicha muestra purificada, de tal forma que se destaque al menos una característica de dicha al menos una célula adecuada, para permitir dicho diagnóstico;

estando dicho método **caracterizado porque**

15 - dicha etapa de obtención de una muestra purificada se lleva a cabo mediante el aislamiento de una forma no manual de al menos una célula o una porción de una célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas mediante la selección individual de células individuales o de porciones de células sobre la base de la evaluación de las imágenes de dichas células en un dispositivo microfluído, de forma que se obtenga una muestra purificada que tenga una pureza de al menos el 90 %; y

20 - porque comprende la etapa de marcar las células tumorales en circulación o las células tumorales diseminadas o porciones de las mismas con al menos un anticuerpo conjugado con un marcador elegido entre el grupo que consiste en:

- fluoróforos

- cromógenos

- microesferas (fluorescentes o no fluorescentes);

25 reconociendo el anticuerpo, el antígeno CD45, la citoqueratina o la EpCAM.

2. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha etapa de aislamiento de al menos una célula o una porción de una célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas se realiza de forma que se obtenga una muestra diagnóstica que tenga una pureza de al menos el 95 %.

30 3. El método según la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicha etapa de aislamiento de al menos una célula o una porción de una célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas se realiza de forma que se obtenga una muestra diagnóstica que tenga una pureza del 100 %; seleccionándose dicho dispositivo microfluído entre en el grupo que consiste en:

dispositivos microfluidos de aislamiento dielectroforético;

35 dispositivos microfluidos de trampas opto-electrónicas;

dispositivos microfluidos de aislamiento optoforético;

dispositivos microfluidos de pinzas de láser.

4. El método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho sistema microfluído selecciona dichas células o porciones de las mismas de una forma automática o semiautomática.

40 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha selección individual de dichas células se lleva a cabo sobre la base de los parámetros de dichas células evaluados en ausencia de flujo de dicho fluido orgánico.

6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** dichas imágenes comprenden

imágenes fluorescentes.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha selección individual de dichas células se lleva a cabo adicionalmente sobre la base de propiedades impedenciométricas.

5 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha etapa de aislamiento de al menos una célula o una porción de célula a partir de dicho al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas se realiza mediante la captura de las células individuales, preferentemente cada una en un sitio específico de una pluralidad de sitios de dicho dispositivo microfluído dispuestos en el dispositivo microfluído según una matriz, y posteriormente, mediante la selección de las células individuales de entre las células capturadas, sobre la base de al menos un parámetro que puede ser detectado por medio de un sensor interno o externo del dispositivo microfluído.

10

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha etapa de enriquecimiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico comprende una selección de células realizada sobre la base de al menos un parámetro elegido entre el grupo que consiste en:

a. densidad de la masa;

15 b. morfología;

c. propiedades eléctricas;

d. propiedades químicas;

e. propiedades mecánicas;

f. expresión de los antígenos de superficie;

20 g. expresión de los antígenos intracitosólicos;

h. propiedades dieléctricas;

i. propiedades magnéticas;

l. propiedades ópticas;

m. propiedades geométricas;

25 o combinaciones de los mismos.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha etapa de enriquecimiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas comprende la etapa de tratamiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico de forma que se separen las células con núcleo y se enriquezca posteriormente en células con núcleo.

30

11. El método según la reivindicación anterior, **caracterizado porque** dicha etapa de enriquecimiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas comprende al menos la etapa de centrifugación de dicha muestra de dicho fluido orgánico en un gradiente de densidad.

35 12. El método según la reivindicación 10, **caracterizado porque** dicha etapa de enriquecimiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas comprende al menos la etapa de llevar a cabo una lisis selectiva de los eritrocitos.

40 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha etapa de enriquecimiento de dicha muestra de dicho fluido orgánico en al menos una población de células que comprende al menos un tipo de células tumorales en circulación o células tumorales diseminadas o porciones de las mismas comprende al menos la etapa de llevar a cabo una selección positiva y/o negativa a través de microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos según al menos una de las siguientes modalidades:

- a) CD45 negativo
- b) CD45 y GPA negativos
- c) CD45 y CD14 negativos
- d) CD45, CD14 y GPA negativos
- 5 e) EpCAM positiva
- f) CK positiva.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha al menos una etapa de enriquecimiento se lleva a cabo junto con dicha etapa de aislamiento en ese mismo dicho dispositivo microfluído usado para llevar a cabo la etapa de aislamiento.
- 10 15. El método según la reivindicación anterior, **caracterizado porque** se usa un dispositivo microfluído equipado con una pluralidad de diferentes cámaras, separadas entre sí y conectadas hidráulicamente, delimitadas en al menos una cara por un único chip o por una pluralidad de chips individuales.
16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis molecular se lleva a cabo por medio de un procedimiento seleccionado entre:
- 15 - una secuenciación;
- un análisis microsatélite;
- una hibridación genómica comparativa (CGH);
- una CGH en matriz;
- una PCR de punto final;
- 20 - una PCR en tiempo real;
- un análisis de la metilación:
- ° un análisis de la metilación cuantitativo con pirosecuenciación;
- ° una PCR de secuenciación genómica con bisulfito (BSP);
- ° una PCR específica de metilación (MSP);
- 25 ° un análisis de ADN combinado con restricción de bisulfito (COBRA)
- ° una extensión con cebadores oligonucleotídicos individuales sensibles a la metilación (MS-SNuPE)
- un análisis de la expresión génica;
- ° una RT-PCR;
- ° una expresión génica de la célula individual;
- 30 ° una PCR digital.
17. El método según la reivindicación 16, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis molecular comprende la evaluación de la presencia de mutaciones puntuales (de nucleótidos individuales).
18. El método según la reivindicación 17, **caracterizado porque** dichas mutaciones puntuales (de nucleótidos individuales) son relativas al gen K-RAS y/o B-RAF y su presencia es un índice de insensibilidad del paciente a un
- 35 tratamiento predeterminado.

19. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis molecular comprende la evaluación de la presencia de una hipermetilación en genes supresores tumorales.
20. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis molecular comprende la evaluación de la presencia de deleciones y/o de duplicaciones.
- 5 21. El método según la reivindicación 20, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis molecular comprende la evaluación de la presencia de deleciones en la región del cromosoma 13q14 en las células tumorales de pacientes con sospecha de cáncer de próstata.
- 10 22. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** dicha etapa de análisis molecular comprende la evaluación de la sobreexpresión de al menos uno de dos genes BCL2, CCND1 y WNT3A en las células tumorales de pacientes con sospecha de cáncer de próstata.

FIG. 1

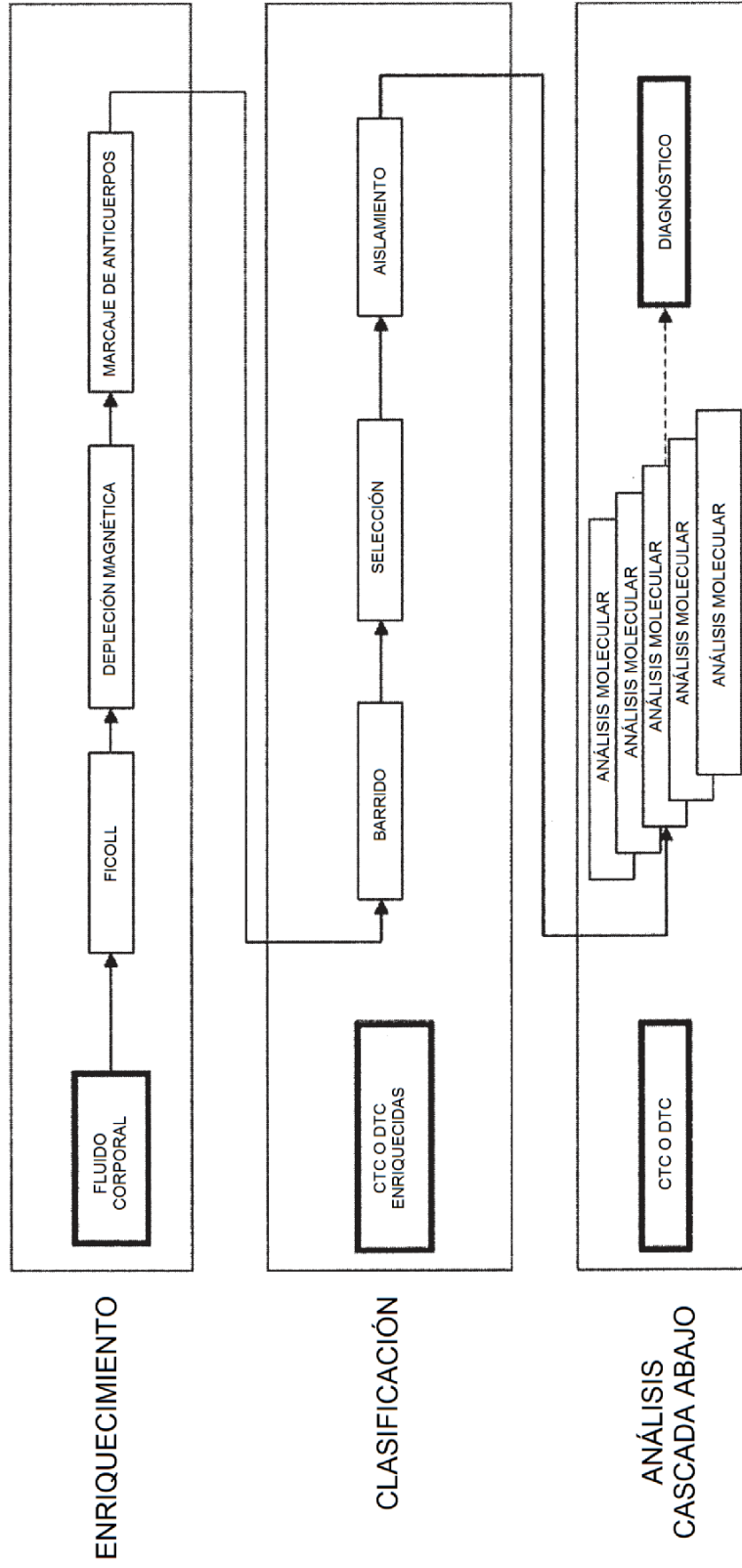
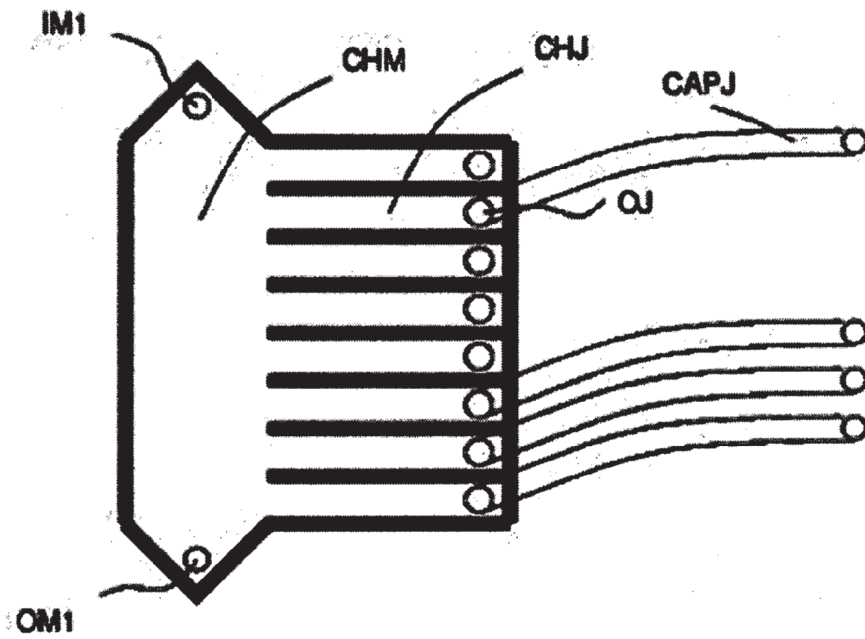


FIG. 2



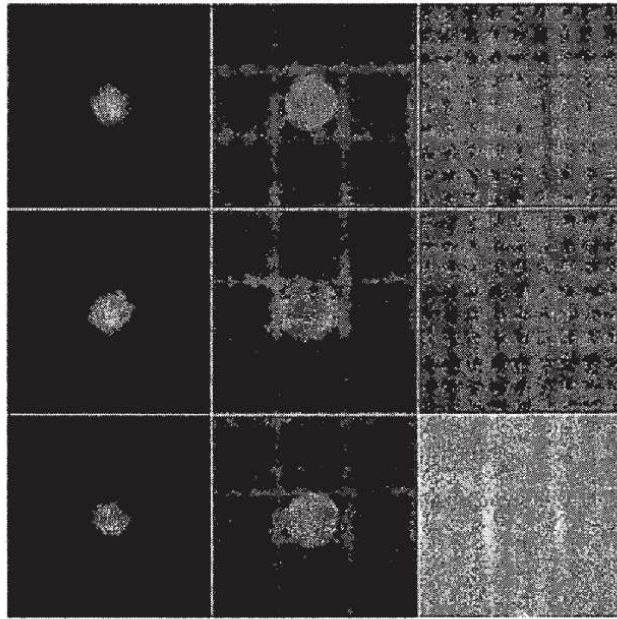


FIG. 3A - CÉLULAS TUMORALES (DAPI +, EpCAM-FITC +, CD45-PE -)

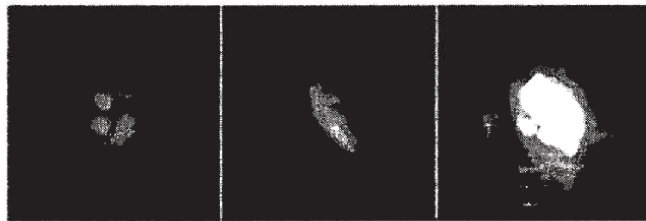


FIG. 3B - CÉLULAS FALSAS (DAPI+, EpCAM-FITC +, CD45-PE +)

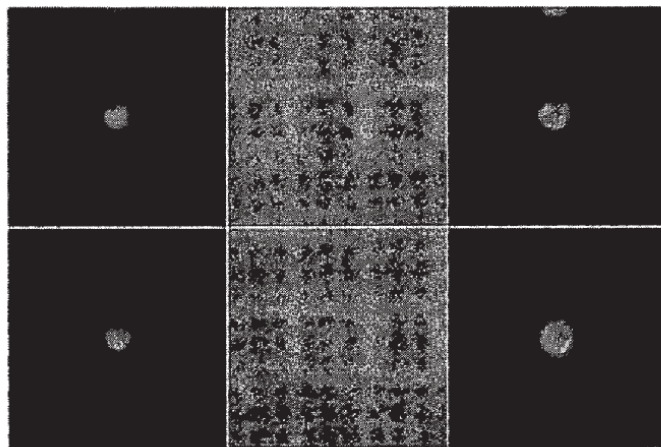


FIG. 3C - LINFOCITOS (DAPI+, EpCAM-FITC -, CD45-PE +)

FIG. 4A

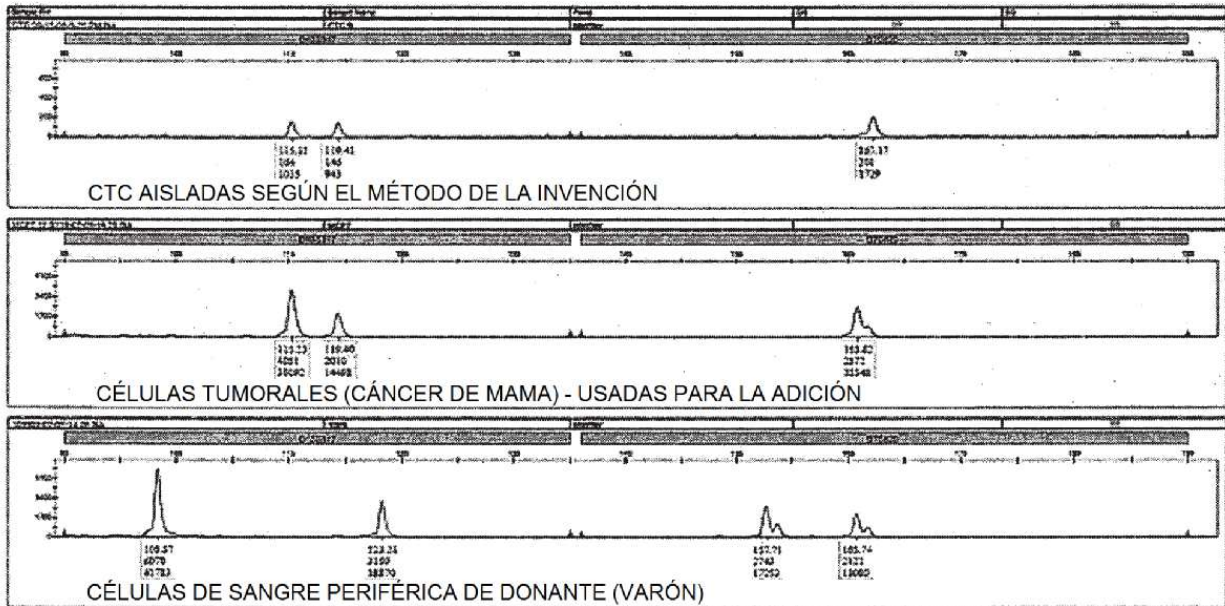


FIG. 4B

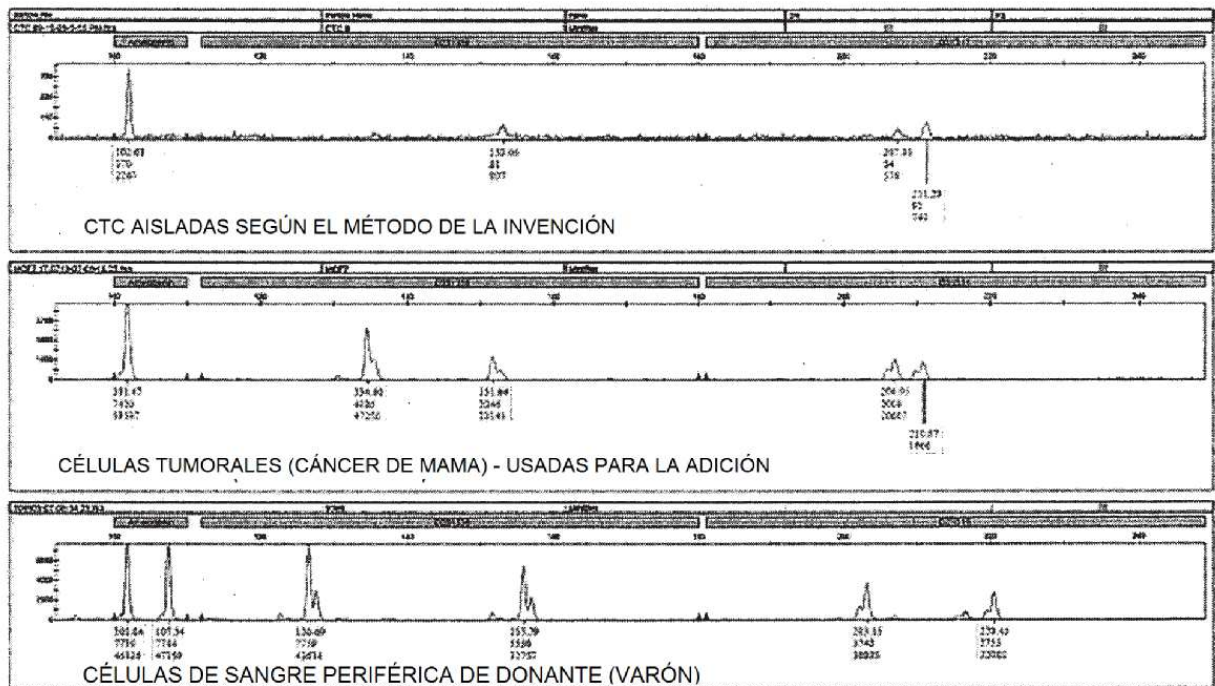


FIG. 4C

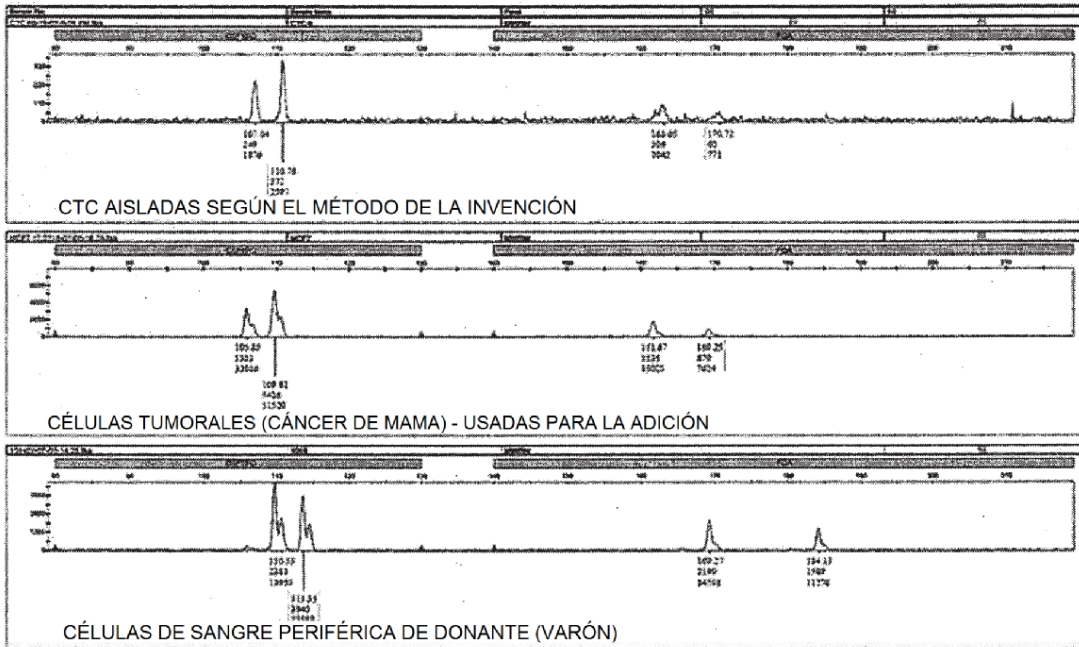


FIG. 4D

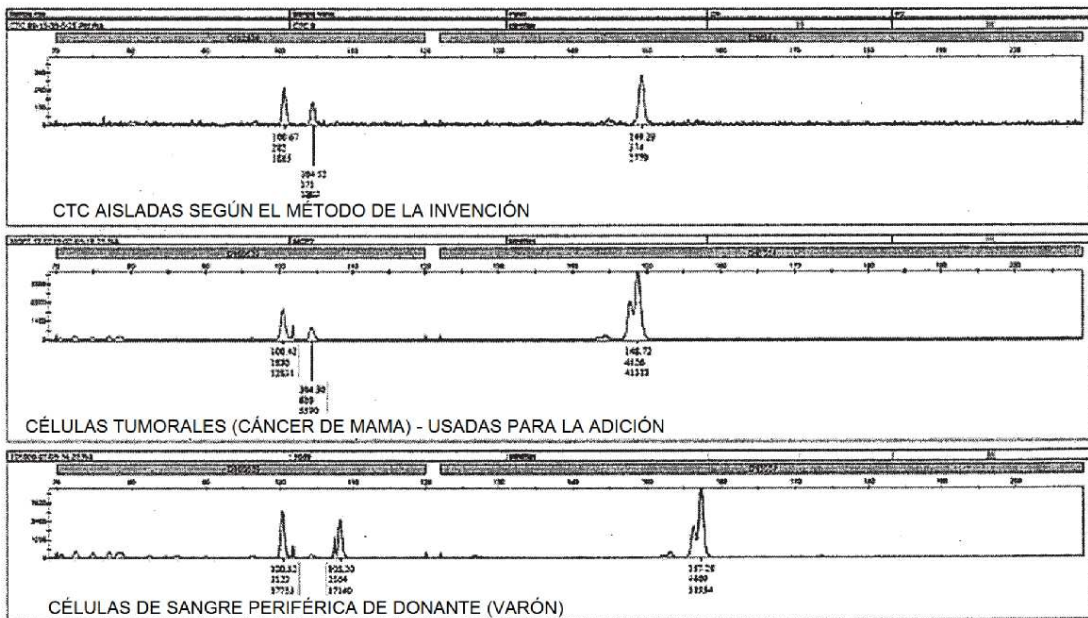


FIG. 5

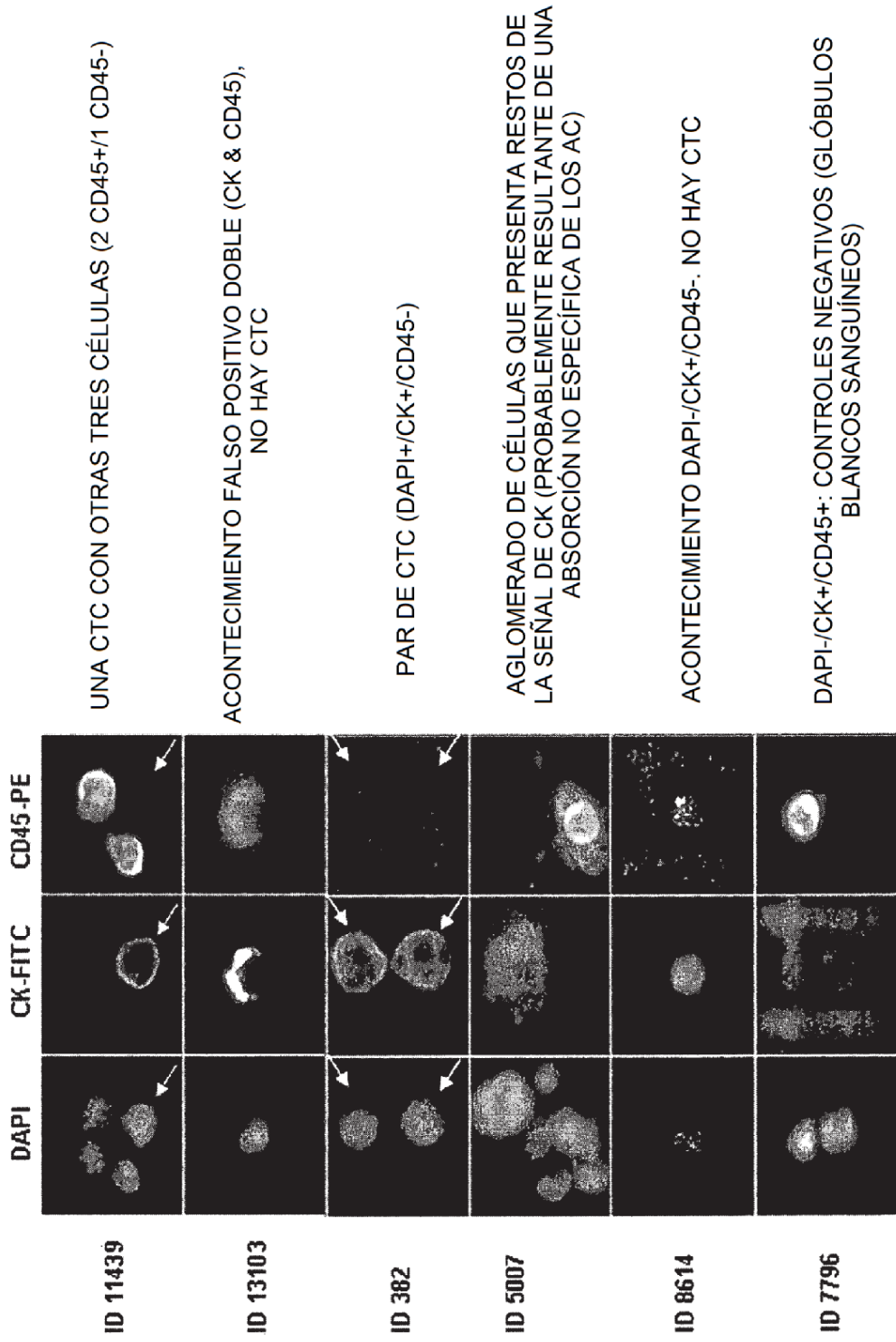


FIG. 6

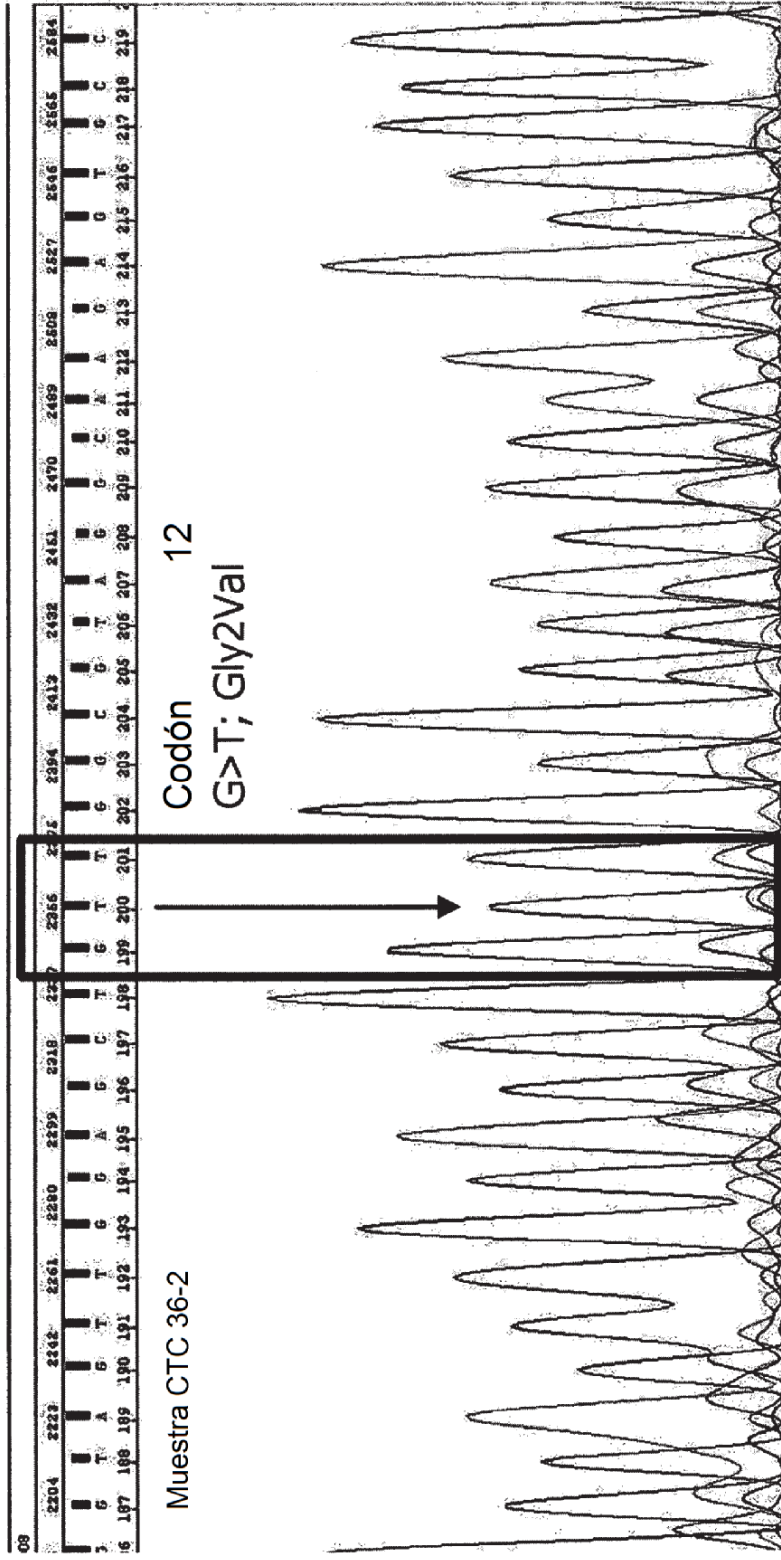


FIG. 7

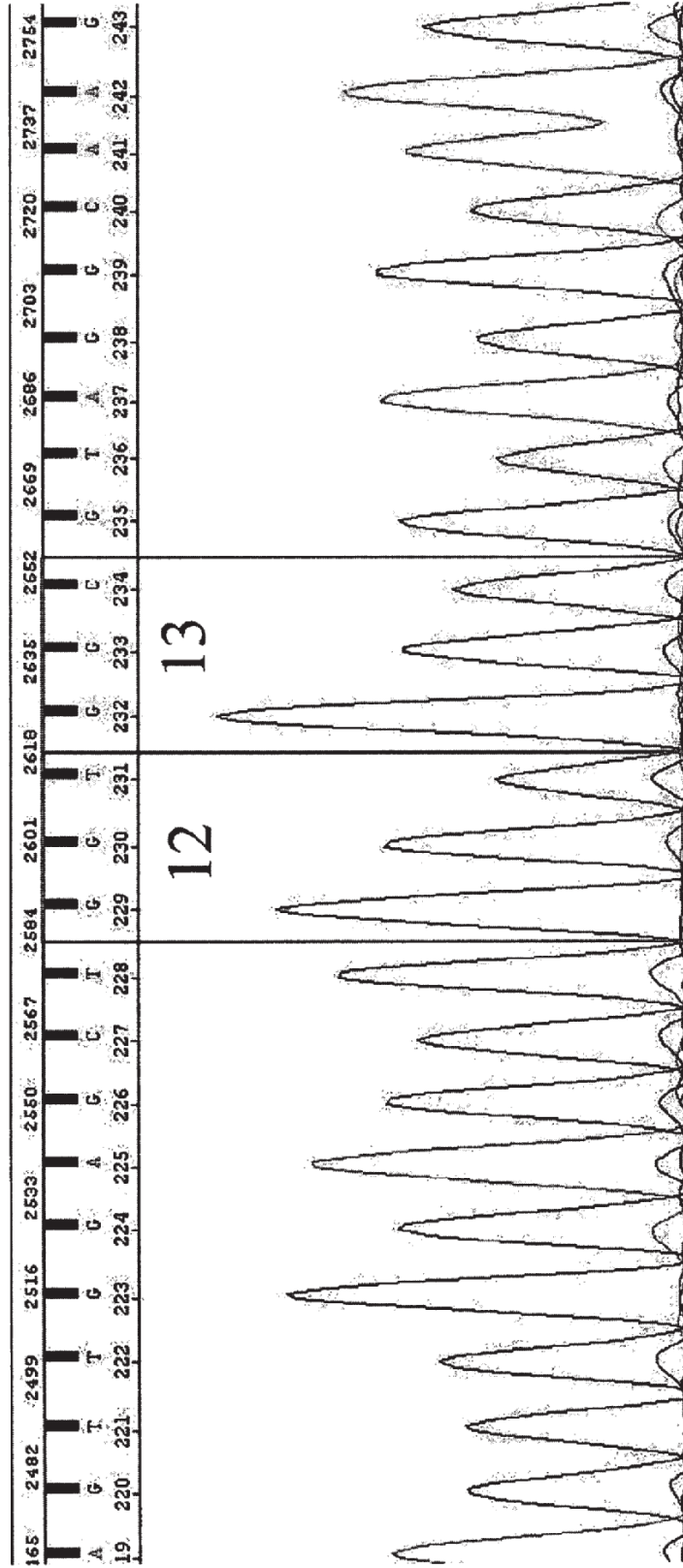


FIG. 8

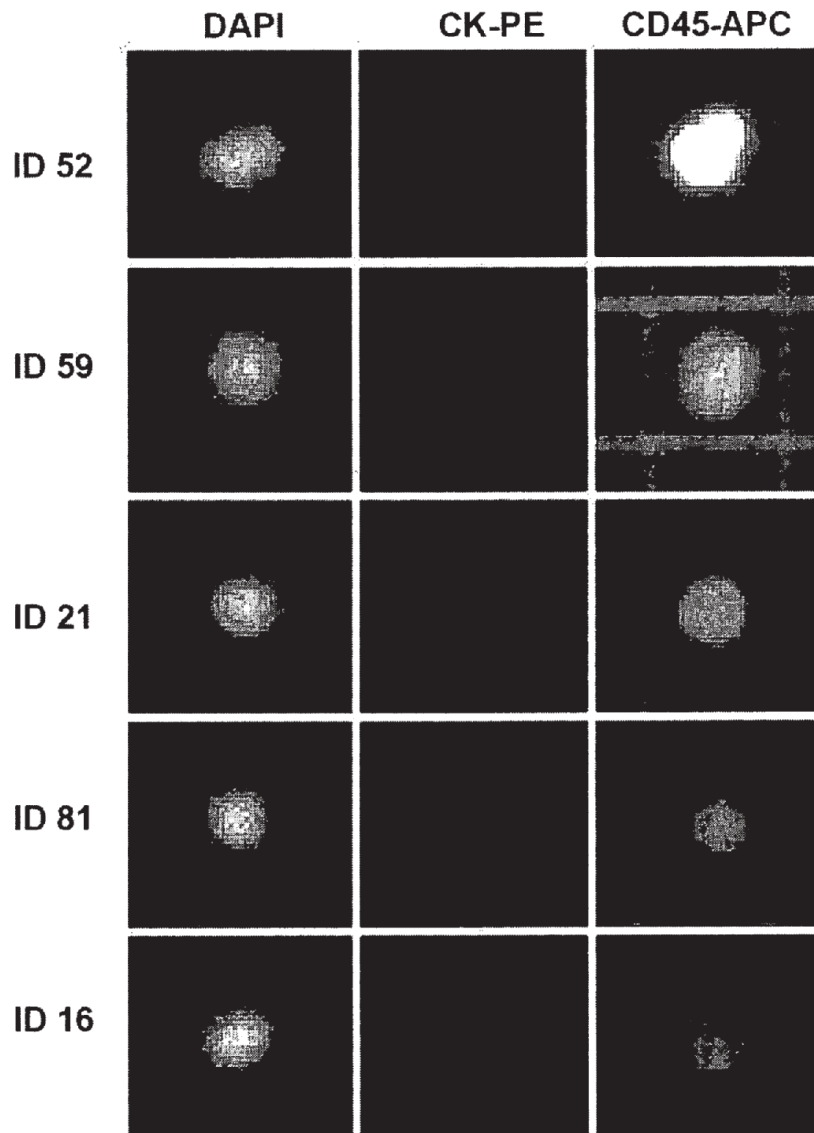


FIG. 9

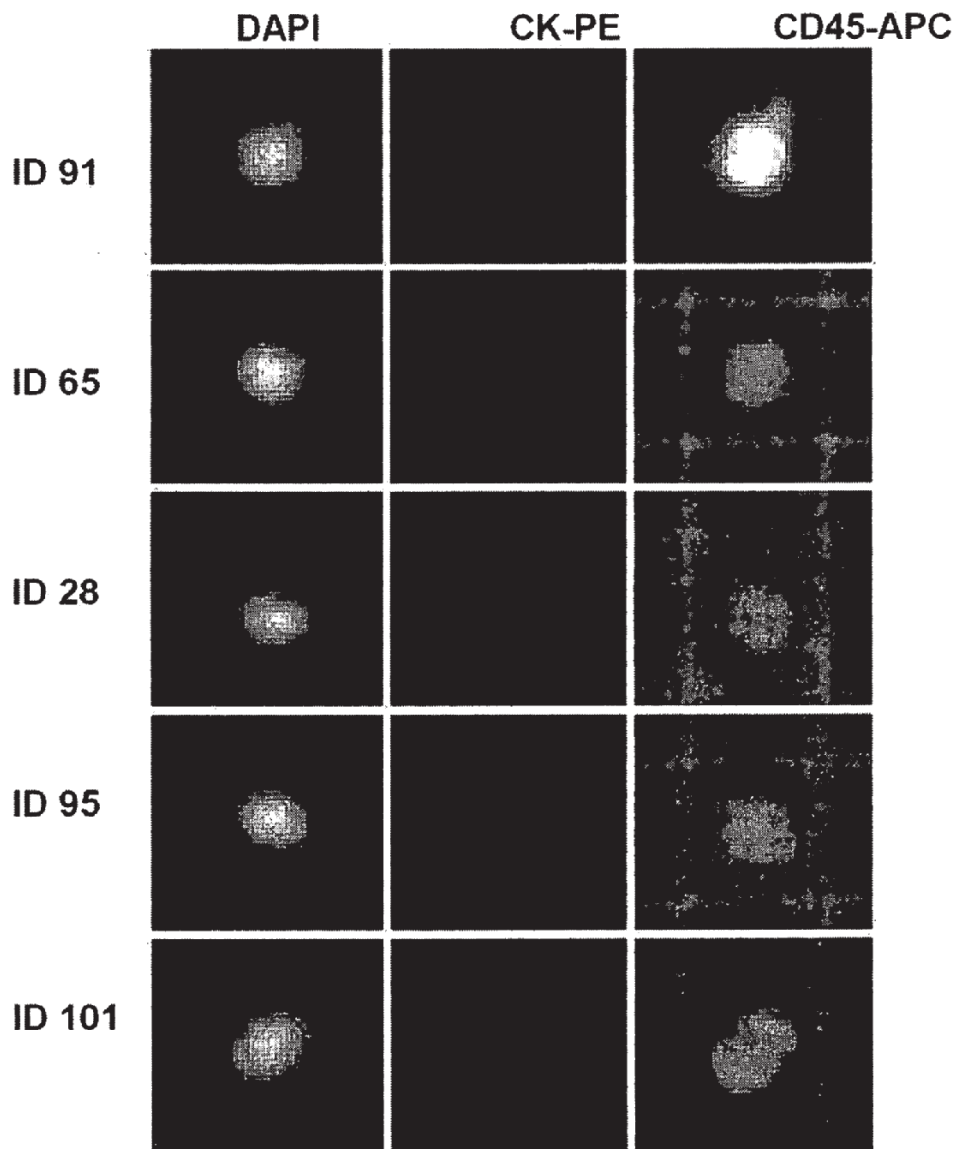


FIG. 10

