

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 220**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2011 PCT/US2011/056100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12051390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2011 E 11778732 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2628008**

54 Título: **Métodos y kits para la detección de células tumorales circulantes en pacientes pancreáticos utilizando reactivos poliespecíficos de captura y coctel de detección**

30 Prioridad:

14.10.2010 US 393036 P

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

27.09.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)
700 US Highway 202
Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**RAO, GALLA, CHANDRA y
CONNELLY, MARK, CARLE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 634 220 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).

Métodos y kits para la detección de células tumorales circulantes en pacientes pancreáticos utilizando reactivos poliespecíficos de captura y coctel de detección

Descripción

5

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. número 61/393.036, presentada el 14 de octubre, 2010.

10

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] Esta invención se refiere a los campos de la oncología y pruebas de diagnóstico. La invención es útil para la detección del cáncer, puesta en escena, el seguimiento de las respuestas de tratamiento de la quimioterapia, la recurrencia del cáncer o similares. Más específicamente, la presente invención proporciona reactivos, métodos y kits de prueba que facilitan el análisis y enumeración de las células tumorales, u otras células raras aisladas de muestras biológicas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

[0003] La enumeración de las células tumorales (CTC) circulante en pacientes con cáncer de mama metastásico, próstata y cancer de colon utilizando el ensayo CellSearch CTC predice la supervivencia del paciente y permite la monitorización de la respuesta al tratamiento. Adicionalmente, CTC puede caracterizarse por una variedad de marcadores moleculares, que ha sido propuesto como una manera de estudiar la biología del tumor de forma dinámica en los pacientes. Sin embargo, ha habido pocos estudios sobre la detección de los CTC en pacientes con cáncer de páncreas y estudios preliminares sugirieron que la configuración del ensayo original puede no ser óptimo para la detección de estas células (véase el documento US 7.332.288). El ensayo original de CellSearch CTC utiliza anti-EpCAM conjugado con nanopartículas paramagnéticas (ferrofluido EpCAM) para capturar los CTC. Los CTC capturadas por ferrofluido EpCAM se tiñen con anticuerpo de anti-citoqueratina (CK8, 18 y 19) conjugado con ficoeritrina para detectar CTC.

25

30

[0004] Además del problema de las células de diferentes tipos de cáncer que pueden expresar antígenos tumorales diferentes que los de mama, próstata o cáncer colorrectal, hay una creciente literatura que describe la heterogeneidad de las células dentro de los tumores primarios. Los avances recientes han demostrado que las células progenitoras del tumor (TPC) pueden ser críticamente importantes para explicar por qué algunos cánceres regresan después de quimioterapia. Estos cursos de política comercial parecen ser altamente resistentes a muchas terapias tradicionales, y son capaces de restablecer el tumor en algún momento en el futuro. Recientemente, la literatura también ha identificado las células de transición mesenquimales del epitelio (EMT) que pueden desempeñar un papel importante en el proceso de metástasis. Se cree que tanto TPC como EMT expresan antígenos diferentes de los de los CTC. La captura de CTC depende de la expresión de EpCAM en los CTC; porque la captura de CTC se ha limitado a un único antígeno de captura. La biología de EpCAM en los CTC no se entiende bien y es posible que el antígeno EpCAM puede ser regulado hacia abajo o negativo en algunos CTC. En tales casos, el CTC no será capturado por EpCAM ferrofluido y resultará sin CTC en el ensayo. Otra posibilidad es que los CTC son capturados pero no se detectan debido a la ausencia de marcadores de citoqueratina utilizados en el ensayo. Como consecuencia, aunque muchos CTC se capturan exitosamente y se detectan por la tecnología actual, es posible que no están presentes en la sangre de pacientes con cáncer de CTC que no son detectadas porque no expresan los marcadores usados en el ensayo actual. Por último, no se sabe si TPC y EMT circulan en la sangre y pueden detectarse. Sin embargo, el hecho de que la tecnología de captura y de detección de corriente se ha limitado a la focalización de un antígeno o clase de antígenos significa que es improbable que TPC o EMT serían detectados con la tecnología actual.

35

40

45

50

[0005] Basado en lo anterior, es evidente que un método para la identificación de estas células en circulación antes del establecimiento de un tumor secundario es muy deseable, en particular desde el principio del cáncer. Muchos procedimientos de laboratorio y clínicos emplean reacciones de afinidad bio-específica para el aislamiento de células raras a partir de muestras biológicas. Tales reacciones se emplean comúnmente en las pruebas de diagnóstico, o para la separación de una amplia gama de sustancias diana, especialmente entidades biológicas tales como células, proteínas, bacterias, virus, secuencias de ácidos nucleicos, y similares.

55

[0006] Varios métodos están disponibles para el análisis o la separación de las sustancias diana mencionadas anteriormente sobre la base de la formación del complejo entre la sustancia de interés y otra sustancia a la que la sustancia diana se une específicamente. La separación de complejos a partir de material no unido se puede conseguir gravitacionalmente, por ejemplo, por sedimentación, o, alternativamente, por centrifugación de partículas finamente divididas o perlas acopladas a la sustancia diana. Si se desea, tales partículas o perlas se pueden hacer magnéticas para facilitar la etapa de separación unida/libre. Las partículas magnéticas se conocen bien en la técnica, al igual que su utilización en reacciones de afinidad bio-específica inmune y otros. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.554.088 y inmunoensayos de Clinical Chemistry, pp. 147-162, Hunter et al. eds.,

60

65

Churchill Livingston, Edimburgo (1983). generalmente, cualquier material que facilita la separación magnética o gravitacional se puede emplear para este propósito. Sin embargo, ha quedado claro que los medios de separación magnética son el método de elección.

5 **[0007]** Las partículas magnéticas se pueden clasificar sobre la base de su tamaño como de grande (1,5 a aproximadamente 50 micrómetros), pequeña (0,7-1,5 micras), o coloidal (<200 nm), que también se denominan nanopartículas. Estas últimas, que también son conocidas como ferrofluidos o materiales de tipo ferrofluido y tienen muchas de las propiedades de ferrofluidos clásicos, a veces se denominan en el presente documento como coloidales, partículas superparamagnéticas.

10 **[0008]** Pequeñas partículas magnéticas del tipo descrito anteriormente son muy útiles en los análisis que implican reacciones de afinidad bio-específica, ya que están convenientemente recubiertas con polímeros biofuncionales (por ejemplo, proteínas), proporcionan áreas superficiales muy altas y dan cinética de reacción razonable. Las partículas magnéticas que van desde 0,7-1,5 micras se han descrito en la literatura de patentes, incluyendo, a modo de ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 3.970.518.; 4.018.886; 4.230.685; 4.267.234; 4.452.773; 4.554.088; y 4.659.678. Algunas de estas partículas se describen como soportes sólidos útiles para reactivos inmunológicos.

15 **[0009]** Al igual que las pequeñas partículas magnéticas mencionadas anteriormente, las partículas magnéticas grandes (> 1,5 micrómetros a aproximadamente 50 micrómetros) pueden también exhibir comportamiento superparamagnético. Típicos de tales materiales son los descritos por Ugelstad en la patente de EE.UU. No.4,654,267 y fabricados por Dynal, (Oslo, Noruega). El proceso de Ugelstad implica la síntesis de partículas de polímero que se hinchan y cristales de magnetita se incrustan en las partículas hinchadas. Otros materiales en el mismo rango de tamaño se preparan mediante la síntesis de la partícula de polímero en presencia de cristales de magnetita dispersos. Esto da como resultado la captura de cristales de magnetita en una matriz de polímero, con lo que los materiales resultantes se hacen magnéticos. En ambos casos, las partículas resultantes tienen comportamiento superparamagnético, que se manifiestan por la capacidad de dispersar fácilmente tras la retirada del campo magnético. A diferencia de los coloides magnéticos o nanopartículas a las que se hace referencia anteriormente y se discuten en más detalle a continuación, estos materiales, así como pequeñas partículas magnéticas, se separan fácilmente con magnética simple de laboratorio debido a la masa de material magnético por partícula. Por lo tanto, las separaciones son efectuadas en gradientes de unos pocos cientos de gauss/cm en hasta aproximadamente 1,5 kilogauss/cm. Las partículas coloidales magnéticas, (por debajo de aproximadamente 200 nm), por otro lado, requieren gradientes magnéticos sustancialmente más altos debido a su energía de difusión, pequeña masa magnética por partícula y carga de Stokes.

20 **[0010]** Patente de Estados Unidos No. 4.795.698 a Owen et al. se refiere a partículas recubiertas de polímero, coloidales, superparamagnéticas que se producen por la formación de magnetita de sales Fe^{+2}/Fe^{+3} en la presencia de polímero. Patente de Estados Unidos. No. 4.452.773 a Molday describe un material similar en propiedades al descrito en Owen et al., que se produce formando magnetita y otros óxidos de hierro a partir de Fe^{+2}/Fe^{+3} a través de adición de bases en presencia de concentraciones muy altas de dextrano. Las partículas resultantes de ambos procedimientos presentan una tendencia apreciable de no asentarse a partir de suspensiones acuosas durante periodos de observación de hasta varios meses. Materiales producidos de este modo tienen propiedades coloidales y han demostrado ser muy útiles en la separación de células. La tecnología Molday ha sido comercializada por Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania y Terry Thomas, Vancouver, Canadá.

25 **[0011]** Otro método para producir partículas superparamagnéticas coloidales se describe en la patente de los Estados Unidos. No. 5.597.531. En contraste con las partículas descritas en patentes de Owen et al., o de Molday, estas últimas partículas se producen mediante el recubrimiento directo de un polímero biofuncional sobre cristales superparamagnéticos pre-formados que han sido dispersados por energía sónica de alta potencia en agrupaciones cristalinas cuasi estables que van de 25 a 120 nm. Las partículas resultantes, denominadas en este documento como partículas directamente revestidas, presentan un momento magnético significativamente mayor que las partículas coloidales del mismo tamaño en general, tales como los descritos por Molday o Owen et al.

30 **[0012]** Técnicas de separación magnética se conocen en las que un campo magnético se aplica a un medio fluido con el fin de separar cuerpos ferromagnéticos del medio fluido. Por el contrario, la tendencia de partículas coloidales, superparamagnéticas de permanecer en suspensión, en conjunto con su capacidad de respuesta magnética relativamente débil, requiere el uso de técnicas de separación magnética de alta gradiente (HGMS) para separar tales partículas de un medio fluido no magnético en el que se suspenden. En sistemas de HGMS, el gradiente del campo magnético, es decir, la derivada espacial ejerce una mayor influencia sobre el comportamiento de las partículas suspendidas que se ejercen por la fuerza del campo en un punto dado.

35 **[0013]** Los sistemas de HGMS se pueden dividir en dos grandes categorías. Una de estas categorías incluye sistemas de separación magnética que emplean un circuito magnético que está completamente situado externamente a una cámara o vaso de separación. Los ejemplos de tales separadores externos se describen en la patente de los Estados Unidos. No. 5.186.827 a Liberti et al. En varias de las realizaciones descritas en esta patente, el gradiente de campo magnético necesario se produce colocando imanes permanentes alrededor de la periferia de un recipiente no magnético de tal manera que los polos iguales de los imanes están en una configuración de

oposición de campo. La extensión de la gradiente de campo magnético dentro del medio de ensayo que puede obtenerse en un sistema de este tipo está limitado por la fuerza de los imanes y la distancia de separación entre los imanes. Por lo tanto, existe un límite finito a gradientes que se pueden obtener con sistemas de gradiente externos.

5 **[0014]** Otro tipo de separador de HGMS utiliza una estructura de recogida ferromagnética que está dispuesta dentro del medio de ensayo con el fin de 1) intensificar un campo magnético aplicado y 2) producir un gradiente de campo magnético dentro del medio de ensayo. En un tipo conocido de sistema de HGMS interno, lana de acero fina o gasa se embala dentro de una columna que está situada adyacente a un imán. El campo magnético aplicado se concentra en la proximidad de los alambres de acero de manera que las partículas magnéticas suspendidas se atraen hacia, y se adhieren a, las superficies de los alambres. El gradiente producido en tales alambres es inversamente proporcional al diámetro del alambre, de manera que el alcance magnético se disminuye con el aumento de diámetro. Por lo tanto, muy altos gradientes pueden ser generados.

15 **[0015]** Una desventaja de sistemas de gradiente internos es que el uso de lana de acero, material de gasa, o microperlas de acero, puede atrapar componentes no magnéticos del medio de ensayo por acción capilar en la proximidad de alambres que se cortan o dentro de intersticios entre alambres que se cortan. Diversos procedimientos de revestimiento se han aplicado a tales columnas de gradiente interno (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,693,539 a Miltenyi y 4,375,407 a Kronick), sin embargo, la gran área superficial en tales sistemas todavía crea problemas de recuperación debido a la adsorción. Por lo tanto, los sistemas de gradiente internos no son deseables, particularmente cuando la recuperación de entidades capturadas de muy baja frecuencia es el objetivo de la separación. Además, hacen la automatización difícil y costosa. Ambos materiales descritos por Owen et al., y Molday requieren el uso de tales columnas de alto gradiente.

25 **[0016]** En contraste, enfoques de HGMS utilizando gradientes externos para la separación de células proporciona un número de ventajas. En primer lugar, se pueden emplear recipientes de laboratorio simples, tales como tubos de ensayo, tubos de centrifuga o incluso tubos de vacío (usados para recogida de sangre). Cuando los gradientes externos son del tipo que producen monocapas de células separadas, como es el caso con dispositivos de cuadrupolo/hexapolo de la Patente de Estados Unidos mencionada anteriormente. Patente de EE.UU. No. 5,186,827 o la disposición de dipolo opuesta descrita en la Patente de Estados Unidos 5.466.574 a Liberti et al., el lavado de las células o las manipulaciones posteriores se facilitan. Además, la recuperación de las células de tubos o recipientes similares es un proceso sencillo y eficiente. Esto es particularmente el caso cuando se comparan con las recuperaciones de columnas de alto gradiente. Tales recipientes de separación también proporcionan otra característica importante, que es la capacidad de reducir el volumen de muestra. Por ejemplo, si un subconjunto de células de la sangre humana particular, (por ejemplo, células CD 34⁺ magnéticamente etiquetadas), se aísla de una muestra de sangre de 10 ml diluida al 50% con tampón para reducir la viscosidad, un tubo de ensayo cónico de 15 ml se puede emplear como el recipiente de separación en un dispositivo magnético cuadrupolo apropiado. Comenzando con 15 ml de solución, se realiza una primera separación, y las células recuperadas se resuspenden en 3 mls. Un segundo lavado/separación se realiza a continuación, y las células aisladas se resuspendieron en un volumen final de 200 μ l. Después de los lavados y/o separaciones y resuspensiones para remover las células no unidas, las células CD 34⁺ pueden ser efectivamente resuspendidas en un volumen de 200 μ l. Cuando se hace con cuidado en vasos tratados apropiadamente usando ferrofluidos directamente recubiertos que han sido optimizados para estos separadores, la recuperación de células es bastante eficiente en el intervalo de 40-90% dependiendo en la densidad del antígeno. Dichas técnicas y reactivos son esenciales para alcanzar el grado de sensibilidad requerida para las clases de pruebas para el cáncer mencionadas anteriormente.

45 **[0017]** La eficiencia con la que las separaciones magnéticas se pueden hacer y la recuperación y pureza de células marcadas magnéticamente dependerá de muchos factores. Estos incluyen consideraciones tales como el número de células que se separan, la densidad de receptores de tales células, la carga magnética por célula, la unión no específica (NSB) del material magnético, la técnica empleada, la naturaleza del recipiente, la naturaleza de la superficie del recipiente, la viscosidad del medio y el dispositivo de separación magnética empleado. Si el nivel de unión no específica de un sistema es sustancialmente constante, como suele ser el caso, entonces cuando la población diana se disminuye también lo hará la pureza. Como ejemplo, un sistema con 0,8% de NSB que recupera el 80% de una población que está en el 0,25% en la mezcla original tendrá una pureza del 25%. Mientras que, si la población inicial estaba en 0,01% (una célula diana en 10⁶ células espectadoras), y si NSB fueron 0,001%, entonces la pureza sería 8%. Cuanto mayor sea la pureza, más fácil y mejor será el análisis. Por lo tanto, es evidente que se requiere extremadamente baja unión no específica para realizar el análisis significativo de células raras.

60 **[0018]** Menos obvio es el hecho de que cuanto menor sea la población de una célula dirigida, más difícil será para etiquetarse magnéticamente y recuperarse. Además, el etiquetado y la recuperación dependerán marcadamente de la naturaleza de la partícula magnética empleada. Por ejemplo, cuando las células se incuban con partículas magnéticas grandes, tales como perlas Dynal, las células se marcan a través de colisiones creadas mediante el mezclado del sistema, ya que las perlas son demasiado grandes para difundirse eficazmente. Por lo tanto, si estaba presente en una población una célula a una frecuencia de 1 célula por ml de sangre, o incluso menos, como puede ser el caso para las células tumorales en cánceres muy tempranos, entonces la probabilidad de etiquetar las células diana se relaciona con el número de partículas magnéticas añadido al sistema y la duración del tiempo de mezcla. Ya que la mezcla de células con tales partículas durante periodos sustanciales de tiempo sería perjudicial, se hace

necesario aumentar la concentración de partículas tanto como sea posible. Hay, sin embargo, un límite a la cantidad de partículas magnéticas que pueden ser añadidas, ya que se puede sustituir una célula rara mezclada con otras células de la sangre por una célula rara mezclada con grandes cantidades de partículas magnéticas en la separación. Esta última condición no mejora notablemente la capacidad de enumerar las células de interés o de examinarlas.

[0019] Hay otro inconveniente del uso de partículas grandes para aislar células en frecuencias raras (de 1 a 50 células por ml de sangre). A pesar de que grandes partículas magnéticas permiten el uso de gradientes externos de diseño muy simple y relativamente de bajo gradiente magnético, las partículas grandes tienden a agruparse alrededor de las células de una manera en forma de jaula haciendo las células difíciles de ver o de analizar. Por lo tanto, las partículas magnéticas deben ser liberadas de las células diana antes del análisis, y la liberación de las partículas claramente introduce otras complicaciones.

[0020] Basado en lo anterior, la separación magnética de gradiente alto con un dispositivo de campo externo que emplea partículas altamente magnéticas, de baja unión no específica, coloidales magnéticas es el método de elección para separar un subconjunto de células de interés de una población mixta de células eucariotas, particularmente si el subconjunto de interés comprende únicamente una pequeña fracción de toda la población. Dichos materiales, debido a sus propiedades de difusión, encuentran fácilmente y etiquetan magnéticamente eventos raros, tales como células tumorales en sangre. Tal separación se basa generalmente en la identificación de antígenos de superficie celular que son únicos para un subconjunto específico de células de interés, que en el caso de las células tumorales, pueden ser antígenos tumorales a los que ferrofluidos monoclonales de anticuerpo conjugado apropiados pueden ser dirigidos. Alternativamente, cuando se examina una muestra de sangre, determinantes en clases de células, tales como células epiteliales, que normalmente no se encuentran en la sangre, pueden proporcionar un receptor apropiado.

[0021] Hay otras buenas razones para emplear un material magnético coloidal para tales separaciones, siempre que se pueda lograr una carga magnética apropiada. Con la carga apropiada, una fuerza suficiente se ejerce sobre una célula de tal manera que el aislamiento se puede conseguir incluso en un medio viscoso como el de sangre completa moderadamente diluida. Como se ha señalado, los materiales magnéticos coloidales por debajo de aproximadamente 200 nanómetros exhibirán movimiento browniano que mejora marcadamente su capacidad de colisionar con células raras y magnéticamente etiquetarlas. Esto se demuestra en la patente de EE.UU. No. 5.541.072 en la que se describen los resultados de experimentos de purga de células tumorales muy eficientes empleando partículas magnéticas coloidales o ferrofluidos que tienen un diámetro medio de 100 nm. Igual de importante, los materiales coloidales que tienen un tamaño de partícula en o por debajo de este rango de tamaño generalmente no interfieren con el examen de las células. Las células así recuperadas se pueden examinar por citometría de flujo, microscopía de escaneo láser, o por microscopía empleando técnicas visibles o fluorescentes.

[0022] WO 99/41613 describe un método para la detección y enumeración de células de carcinoma en sangre, que combina el enriquecimiento inmunomagnético con análisis de citometría y el inmunocitoquímico de flujo multiparamétrico. Myklebust et al. (1993) considera la eliminación eficaz de células de SCLC desde la médula ósea humana. El documento WO2009/005536 se refiere a métodos de captura de células enteras bacterianas y análisis de muestras para las bacterias, el uso de dos o más anticuerpos. El documento WO2007/121464 se refiere a un método de detección de células endoteliales circulantes. US 5.145.784 se refiere a un dispositivo de flujo capilar útil en ensayos de captura doble, tales como la doble captura de inmunoensayo. Zieglschmid et al. (2005) se refiere a una combinación de enriquecimiento inmunomagnético con análisis multiplex RT-PCR para la detección de células tumorales diseminadas. DE 101 43 775 (también publicada como US2006/0246430) se refiere a un método para el diagnóstico de cáncer intestinal en una aplicación humana.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0023] La invención proporciona un método para detectar y enumerar células raras en una población de células mixtas a partir de una muestra biológica obtenida de un paciente que comprende una población de células mixtas que se sospecha que contiene dichas células raras, la presencia de dichas células raras en dicha población es indicativa de un estado de enfermedad, que comprende: (a) preparar una muestra inmunomagnética en la que dicha muestra biológica se mezcla con un ferrofluido poliespecífico conjugado con tres anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en anti-EpCAM, anti-EGFR1, anti-Muc1 y anti-Claudin4, en el que uno de los anticuerpos es anti-EpCAM; (b) poner en contacto dicha muestra inmunomagnética con al menos un reactivo poliespecífico que etiqueta dichas células raras, donde el reactivo poliespecífico comprende anticuerpos para citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19; y (c) analizar dichas células etiquetadas raras para determinar la presencia y el número de las células raras en dicha muestra inmunomagnética, mayor será el número de células raras presentes en dicha muestra, mayor será la severidad de dicho estado de enfermedad.

[0024] La invención también proporciona un kit para el cribado de una muestra del paciente para la presencia de células tumorales circulantes, que comprende: (a) nanopartículas magnéticas recubiertas que comprenden un material de núcleo magnético, un material de recubrimiento a base de proteína, y tres anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en anti-EpCAM, anti-EGFR1, anti-Muc1 y anti-Claudin4, en el que uno de los anticuerpos es anti-

EpCAM, acoplados, directa o indirectamente, a dicho material de recubrimiento de base; (b) anticuerpos que se unen a la citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19; y (c) tinte de células específicas para excluir componentes de muestra distintos de dichas células tumorales de análisis.

5 RESUMEN

[0025] Se da a conocer en el presente documento un método de detección rápido y eficiente para la caracterización de no sólo células tumorales, sino también células raras, o de otras entidades biológicas a partir de muestras biológicas. El método de la invención proporciona técnicas analíticas muy sensibles que permiten el enriquecimiento eficiente para las entidades de interés. Esta metodología de dos etapas que asegura el enriquecimiento de bioentidades diana mientras que elimina una cantidad sustancial de desechos y otras sustancias que interfieren antes del análisis, permite el examen de tamaños de la muestra que de otro modo sería poco práctico. El método descrito en el presente documento combina elementos de enriquecimiento inmunomagnético con análisis citométrico, microscópico y inmunocitoquímico de flujo de parámetros múltiples de una manera única. Otros medios de enriquecimiento, tales como centrifugación en gradiente de densidad o panning o alteración de la densidad de células diana mediante el etiquetado apropiado también se pueden utilizar. Según una realización preferida, el método de la invención permite el ensayo de sangre entera para la estadificación del cáncer, el seguimiento y detección. La naturaleza sensible del ensayo facilita la detección de la enfermedad residual, por lo que es posible monitorizar para la recurrencia del cáncer.

[0026] Se da a conocer en el presente documento un método para conjugar diferentes anticuerpos al mismo ferrofluido. Esto tiene el efecto de hacer el ferrofluido bi-, tri-, o poliespecífico con respecto a los antígenos a los que se unirá el ferrofluido. Los múltiples anticuerpos presentes en el mismo ferrofluido no parecen bloquear o interferir de otro modo entre sí. Tales ferrofluidos tienen el efecto altamente deseable de ser capaces de unirse específicamente a más de un tipo de célula, lo que permite la capacidad de capturar los CTC que tienen baja expresión de Ep-CAM, pero una alta expresión de otros marcadores tumorales;

[0027] En una realización de la divulgación, se obtiene de un paciente un espécimen biológico, que comprende una población de células mixtas que se sospecha que contiene la célula rara de interés. Una muestra inmunomagnética se prepara entonces mezclando la muestra biológica con (i) partículas magnéticas que están acopladas a un ligando biospecífico específicamente reactivo con un determinante de células raras o una clase de determinantes diferentes a los encontrados en células de la sangre, a la exclusión sustancial de otros componentes de la muestra, y (ii) al menos un reactivo biospecífico que etiqueta células raras. La muestra inmunomagnética resultante se somete a un campo magnético que es eficaz para separar la muestra en una fracción no marcada y una fracción etiquetada, magnética incluyendo la célula rara de interés, si cualquiera está presente en la muestra. Se analiza entonces la población de células aislada de este modo para determinar la presencia y el número de células raras. En una realización preferida las partículas usadas en este método son nanopartículas coloidales.

[0028] La presente descripción permite una detección mejorada de los CTC en pacientes con cáncer pancreático. Usando reactivos poliespecíficos de captura y detección, en lugar de los únicos reactivos de anti-EpCAM, los reactivos poliespecíficos tales como, pero no limitados a, anti-EpCAM utilizada como controles juntos con varios otros anticuerpos que reconocen diferentes antígenos en los CTC se usan para detectar células cancerosas circulantes, sin detectarse previamente en la sangre de pacientes. El reactivo de captura se conoce como reactivo de captura poliespecífico ya que reconoce varios antígenos. Como resultado, la captura CTC no depende de antígeno de EpCAM solo y los CTC se capturan incluso si el antígeno EpCAM no se expresa siempre que otros antígenos seleccionados para la captura están presentes en CTC. La capacidad de crear ferrofluidos poliespecíficos que tienen suficiente capacidad de unión, baja unión no específica, y ningún bloqueo transversal de los anticuerpos permite la captura de todos los diversos tipos de CTC; junto con el uso de un cóctel de detección apropiada específica de anticuerpos. En la presente invención, un cóctel de anticuerpos específicos para los CTC, en lugar de un solo anticuerpo se conjuga con ferrofluido para que la captura minimice la dependencia de captura de CTC de una sola diana. Además, los anticuerpos adicionales para la detección se utilizan para cubrir una más amplia gama de antígenos. Aunque la presente invención se ocupa del campo de las células tumorales circulantes, se consideran otras formas de análisis de células raras en la sangre.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0029]

Figura 1. (A) muestra la intensidad de tinción de cuatro líneas celulares como una función de la expresión del antígeno diana en la superficie celular. Todos los anticuerpos se ensayaron a 2 ug/ml (n = 2). (B) muestra la población positiva de porcentaje de promedio de cuatro líneas celulares para la expresión de antígeno diana.

Figura 2 (A) muestra la intensidad de tinción de cuatro líneas celulares como una función de expresión intracelular de antígeno diana. (B) muestra la población positiva de porcentaje de promedio de cuatro líneas celulares para la expresión de antígeno diana.

Figura 3 (A) muestra la recuperación de las células tumorales CAPAN1 púas con diferentes configuraciones de kit. **(b)** muestra la recuperación de las células tumorales BxPC3 con diferentes configuraciones de kit.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0030] De acuerdo con una realización preferida, la presente divulgación proporciona composiciones, métodos y kits para el aislamiento rápido y eficiente de bioentidades raras diana a partir de muestras biológicas usando ferrofluidos poliespecíficos. Los métodos descritos se pueden usar eficazmente para aislar y caracterizar células tumorales presentes en una muestra de sangre, mientras que al mismo tiempo reducen al mínimo la selección de células unidas no específicamente.

[0031] Mediante el uso de reactivos de captura múltiple y detección, tal como se describe en este documento, ensayos de células raras se mejoran además a partir de la molécula diana sola utilizada anteriormente. Esta modificación mejora la captura y detección de células raras, tales como, pero no limitado a, los CTC pancreáticos. Además, los marcadores no epiteliales tales como marcadores mesenquimales (n-cadherina) se pueden utilizar en conjunción con marcadores epiteliales para capturar las células tumorales epiteliales y mesenquimales. La presente invención permite la detección simultánea de diferentes poblaciones de células raras, tales como los CTC y diferentes poblaciones de células tumorales.

[0032] El término "bioentidades diana" como se usa en el presente documento se refiere a una amplia variedad de materiales de interés biológico o médico. Los ejemplos incluyen hormonas, proteínas, péptidos, lectinas, oligonucleótidos, fármacos, sustancias químicas, moléculas de ácido nucleico, (por ejemplo, ARN y/o ADN) y analitos de particulado de origen biológico, que incluyen partículas biológicas tales como células, virus, bacterias y similares. En una realización preferida de la descripción, las células raras, tales como las células fetales en la circulación materna, o células cancerosas circulantes se pueden aislar eficientemente de las células no diana y/o otras bioentidades, utilizando las composiciones, métodos y kits descritos en este documento. El término "espécimen biológico" incluye, sin limitación, células corporales que contienen fluidos, sangre periférica, homogeneizados de tejido, aspirados de pezón, y cualquier otra fuente de células raras que se obtienen de un sujeto humano. Un homogeneizado de tejido ejemplar puede ser obtenido del ganglio de centinela en un paciente de cáncer de mama. El término "determinante", cuando se usa en referencia a cualquiera de las bioentidades diana anteriores, puede estar unido específicamente por un ligando bioespecífico o un reactivo bioespecífico y se refiere a la porción de la bioentidad diana implicada en la sustancia de unión selectiva y responsable de ella, cuya presencia se requiere para que ocurra la unión selectiva. En términos fundamentales, los determinantes son regiones de contacto molecular en bioentidades diana que son reconocidas por receptores en reacciones de par de unión específica. El término "par de unión específica", como se usa en este documento incluye antígeno-anticuerpo, receptor de hormona, receptor-ligando, agonista-antagonista, lectina-carbohidrato, secuencias de hibridación de ácido nucleico (ARN o ADN), receptor Fc o IgG-proteína A de ratón, avidina-biotina, estreptavidina-biotina e interacciones de virus-receptor. Varias otras combinaciones de sustancia de unión de determinantes específicos se contemplan para su uso en aplicar los métodos de esta descripción, como será evidente para los expertos en la técnica. El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos de inmunoglobulinas inmunorreactivos y anticuerpos de cadena sencilla. El término "etiquetar de modo detectable" se usa en el presente documento para referirse a cualquier sustancia cuya detección o medición, directa o indirectamente, por medios físicos o químicos, es indicativa de la presencia de la bioentidad diana en la muestra de prueba. Ejemplos representativos de marcadores detectables útiles, incluyen, pero no se limitan a los siguientes: moléculas o iones directa o indirectamente detectables en base a absorbancia de luz, fluorescencia, reflectancia, dispersión de luz, fosforescencia, o propiedades de luminiscencia; moléculas o iones detectables por sus propiedades radiactivas; moléculas o iones detectables por sus propiedades de resonancia magnética nuclear o paramagnéticas. Incluidas entre el grupo de moléculas indirectamente detectables en base a absorbancia de luz o fluorescencia, por ejemplo, están diversas enzimas que dan lugar a que sustratos apropiados se conviertan, por ejemplo, de moléculas que no absorben luz a moléculas que la absorben, o de moléculas no fluorescente a moléculas fluorescentes. La frase "a la exclusión sustancial de" se refiere a la especificidad de la reacción de unión entre el ligando bioespecífico o reactivo bioespecífico y su diana correspondiente determinante. Ligandos bioespecíficos y reactivos tienen actividad de unión específica para su objetivo determinante aún puede también exhibir un bajo nivel de unión no específica a otros componentes de la muestra. El término "cáncer en etapa temprana" como se usa aquí se refiere a aquellos tipos de cáncer que han sido clínicamente determinados a estar confinados a órganos. También se incluyen los tumores que son demasiado pequeños para ser detectados por métodos convencionales tales como la mamografía para pacientes con cáncer de mama, o rayos X para pacientes con cáncer de pulmón. El término "enriquecimiento" tal como se usa aquí, se refiere al enriquecimiento de células mononucleares a partir de una muestra biológica. En los casos en que se utiliza sangre periférica como materiales de partida, los glóbulos rojos no se cuentan cuando se evalúa el grado de enriquecimiento. Las partículas magnéticas preferidos para su uso en la realización de esta invención son partículas que se comportan como coloides. Tales partículas se caracterizan por su tamaño de sub-micras de partícula, que es generalmente menor que aproximadamente 200 nanómetros (nm) (0,20 micrones), y su estabilidad a la separación gravitatoria de la solución durante periodos de tiempo extendidos. Además de las muchas otras ventajas, este rango de tamaño las hace esencialmente invisibles para técnicas analíticas comúnmente aplicados para el análisis de células. Partículas dentro del intervalo de 90-150 nm y que tienen una masa magnética de entre 70-90% se contemplan para su uso en

la presente invención. Partículas magnéticas adecuadas se componen de un núcleo cristalino de material superparamagnético rodeado de moléculas que están unidas, por ejemplo, absorbidas físicamente o unidas covalentemente, al núcleo magnético y que confieren propiedades estabilizantes coloidales. El material de revestimiento preferiblemente se debe aplicar en una cantidad eficaz para evitar interacciones no específicas entre las macromoléculas biológicas encontradas en la muestra y los núcleos magnéticos. Tales macromoléculas biológicas pueden incluir residuos de ácido siálico en la superficie de células no diana, lectinas, glicoproteínas y otros componentes de membrana. Además, el material debe contener tanto masa magnética/nanopartícula como sea posible. El tamaño de los cristales magnéticos que comprende el núcleo es suficientemente pequeño para que no contienen un dominio magnético completo. El tamaño de las nanopartículas es suficientemente pequeño de tal manera que su energía browniana excede su momento magnético. Como consecuencia, alineación de Polo Norte, Polo Sur y posterior atracción mutua/repulsión de estas partículas magnéticas coloidales no parece ocurrir incluso en campos magnéticos moderadamente fuertes, lo que contribuye a su estabilidad de solución. Finalmente, las partículas magnéticas deben ser separables en separadores de campo externo de gradiente magnético elevado. Esa característica facilita la manipulación de la muestra y proporciona ventajas económicas sobre las columnas de gradiente interno más complicadas cargadas con perlas ferromagnéticas o lana de acero. Las partículas magnéticas que tienen las propiedades antes descritas se pueden preparar por modificación de los materiales de base descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.795.698, 5.597.531 y 5.698.271. Su preparación a partir de esos materiales de base se describe a continuación.

[0033] Cabe señalar que un número de diferentes plataformas de análisis celular se puede utilizar para identificar y enumerar las muestras enriquecidas. Ejemplos de tales formas plataformas analíticas son un sistema CellSpotter, un inmovilizador de célula magnética para la observación manual de las células, y el sistema CellTracks, un inmovilizador de célula magnética de escaneo óptico automático se describe en las solicitudes de patente de Estados Unidos 08/931.067 y 08/867.009, respectivamente. Las mencionadas solicitudes de patente de Estados Unidos describen el aparato respectivo y métodos para análisis de células cuantitativo y cualitativo manual o automatizado.

[0034] Otras plataformas de análisis incluyen Citometría de Escaneo Láser (Compucyte), análisis de imagen de base de campo brillante (Chromavision), y volumetría capilar (visualización biométrica).

[0035] La enumeración de células epiteliales circulantes en la sangre utilizando los métodos de la presente invención se consigue mediante selección inmunomagnética (enriquecimiento) de las células epiteliales de la sangre, seguido por el análisis de las muestras por citometría de flujo multiparamétrica. La preparación de la muestra inmunomagnética es importante para reducir el volumen de la muestra y la obtención de un enriquecimiento de 10^4 veces de las células diana (epiteliales). Los reactivos usados para el análisis de citometría de flujo multiparamétrica se optimizan de tal modo que las células diana se encuentran en una posición única en el espacio multidimensional creado por la adquisición de modo de lista de dos parámetros de dispersión de luz y tres de fluorescencia. Éstos incluyen 1) un anticuerpo contra el antígeno de panleucocitos, CD45 para identificar leucocitos (células no tumorales); un tipo de célula específico o tinte de ácido nucleico que permite la exclusión de células residuales rojas de la sangre, plaquetas y otros eventos no nucleados; y 3) un reactivo bioespecífico o anticuerpo dirigido contra citoqueratina o un anticuerpo que tiene especificidad para un epítipo EpCAM que se difiere de la utilizada para seleccionar inmunomagnéticamente las células.

Objetivos de captura:

[0036] Los anticuerpos utilizados para la captura fueron seleccionados basados en la prueba inicial con células tumorales cultivadas de tejido. La estrategia consistió en seleccionar una sección transversal de líneas de células que representan diferentes estados de diferenciación porque los niveles de expresión cambian de acuerdo al estado de diferenciación. Los datos sugieren que la mayoría de las líneas celulares de sitio principal están mal diferenciadas, mientras que líneas celulares derivadas de ascitis y metástasis están moderadamente a bien diferenciadas. Por lo tanto, las células tumorales BxPC3 (moderado), Panc-1 (mal), CAPAN-1 (bien) y CAPAN-2 (bien) se seleccionaron para la evaluación de anticuerpos basándose en el estado de diferenciación. EpCAM., Mucin1, Mesotelina, Claudin-4, EGFR1 y CEACAM6 estaba determinados como dianas para los antígenos de captura. Se empleó una estrategia de análisis de citometría de flujo para determinados niveles de expresión de antígeno y el porcentaje de cifras de población celular positiva. Todos los anticuerpos utilizados en el estudio fueron anticuerpos primarios y la tinción se controló usando anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con tinte fluorescente. La Figura 1 (A) muestra la intensidad de la tinción de las células con diversos marcadores que indican niveles de expresión. La Figura 1 (B) muestra el porcentaje de células positivas con los marcadores.

[0037] Los datos de la Figura 1 muestran que todos los objetivos seleccionados estaban presentes en las líneas celulares con diferentes niveles de expresión para cada una y el nivel de expresión no es consistente para todas las líneas celulares ensayadas. Los datos sugieren que la expresión de antígenos varía a través de líneas de células indicando que los antígenos también pueden variar en CTC similares a las células tumorales cultivadas de tejido. El análisis reveló que EpCAM, Claudin-4, EGFR1 y en cierta medida Mucina-1 se expresaron ubicuamente en todas las líneas celulares. Los antígenos se expresaron, en promedio, en 65% a 100% de las poblaciones de células. Por lo tanto, el uso de múltiples objetivos de captura para cubrir una amplia gama de células tumorales es importante para

captura efectiva. Además, estos marcadores deben ser específicos para las células tumorales y no deben estar presentes en las células blancas de la sangre. Los anticuerpos de captura candidatos fueron ensayados con las células blancas de la sangre. La mayoría de los marcadores se expresan a bajos niveles en las células blancas de la sangre, excepto CECAM6 que parece ser altamente prevalente en granulocitos y monocitos en un grado menor. Este resultado excluiría el uso de CECAM6 como un objetivo de captura para este ensayo. En base a los datos anteriores, EpCAM, Mucin1, Mesotelina, Claudin-4 y los antígenos de EGFR son buenos objetivos para la captura de las células tumorales.

Objetivos de detección:

[0038] Los anticuerpos para los diversos marcadores se ensayaron para la detección de células tumorales. Los marcadores ensayados fueron citoqueratinas 7, 8, 17, 18, 19 y c-Src. Estos marcadores se ensayaron a una concentración de 2 ug/ml por la citometría de flujo y en todas las cuatro líneas celulares. La Figura 2 (A) y la Figura 2 (b) resumen los resultados. La familia de citoqueratinas se expresa de forma ubicua en todas las líneas celulares (79% a 100% de la población fue positiva para al menos una de las dianas). La familia de c-Src también se expresó en todas las líneas celulares ensayadas con diferentes niveles de expresión (66% a 100% de la población positiva). En general, todos los anticuerpos de citoqueratina trabajaron igualmente bien con patrones y resultados de tinción comparables. El c-Src de R&D Systems parece ser un ligante débil y no muy brillante, aunque esto podría ser debido al secundario conjugado con FITC utilizado como agente de detección. Sin embargo, anti-citoqueratina 17 y anti-c-Src fueron positivas en las células blancas de la sangre (monocitos y granulocitos). Basándose en estos datos, citoqueratinas 7, 8, 18, y 19 fueron seleccionadas para uso como anti-cuerpos de detección de cóctel.

Conjugación de dianas de captura a ferrofluido:

[0039] Sobre la base de una evaluación inicial con líneas de células tumorales cultivadas con tejido pancreático, anti-EpCAM, anti-EGFR1, anti-MUC1 y anti-Claudin4 se seleccionaron para la captura. Un máximo de tres anticuerpos fueron conjugados a ferrofluido en varias combinaciones utilizando Veridex. La conjugación química de LLC y las combinaciones eran del siguiente modo:

- A. Ferrofluido poliespecífico de anti-EpCAM/EGFR1/Muc1.
- B. Ferrofluido poliespecífico de anti-EpCAM/EGFR1/Claudin4
- C. Ferrofluido poliespecífico de anti-EpCAM/Muc1/Claudin4

El anticuerpo de anti-EpCAM se utilizó en todas las combinaciones.

Conjugación de dianas de detección para ficoeritrina (PE):

[0040] Anti-citoqueratina (anticuerpo C11 que reconoce citoqueratina 8 y 18), anti-citoqueratina 7, anti-citoqueratina 18 y anti-citoqueratina 19 se conjugaron a PE usando química de conjugación estándar de Veridex LLC. Todos los anticuerpos de citoqueratina conjugados con PE fueron combinados con anti-CD45-APC para crear un reactivo de tinción de cóctel.

[0041] Se reconocerá por los expertos en la técnica que el método de análisis de la población de células tumorales enriquecido dependerá del uso previsto de la invención. Por ejemplo, en la detección de cánceres o vigilancia de la recurrencia de la enfermedad, como se describe más adelante, los números de células epiteliales en circulación pueden ser muy bajos. En ese caso, los análisis basados en microscopía pueden llegar a ser los más exactos. Dicho examen también puede incluir el examen de la morfología, la identificación de marcadores tumorales conocidos y/u oncogenes. Alternativamente, en estados de enfermedad en los que el número de células epiteliales en circulación es muy superior al observado en la población normal, un método analítico que enumera tales células debería ser suficiente. La determinación del estado del paciente de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento se hace en base a un promedio estadístico del número de células raras presentes en la población normal de circulación. Los niveles circulantes de células epiteliales en el paciente con cáncer de etapa temprana y en pacientes con cáncer metastásico agresivo también pueden determinarse estadísticamente como se expone en el presente documento.

[0042] Tal como se describió anteriormente, el kit comienza con reactivos, dispositivos y metodología para el enriquecimiento de las células tumorales de la sangre entera. El kit podría contener reactivos para la prueba de células de cáncer de mama en una muestra de sangre que evaluará seis factores o indicadores. La plataforma analítica necesita ser configurada de tal manera que las moléculas indicadoras DAPI, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y serán discriminadas por los filtros de excitación y emisión apropiados. La plataforma analítica en este ejemplo utiliza un microscopio fluorescente equipado con una lámpara de arco de mercurio, y los conjuntos de filtros apropiados para la evaluación de las longitudes de onda de las etiquetas de detección empleadas. Todos los marcadores se introducen a la vez con este método.

[0043] La presente invención mejora el kit de células epiteliales de búsqueda celular (Veridex, LLC). Varias combinaciones de ferrofluido poliespecífico y reactivos de detección de cóctel se incluyen en la presente invención

para crear diversas configuraciones de kit. La principal mejora se incorpora en los componentes de reactivo de captura y detección. Las diferentes configuraciones de kit son del siguiente modo:

- 1- Kit # 1 CellSearch Epitelial Cell Kit como control: EpCAM para captura; C11 (CK8, 18) y CK 19 para detección.
- 2- Kit # 2 Detección de captura múltiple y cóctel: Ep-CAM/EGFR/Muc-1 (E29) para la captura; C11 (CK8, 18) + CK19 + CD7 + CD18 para detección.
- 3- Kit # 3 Detección de captura múltiple y cóctel: Ep-CAM/EGFR/Claudin4 para la captura; C11 (CK8, 18) + CK19 + CK7 + CK18 para detección.
- 4- Detección de captura múltiple y cóctel: Ep-CAM/Muc-1 (E29)/Claudin4 para la captura; C11 (CK8, 18) + CK19 + CK7 + CK18 para la detección.

Evaluación de diferentes configuraciones de kit

[0044] Las configuraciones de kit anteriores fueron evaluadas primero con muestras de sangre normales a las que se ha añadido células tumorales pancreáticas cultivadas de tejido para comprobar su rendimiento. Células tumorales pancreáticas (líneas celulares BxPC3 y CAPAN-1) se añadieron a 7,5 ml de sangre de donantes CellSave (n=2). Las muestras se procesaron en CellTracks AutoPrep y se analizaron en CellTracks Analyzer II.

[0045] La recuperación de las células Capan-1 con los kits modificados era similar a la del Kit de la célula epitelial estándar (aproximadamente 60%), sin embargo no había consistentemente mayor recuperación de células BxPC3 (aproximadamente 90%) con dos versiones de los kits modificados (Figuras 3a y 3b).

[0046] Las cuatro configuraciones de kit se evaluaron con muestras de sangre de donantes sanos normales y pacientes con cáncer de páncreas metaestático. Los resultados de esta evaluación se muestran en las Tablas 1 y 2. Los datos preliminares muestran que la tasa de recuperación de CTC fue mayor en las muestras clínicas utilizando todas las versiones de los kits modificados en comparación con el Kit de Células Epiteliales 1 estándar (Tabla 1). Ningún CTC se detectó a partir de muestras de donantes sanos normales usando los kits modificados (Tabla 2).

Tabla 1:

Muestra ID	CTC			
	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
S-2	0	3	2	0
S-3	1	1	1	2
S-4	0	1	1	0
S-5	0	0	0	2
S-6	2	5	2	1
S-7	0	0	0	0
S-8	0	1	1	1
S-9	2	8	15	6

Tabla 2:

Muestra ID	CTC			
	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 4
476	0	0	0	0
481	0	1	0	0
482	0	0	0	0
483	0	0	0	0
490	0	0	0	0
492	1	0	0	0

[0047] Ejemplos de diferentes tipos de cáncer que pueden ser detectados utilizando los métodos y kits de la presente invención incluyen apudoma, coristoma, branchioma, síndrome carcinoide maligno, enfermedad cardíaca carcinoide, carcinoma, por ejemplo, Walker, células basales, basoescamoso, Brown-Pearce, ductal, tumor Ehrlich, in situ, Krebs 2, células de merkel, mucinoso, pulmón de células no pequeñas, células de avena, reticuloendoteliosis papilar, escurrosa, bronquiolar, broncogénica, de células escamosas y de células de transición, melanoma, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma,

lipoma, liposarcoma, mesotelioma, mixoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, cordoma, mesenquimoma, mesonefoma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, tumor trofoblástico, adenocarcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistadenocarcinoma, cistoadenoma, tumor de células de granulosa, ginandroblastoma, 5 hepatoma, hidradenoma, tumor de células de los islotes, tumor celular de leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumor de células tecales, leiomioma, leiomiosarcoma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, rabdomioma, rabdomyosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma, paraganglioma no cromafina, antioqueratoma, angioma esclerosante, angiomatosis, glomangioma, hemangioendotelioma, hemangioma, 10 hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, limfangiomioma, linfangiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, condrosarcoma, filoides de cistosarcoma, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomiosarcoma, leucosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, miosarcoma, mixosarcoma, carcinoma de ovario, rabdomyosarcoma, sarcoma (de Kaposi, y de mastocitos), neoplasias (por ejemplo, de hueso, sistema digestivo, colorrectal, hígado, páncreas, hipófisis, testicular, orbital, de cabeza y de cuello, sistema nervioso central, acústico, pélvico, de tracto respiratorio y urogenital), neurofibromatosis y displasia cervical.

[0048] La presente invención no se limita a la detección solamente de células epiteliales circulantes. Las células endoteliales se han observado en la sangre de pacientes que tienen un infarto de miocardio. Las células endoteliales, células de músculo cardíaco, y las células infectadas por virus, como las células epiteliales, tienen 20 determinantes específicos de tipo celular reconocidos por los anticuerpos monoclonales disponibles. En consecuencia, los métodos y los kits de la invención pueden adaptarse para detectar tales células endoteliales circulantes. Adicionalmente, se describe aquí un método que permite la detección de carga de la célula bacteriana en la sangre periférica de pacientes con enfermedades infecciosas, que también puede evaluarse utilizando las composiciones, procedimientos y kits descritos en este documento.

[0049] Varias citas de artículos de revistas, patentes de Estados Unidos y solicitudes de patentes de Estados Unidos se proporcionan anteriormente.

[0050] Aunque se han descrito algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención y han sido 30 específicamente ejemplificadas anteriormente, no se pretende que la invención esté limitada a dichas formas de realización.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un método para la detección y enumeración de células raras en una población de células mixtas de una muestra biológica obtenida de un paciente que comprende una población de células mixtas que se sospecha que contiene dichas células raras, la presencia de dichas células raras en dicha población es indicativa de un estado de enfermedad, que comprende:
- 10 (a) preparar una muestra inmunomagnética en la que dicha muestra biológica se mezcla con un ferrofluido poliespecífico conjugado con tres anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en anti-EpCAM, anti-EGFR1, anti-MUC1 y anti-Claudin4, en los que uno de los anticuerpos es anti-EpCAM;
- (b) poner en contacto dicha muestra inmunomagnética con al menos un reactivo poliespecífico que etiqueta dichas células raras, en las que el reactivo poliespecífico comprende anticuerpos contra citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19; y
- 15 (c) analizar dichas células raras marcadas para determinar la presencia y el número de las células raras en dicha muestra inmunomagnética, mayor será el número de células raras presentes en dicha muestra, mayor será la severidad de dicho estado de enfermedad.
- 20 **2.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que un paso intermedio entre la preparación de la muestra inmunomagnética y la puesta en contacto de dicha muestra inmunomagnética con al menos un reactivo poliespecífico, sometiéndose dicha muestra inmunomagnética a un campo magnético para producir una suspensión celular enriquecida por células raras como la muestra inmunomagnética.
- 25 **3.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que se reduce el volumen de dicha muestra inmunomagnética que contiene dichas células raras.
- 4.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que antes del análisis dicha muestra inmunomagnética se separa en una fracción marcada que contiene células raras y una fracción no marcada.
- 30 **5.** Un método como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicho ferrofluido poliespecífico es coloidal y la separación se efectúa sometiendo dicha muestra inmunomagnética a un gradiente de campo magnético.
- 6.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el ferrofluido poliespecífico comprende:
- 35 (a) anti-EpCAM, anti-EGFR1 y anti-Muc1;
(b) anti-EpCAM, anti-EGFR1 y anti-Claudin4;
o
(c) anti-EpCAM, anti-MUC1 y anti-Claudin4.
- 40 **7.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que las células raras son células cancerosas y la población de células mixtas se sospecha que contiene dichas células cancerosas, en el que cuanto mayor sea el número de células cancerosas presentes en dicha muestra, mayor será la severidad de dicho cáncer.
- 45 **8.** Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 7, en el que el ferrofluido poliespecífico es capaz de unirse específicamente a más de un tipo de célula.
- 9.** Un método como se reivindica en la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que
- 50 (a) dicho ferrofluido poliespecífico es coloidal y antes del análisis dicha muestra inmunomagnética se separa en una fracción marcada que contiene células del cáncer y una fracción no marcada; o
(b) dicho ferrofluido poliespecífico coloidal y dicho al menos un reactivo poliespecífico se mezclan secuencialmente con dicho espécimen biológico, y, como un paso intermedio, dicha muestra inmunomagnética se somete a un campo magnético para producir una suspensión celular de células de cáncer enriquecido como la muestra inmunomagnética.
- 55 **10.** Un método como se reivindica en la reivindicación 9(b) en el que antes del análisis, dicha muestra inmunomagnética se separa en una fracción marcada que contiene células del cáncer y una fracción no marcada.
- 60 **11.** Un método como se reivindica en la reivindicación 10, en el que dicha fracción marcada que contiene cáncer de células es analizada por un proceso seleccionado del grupo que consiste de citometría de flujo de parámetros múltiples, microscopio de inmunofluorescencia, citometría de escaneo láser, análisis de imagen de base de campo brillante, volumetría capilar, análisis de visualización espectral, análisis de células manual, y análisis de células automatizado.
- 65 **12.** Un kit para el examen de una muestra del paciente para la presencia de células tumorales circulantes, que comprende:

(a) nanopartículas magnéticas recubiertas que comprenden un material de núcleo magnético, un material de recubrimiento de base de proteínas, y tres anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en anti-EpCAM, anti-EGFR1, anti-MUC1 y anti-Claudin4, en el que uno de los anticuerpos es anti-EpCAM, acoplado directa o indirectamente, a dicho material de revestimiento de base;

5 (b) anticuerpos que se unen a citoqueratina 7, citoqueratina 8, citoqueratina 18 y citoqueratina 19; y
(c) tinte específico a células para excluir componentes de muestra distintos de dichas células tumorales de análisis.

10 **13.** Un kit como se reivindica en la reivindicación 12, en el que los tres anticuerpos en (a) son:

- (a) anti-EpCAM, anti-EGFR1 y anti-MUC1;
(b) anti-EpCAM, anti-EGFR1 y anti-Claudin4; o
(c) anti-EpCAM, anti-MUC1 y anti-Claudin4.

15 **14.** Un kit como se reivindica en la reivindicación 13, que contiene además un anticuerpo que tiene afinidad de unión para las células no tumorales, un tampón biológico, un tampón de permeabilización, un protocolo y, opcionalmente, una hoja de información.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1 (A)

Tinción de líneas de células tumorales pancreáticas con varias dianas de captura

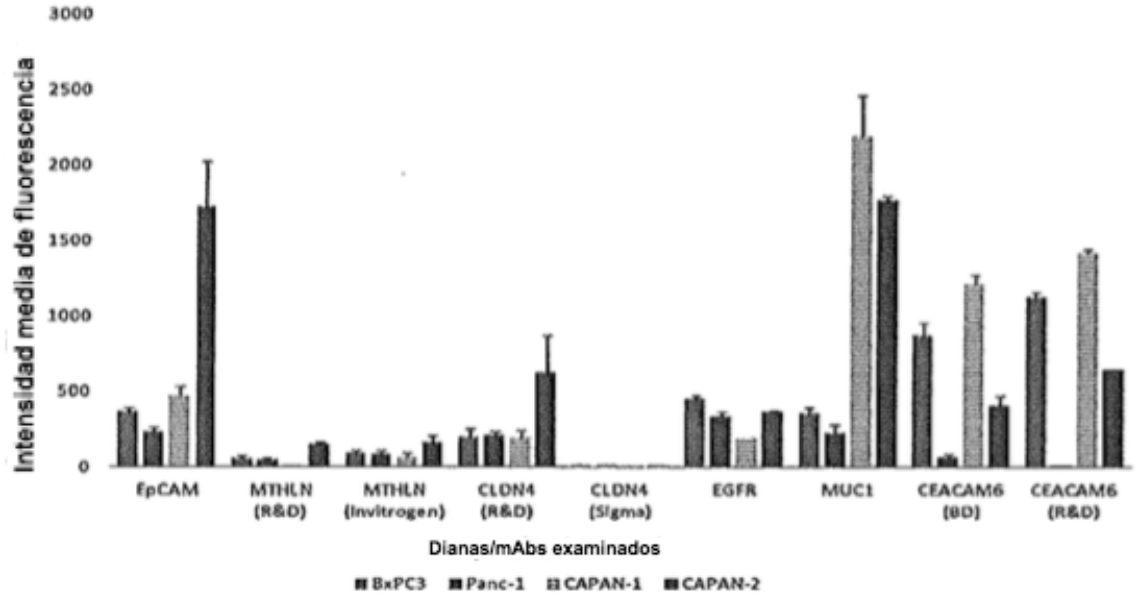


Figura 1 (B)

Porcentaje medio de células positivas con dianas de captura

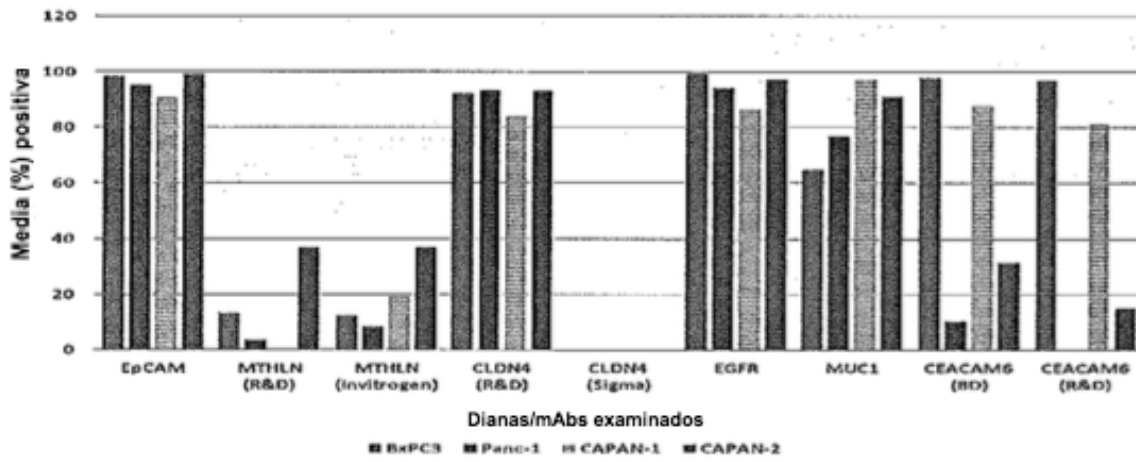


Figura 2 (A)

Tinción de líneas de células tumorales pancreáticas con varias dianas de detección

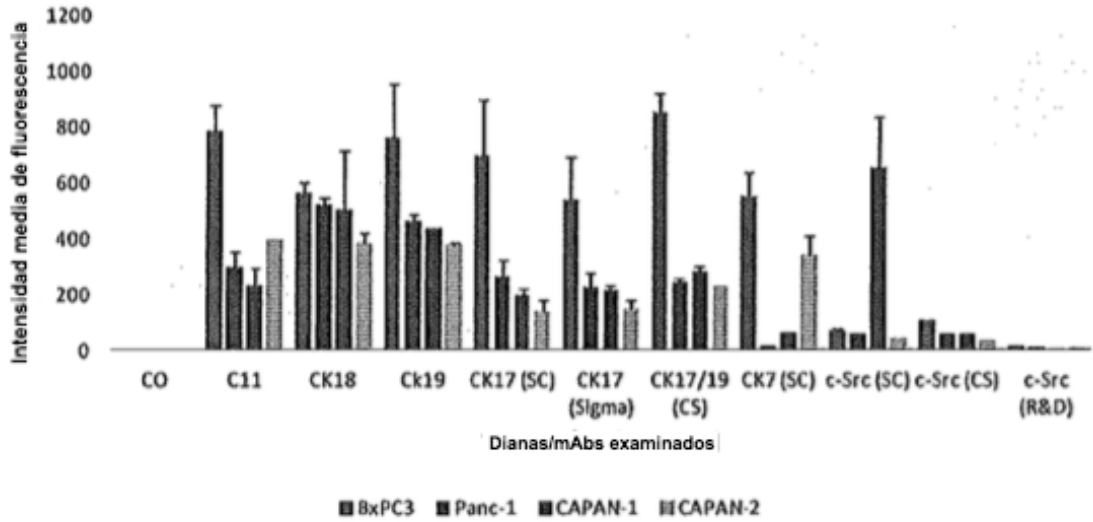


Figura 2 (B)

Porcentaje medio de células positivas con dianas de detección

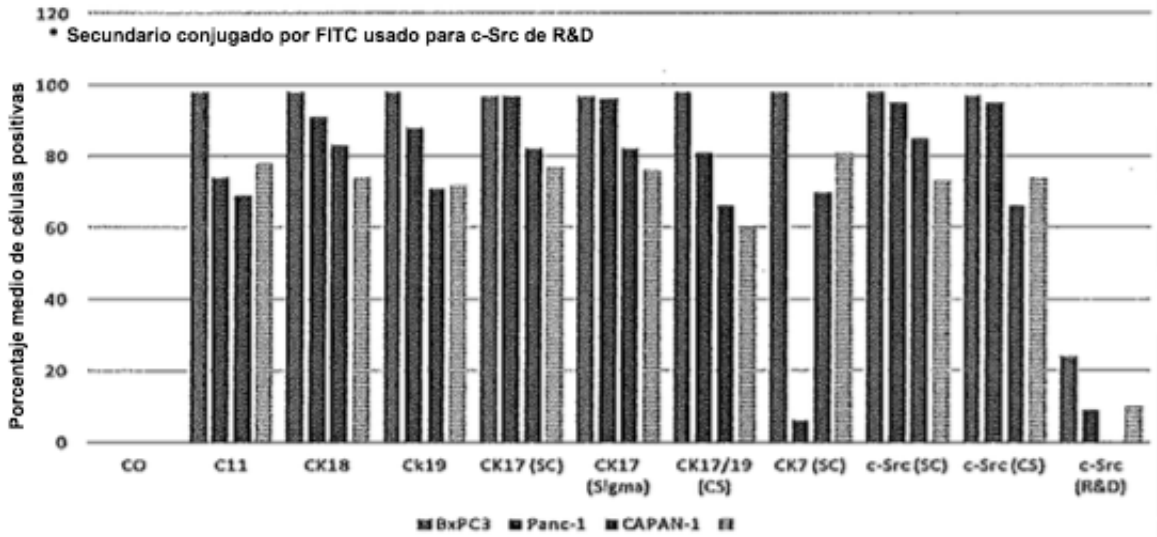


Figura 3 (A)

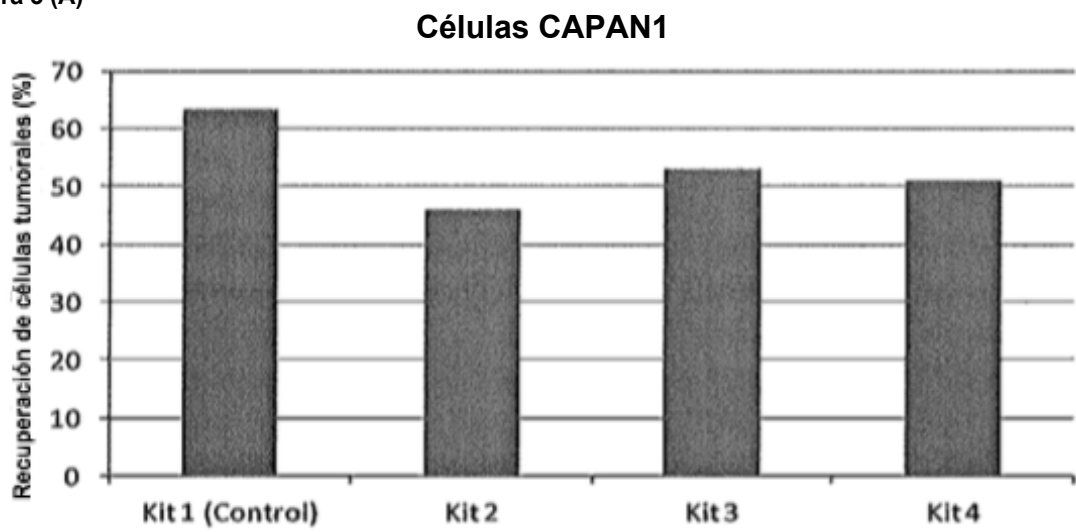


Figura 3 (B)

