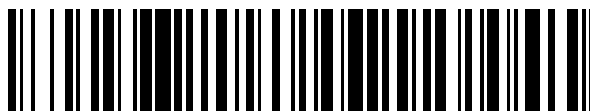


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 196**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2014** **PCT/CZ2014/000052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014** **WO14198242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2014** **E 14728812 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017** **EP 3008162**

54 Título: **Método para la separación de células esporádicas a partir de fluidos corporales, y aparato para realizar dicho método**

30 Prioridad:

14.06.2013 CZ 20130456

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

19.10.2017

73 Titular/es:

METACELL, S.R.O. (100.0%)
Erbenova 783/29
70300 Ostrava, CZ

72 Inventor/es:

BOBEK, VLADIMIR y
KOLOSTOVA, KATARINA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 638 196 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 separación de células esporádicas a partir de fluidos corporales, y aparato para realizar dicho método

Campo de la invención

- 5 La presente invención proporciona un método de separación amable de células esporádicas viables (células raras) de fluidos corporales tales como sangre, de efusiones malignas (ascitis, derrame pleural), líquido de lavado bronco alveolar, líquido de lavado peritoneal y líquido amniótico. Utilizando el presente método es posible aislar, por ejemplo, CTC, células tumorales circulantes y células tumorales diseminadas (DTCs, células tumorales diseminadas), células endometriales y células trofoblásticas circulantes (CFTC, trofoblasto fetal circulante),
10 permitiendo la posterior detección, cuantificación, caracterización y especialmente cultivo.

Antecedentes de la invención

- Las lesiones metastásicas son la causa más común de muerte en pacientes con carcinomas (Birchmeier, 1996). Durante las metástasis, las células tumorales se separan del tumor primario y entran en el torrente sanguíneo directamente o a través del sistema linfático, migrando a los órganos secundarios y desarrollando un depósito metastásico. La detección de CTC en pacientes con carcinoma metastásico se asocia con un peor pronóstico (Zharo 2011, Zhang 2012, Wang 2011). A pesar de su gran importancia clínica, todavía no se ha realizado una caracterización molecular de CTCs. Esto puede atribuirse a una frecuencia extremadamente baja de CTC en comparación con el número de células sanguíneas. Los CTCs son generados por el proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT), que se caracteriza por la reducción de la expresión de marcadores epiteliales y el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales. Estos cambios promueven una mayor motilidad, invasión y resistencia a la terapia (Thiery 2002 Shook 2003 Christofori 2006 Jechlinger 2003). CTCs/DTCs representan una población de células tumorales diseminadas a órganos distantes con potencial para la creación de focos micro-y macro-metastásicos. Algunas de las células tumorales de tumores primarios y/o CTCs y DTCs tienen propiedades de células madre (CSCs, células madre de cáncer). La población de células madre de cáncer tiene la capacidad de auto regeneración y es resistente al tratamiento, lo que significa un peor pronóstico.
15
20
25

CTCs/CSCs tienen un enorme potencial en el diagnóstico, la determinación del pronóstico, el seguimiento de la enfermedad efecto terapéutico y el riesgo (Mani 2008).

- La diseminación temprana del tumor a los ganglios linfáticos y la sangre se realiza mediante células tumorales circulantes (CTC) y células cancerosas diseminadas (DTCs). Los CTC se han descrito como que ocurren también en pacientes debido a la resección del tumor primario por la simple manipulando del tumor primario.
30

- La detección de CTC es, sin duda, un factor pronóstico en el cáncer. La detección de CTCs puede utilizarse potencialmente para diagnosticar o como una alternativa a las biopsias invasivas para la detección temprana de la diseminación metastásica del tumor y para establecer y controlar la efectividad de la terapia en pacientes individuales. La cantidad y las características de los CTC pueden ser un factor pronóstico para la supervivencia o el factor predictivo de una respuesta terapéutica. La caracterización a largo plazo de CTCs puede proporcionar una oportunidad para evaluar mejor la respuesta fisiológica dinámica. Además, los cambios en el número de CTC en comparación con los cambios supervisados previamente detectados por imágenes sugieren que el análisis de CTC puede ser más importante para la evaluación de la supervivencia que los métodos de imagen.
35

- En general, hay una evidencia válida de valor pronóstico adverso de CTC detectados en cáncer colorrectal metastásico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de mama. También hay estudios sobre la importancia de los CTC en la formación de tromboembolismo venoso. En pacientes con cáncer de mama metastásico y con CTC detectados ($n \geq 1$) en sangre periférica, se observó una incidencia de trombosis hasta cuatro veces mayor que la de pacientes sin CTC (Mego 2009). Los CTCs están posiblemente implicados en la activación de la coagulación a través de la expresión y liberación de factores tisulares (Davila 2008). Los CTC están presentes en la sangre en una cantidad muy pequeña de aproximadamente una célula por diez mil millones de células sanguíneas (Pantel 2001, Ziegelschmidt 2005).
40
45

- Las tecnologías actualmente disponibles utilizan diferentes métodos para la detección de CTC: una separación por gradiente de densidad, una separación inmuno-magnética, una separación inmuno-magnética de gradiente. Estos métodos son específicos para las células y más amables que los métodos de filtración a presión, pero al unirse el anticuerpo interactúa con los receptores y antígenos en la membrana celular y, por lo tanto, los CTC/DTCs auténticos y viables son difíciles de seleccionar.
50

La presencia de células esporádicas también puede ser detectada indirectamente por RT-PCR, pero este enfoque es a menudo limitado por una baja expresión de marcadores específicos de tumores y la no especificidad de los antígenos típicos de CTC y DTC (Andreopoulou 2012). Además, se ha demostrado un alto grado de discrepancia en

la expresión de antígenos de superficie entre tumores primarios y CTC/DTC, lo que sugiere una gran falta de fiabilidad en el uso de estos marcadores para la separación de CTCs/DTCs.

Dado que el tamaño de las células CTC esporádicas separadas en la mayoría de los tumores epiteliales es mucho mayor que el tamaño de las células sanguíneas, una de las maneras eficientes de la separación de CTCs se basa en el proceso de filtración a través de un filtro de membrana, en donde las células separadas permanecen en la membrana y otras células pasan a través de la membrana (Paterlini-Brechot et al., 2007, Vona 2000). El uso de un método de separación basado en tamaños de CTCs/DTCs permite la detección y separación de CTCs/DTC sin dependencia de antígenos de superficie y receptores, cuya expresión varía durante una enfermedad de cáncer.

Los métodos de filtración usados recientemente incluyen un proceso de filtración acelerado por presión o por vacío (Mikulova, 2011); el gradiente de filtración se crea así cambiando la presión. La desventaja común de los métodos de filtración es que hay una acumulación de un precipitado, y una precipitación en filtro de membrana, causando la obstrucción del filtro, lo que conduce a la captura de las células sanguíneas en el precipitado. En consecuencia, el precipitado y las células sanguíneas deterioran considerablemente la capacidad de evaluar la presencia de las células esporádicas en el filtro bajo el microscopio. Las células sanguíneas capturadas pueden eliminarse parcialmente por lavado, sin embargo, el precipitado permanece en el filtro. Por esta razón, se deben añadir agentes anticoagulantes adicionales en el aparato de filtrado (no sólo en el tubo durante el muestreo de sangre). Una desventaja fundamental, como con la mayoría de los otros métodos, es dañar la viabilidad de las células, por lo que las células no suelen dividirse más y su posterior cultivo es imposible.

Los documentos WO 2006/116327 A1 y US 2012/0178097 A1 describen filtros de membrana para la separación de células tumorales circulantes viables (CTC), que son filtros biocompatibles hechos de parileno o policarbonato de tamaño de poro de 5 a 40 micrómetros.

Los documentos US 2010/324449 A1 y US 5114350 A describen filtros que hacen contacto con un material absorbente.

Todos los métodos utilizados actualmente tienen también otras desventajas, por ejemplo, requieren análisis de grandes volúmenes de sangre, una gran proporción de trabajo de laboratorio, una evaluación demorada (el procesamiento de la muestra tarda varias horas), o costosos equipos y reactivos utilizados y/o los métodos carecen de confiabilidad, sensibilidad, eficiencia, especificidad y estandarización necesarios para los métodos de detección CTCs y DTCs.

Por lo tanto, sería deseable un método para separar células, especialmente células esporádicas de fluidos corporales, siendo reproducible dicho método, mostrando una buena evaluación de la presencia de células esporádicas en el filtro bajo un microscopio, que no es exigente en el tiempo de procesamiento, equipo y personal de operación, que es barato incluso en un número bajo de muestras ensayadas, y que no requiere reactivos caros con vencimiento limitado. En el proceso de separación no debe producirse ninguna interacción con receptores y antígenos. El proceso debe ser sutil a las células con el fin de analizar la selección de células viables y CTCs/DTC auténticos y utilizar dichas células en experimentos posteriores in vitro e in vivo, posiblemente.

Además, sería deseable un dispositivo fabricado fácilmente, para llevar a cabo el proceso de aislamiento de forma reproducible, siendo asequible para la mayoría de los laboratorios, adecuado para el manejo estéril de material potencialmente patológico. Dicho dispositivo debe proporcionar una posibilidad de detección y/o cuantificación y/o cultivo posterior de células separadas en un filtro de membrana, y puede estar disponible como una variante desechable o reutilizable.

Resumen de la invención

Se eliminaron las deficiencias de los métodos anteriores y se cumplieron los requisitos establecidos mediante un método de separación de células esporádicas de fluidos corporales de organismos humanos y animales de acuerdo con la presente invención utilizando un filtro de membrana colocado en un contacto íntimo con un material absorbente.

Se descubrió que, en contraste con la filtración de presión/vacío, durante la filtración utilizando la fuerza capilar (capilaridad) la coagulación de proteínas a partir de fluidos corporales tales como sangre o plasma sanguíneo se produce en un grado mínimo, por lo que no es necesario un anticoagulante adicional al anticoagulante (EDTA) añadido al tubo de toma de sangre para una recolección de sangre normal. Si ya existe un coágulo en el fluido corporal, la dilución por pequeñas cantidades de una solución reguladora tal como PBS es suficiente para prevenir la coagulación. En consecuencia, el filtro de membrana no está obstruido (particularmente al principio de la filtración, como ocurre normalmente en la filtración de presión/vacío), y la separación es más suave, más rápida y completa.

Una cantidad más baja del precipitado provoca una cantidad inferior de células sanguíneas tales como glóbulos rojos retenidos en dicho precipitado, en donde tanto el precipitado como tal y las células sanguíneas destruyen la detección de la presencia de las células esporádicas en el filtro. Obviamente, la evaluación correcta de la presencia

de células esporádicas es crucial; el tiempo de filtración se puede ajustar fácilmente mediante el área de filtración utilizada, es decir, el área del filtro de membrana y del material absorbente

Además, se encontró que las células esporádicas capturadas en la membrana permanecían mecánicamente y químicamente inalteradas y por lo tanto viables, lo que permite su posterior cultivo eficaz, lo que no es practicable por otros métodos, desde la perspectiva de los resultados actuales.

Además, se encontró que para la dilución del fluido corporal o para el aclarado de células esporádicas en el filtro respectivamente, el medio de cultivo tal como RPMI puede ser utilizado directamente para aumentar la tasa de éxito de la separación (y también del cultivo, si el objetivo es también cultivar las células esporádicas), mientras que la velocidad de separación en el filtro de membrana, así como la viabilidad celular se mantienen.

El fluido corporal filtrado libre de las células esporádicas pasa a través de los orificios del filtro de membrana, en donde se capturan los elementos mayores que los agujeros en el filtro de membrana (el tamaño típico de las células sanguíneas es inferior a 6 μm y el de las células esporádicas por encima de 10 μm).

Las células esporádicas separadas se alojan debido a su tamaño en el filtro de membrana, cuya membrana puede ser separada del material absorbente, teniendo la membrana todavía fijada en el soporte. En otra realización, la membrana puede ser posteriormente removida completamente del soporte.

El flujo de fluidos corporales, libres de células esporádicas, a través de la membrana se acelera continuamente en virtud de la fuerza capilar que aspira el líquido en el material absorbente. No hay sobrepresión antes del filtro y no hay subpresión (vacío) detrás del filtro aplicado al fluido corporal filtrado durante la filtración. El fluido es aspirado solamente por la fuerza capilar, sin la necesidad de ninguna regulación, a velocidad apropiada a través del filtro al material absorbente. (En este contexto, no se tiene en cuenta la presión hidrostática ejercida sobre el filtro por la altura de la columna de fluido corporal). La cantidad de la fuerza capilar provoca la filtración continua del fluido, sin ningún tipo de obstrucción antes o sobre el filtro de membrana, como se observa frecuentemente, por ejemplo, en métodos que utilizan vacío detrás del filtro o una sobrepresión antes del filtro.

La ventaja de la solución de acuerdo con la invención es una alta eficacia de captura de células esporádicas incluso de baja concentración y aceleración del proceso de separación, así también la velocidad de detección y el aumento de la eficiencia de cultivo. Cuando se utiliza el método de acuerdo con la invención, no se observa interacción de células esporádicas con receptores y antígenos, y por lo tanto es posible seleccionar CTCs/DTCs auténticos y viables, los cuales pueden usarse entonces en experimentos in vitro e in vivo. El método permite mantener las células filtradas en condiciones vitales muy buenas para un análisis posterior. No se necesita equipo de laboratorio especial. El método permite el procesamiento de volúmenes relativamente grandes de sangre u otros fluidos corporales (por ejemplo, 50 ml).

En consecuencia, la presente invención proporciona un método para la separación de células esporádicas presentes en el fluido corporal del paciente por su captura en un filtro de membrana que tiene aberturas menores que el diámetro de las células, en donde a partir de las células esporádicas presentes en dicho fluido corporal presentes en el primer lado del filtro de membrana, el fluido corporal libre de células esporádicas se extrae a través del filtro de membrana en virtud de la fuerza capilar en un material absorbente situado en un contacto íntimo con el segundo lado de dicho filtro de membrana.

Las células esporádicas presentes en el fluido corporal son, por ejemplo, células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas, células endometriales y células trofoblásticas fetales circulantes.

El fluido corporal es cualquier fluido obtenido directamente (por recolección) o indirectamente (con tratamientos posteriores de cualquier tipo) del cuerpo humano o animal. Se selecciona preferiblemente del grupo de sangre central o periférica, médula ósea, fluido ascítico, derrame pleural, líquido de lavado peritoneal y líquido amniótico.

El objeto de prueba puede ser preferiblemente un paciente con cáncer primario o enfermedad metastásica.

La muestra de ensayo también se puede recoger con éxito de un animal que ha sido aprobado como un modelo experimental metastásico.

En otra realización, la sangre periférica es sangre periférica anticoagulada, tal como sangre recogida en un tubo de recogida de sangre regular que comprende anticoagulante tal como EDTA.

Si el fluido corporal comprende precipitado antes de la separación, el fluido corporal filtrado se diluye preferiblemente con una solución reguladora apropiada, tal como PBS (solución salina fisiológica con solución reguladora fosfato) y/o TrypLE™ con el fin de disolver el precipitado y hacer la filtración/separación más fácil.

La invención, sin embargo, no excluye el uso de ningún método conocido para prevenir la formación de coágulos de sangre durante la recolección de sangre. Un ejemplo es una carga gradual y opcionalmente disolución enzimática (por ejemplo, usando TrypLE™, Invitrogen), sin embargo, preferiblemente la disolución no se usa.

5 Para mejorar la filtración en caso de presencia de precipitados de sangre, la sangre periférica puede diluirse adicionalmente mediante solución de PBS o por el medio de cultivo. Con el fin de eliminar los precipitados sanguíneos y otras impurezas gruesas, la sangre u otros fluidos corporales también pueden filtrarse a través de un tamiz con el tamaño de poro de, por ejemplo, 0.1 mm, que se lava luego varias veces con PBS. A continuación, se carga el volumen residual de sangre. Finalmente, el tubo colector de sangre se enjuaga con PBS, cuyo volumen se filtra a través del tamiz.

10 Las células esporádicas separadas pueden entonces enjuagarse sobre el filtro para una mejor evaluación del microscopio, por ejemplo, por la solución reguladora tal como PBS o por un medio tal como RPMI. En comparación con la filtración al vacío, el método según la invención proporciona beneficios sustanciales en todos los aspectos.

15 Las células separadas pueden analizarse posteriormente, por ejemplo, microscópicamente, preferiblemente después de tinción inmunohistoquímica u otra, cuantificadas (por ejemplo, microscópicamente, manualmente o automáticamente) o cultivadas o procesadas de otro modo. En otras realizaciones, se lleva a cabo una detección y/o cuantificación y/o cultivo de las células separadas después de la separación, directamente sobre el filtro de membrana o en un recipiente de cultivo.

Los filtros con células esporádicas pueden almacenarse durante más tiempo congelados, secados o fijados por métodos convencionales en uso para ser analizados posteriormente.

20 Como ya se ha indicado, especialmente en el caso en el que se planifica el posterior cultivo de células esporádicas, el fluido corporal puede ser diluido directamente por el medio de cultivo utilizado en el subsiguiente cultivo de células separadas antes de la separación, tal como medio RPMI, aumentando con ello el índice de éxito de la filtración y el subsiguiente cultivo.

25 El cultivo subsiguiente de células esporádicas se puede llevar a cabo de manera convencional en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂ en un plato de cultivo convencional o una botella de plástico o de vidrio al lavar las células del filtro. Para este propósito, por ejemplo, el filtro se enjuaga con 2 x 1 ml del medio RPMI, y el medio con células se transfiere a una placa de 24 concavidades, donde las células pueden cultivarse directamente sobre la superficie de la placa de plástico o sobre el cubreobjetos del microscopio insertado. Se prefiere el cultivo de cubreobjetos si se requiere inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de las células.

30 El cultivo se lleva a cabo preferiblemente insertando el filtro que contiene las células capturadas al medio de cultivo en un plato de cultivo, o vertiendo el medio de cultivo al filtro con las células capturadas, insertado en el plato de cultivo.

35 En otra realización preferida, el cultivo se lleva a cabo transfiriendo el filtro de membrana montado en el soporte descrito a continuación, inmediatamente después de la separación, por ejemplo, en una placa de cultivo de 6 concavidades con un medio de crecimiento añadido en cada concavidad. Las células se pueden cultivar entonces como un cultivo tisular estándar.

40 En una realización de la invención, un fluido corporal es el fluido corporal de pacientes con melanoma, cáncer de mama, cánceres del tracto gastrointestinal tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de páncreas y cáncer de hígado; tumores urogenitales y tumores de tejidos blandos tales como tumores de cabeza y cuello y otros tumores sólidos.

45 El método y el aparato de la presente invención pueden usarse, por ejemplo, para separar células tumorales circulantes (CTC) de sangre periférica o central, células tumorales del tracto gastrointestinal (esófago, estómago, intestino grueso y delgado, hígado, páncreas, vesícula biliar y vías biliares), tumores del sistema urogenital (ovario, endometrio, próstata, vejiga, testículos), tumores del sistema respiratorio (pulmón, mediastino, tracto respiratorio superior), tumores del sistema neuroendocrino, tumores óseos, tumores de cabeza y cuello, tumores de mama, tumores metastásicos sin localización primaria y otros tumores sólidos menos frecuentes.

50 El método y aparato de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar para enfermedades hematopoyéticas seleccionadas, tumores neuroendocrinos, diseminación de células tumorales de ascitis, de derrame pleural, de esputo, de lavados (lavados bronco-alveolares, lavados de peritoneo y cavidad torácica, lavados de retroperitoneal, etc.), para las células endometriales circulantes y diseminadas (de sangre y de lavados).

Una utilización importante también se aplica a la separación de células trofoblásticas fetales circulantes (CFTCs) de la sangre, o líquido amniocéntrico, porque los CFTC están presentes en la sangre materna periférica desde la quinta semana de gestación y no permanecen en la circulación sanguínea después del final del embarazo (Bianchi et al., 1996). CFTC son por lo tanto fuente muy atractiva de ADN/ARN para el examen mediante un diagnóstico no

invasivo prenatal (PNDNI). Al comparar las pruebas basadas en la CFTC y la coriocentesis, se ha confirmado la sensibilidad diagnóstica y la especificidad del 100% para la prueba con base en CFTC. La característica básica por la cual las células CFTC difieren de las células sanguíneas es su tamaño (las células CFTC alcanzan un tamaño estándar de 10 μm y más). Informes actuales indican que una mujer embarazada tiene un 99% de probabilidad de que cada célula del tamaño más de 15 μm de tamaño, la célula es de origen embrionario, por lo tanto, CFTC (Mouawia, 2012). Debido a la nueva metodología, ahora es posible separar de forma reproducible CFTC no dañado y utilizarlos para un análisis posterior.

La detección de CTCs y DTCs puede llevarse a cabo en modelos de tumor animal, y CTCs/DTCs pueden ser detectados en individuos con más de un tipo de tumor.

Después de la separación, las células pueden ser procesadas tanto por métodos de inmunohistoquímica como por métodos de una sola célula para la expresión génica.

La invención proporciona además un aparato para llevar a cabo la separación de una mezcla de células esporádicas presentes en el fluido corporal de un paciente mediante los métodos descritos anteriormente, comprendiendo dicho aparato un filtro de membrana colocado en un contacto íntimo con un material absorbente.

La geometría de la membrana implica generalmente el tamaño, la forma y la densidad de los poros de la membrana. La eficacia del filtro de membrana se puede optimizar de este modo ajustando el tamaño, la forma y la densidad de los poros de la membrana. Se selecciona una construcción de la membrana que prefiere la captura del tumor y células esporádicas sobre las células sanguíneas. El filtro de membrana es preferiblemente una membrana que capta células esporádicas de dimensiones superiores a 10 μm y transmite elementos de sangre del tamaño de hasta 6 μm , es decir, teniendo la membrana el tamaño de poro de 7-10 μm , por ejemplo 8 μm o un valor similar, por ejemplo, dentro del intervalo de $\pm 1 \mu\text{m}$ declarado por el fabricante. El filtro de membrana está hecho preferiblemente de un material biocompatible tal como policarbonato, que ofrece las ventajas de flexibilidad y biocompatibilidad.

Minimizar los efectos de la coagulación y aumentar la velocidad de filtración puede lograrse adicionalmente usando un filtro más grande con la mayor superficie filtrante disponible. Se pueden utilizar, por ejemplo, membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μm con un diámetro de membrana de 25 mm.

El término "contacto íntimo" se refiere a un contacto tan estrecho del filtro de membrana y del material absorbente que no afecta la acción capilar a través de la membrana en el material absorbente, es decir, un acceso de aire a la interfase entre la membrana y el material absorbente, que está en contacto directo con el líquido filtrado sólo a través de los poros de la membrana, se evita durante la operación. Esto puede lograrse, por ejemplo, empujando los bordes de la membrana, o la membrana sujeta en un aparato adecuado, a la superficie del material absorbente, o empujando los bordes de la membrana montados en un soporte adecuado bajo ligera presión en la superficie flexible del material absorbente.

El material absorbente tiene una capacidad de absorción suficiente y es capaz de absorber suavemente todos los elementos sanguíneos y otros elementos que están presentes en el fluido corporal de viscosidad variable y el absorbente consiste principalmente en pulpa, papel fino, fibras textiles o combinaciones de los mismos en particular.

El volumen del fluido corporal filtrado está limitado por la capacidad de succión del material absorbente y por su volumen. Por lo tanto, el tamaño y/o el volumen del aparato y las características del material absorbente pueden adaptarse al uso pretendido. Ventajosamente, usando un único aparato se puede filtrar un volumen de 50 ml y más. El método y el aparato funcionan incluso desde un volumen mínimo de sangre, tal como menos de 1 ml, sin embargo, con un volumen creciente de fluido corporal filtrado, aumenta la probabilidad de capturar las células esporádicas.

El aparato de acuerdo con la invención preferiblemente comprende además un recipiente hueco abierto superior e inferior para recibir una mezcla de células esporádicas presentes en el fluido corporal, en donde la periferia inferior del recipiente está en contacto estrecho con al menos una parte del primer lado superior de la membrana y en donde al menos una parte del segundo lado inferior de la membrana está en contacto íntimo con el material absorbente de manera que la membrana separa el espacio interior del recipiente de dicho material absorbente. El borde superior del recipiente puede ampliarse preferiblemente para obtener un embudo y/o dicho borde puede estar provisto de un tamiz para eliminar los coágulos ya presentes en la sangre, etc.

Por la razón anterior, Para conseguir el área de filtración máxima al menos parte del primer lado de la membrana y al menos parte del segundo lado de la membrana se colocan uno contra el otro sobre la zona más grande que maximiza el área de contacto entre el material absorbente y las células esporádicas presentes en el fluido corporal, separados por una membrana.

En otra realización, el material absorbente está dispuesto en un recipiente colector de base provisto de una tapa superior, en el que la tapa desde arriba de un soporte de membrana circunferencial se acopla de forma liberable, y

en donde dicho soporte, por medio de un anillo de presión, sujeta de forma liberable la membrana a lo largo de su circunferencia y en donde al depósito por encima del soporte se puede fijar firmemente a lo largo de la circunferencia de dicho soporte. El aparato está diseñado preferiblemente para un único uso, pero no se excluye ni una realización del aparato para reutilizar todos los elementos excepto la membrana y el material absorbente.

5 Descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra una realización de un aparato de filtro en dos vistas

La figura 2 muestra una realización de un aparato de filtro en una vista expandida (el material absorbente no se muestra)

La figura 3 ilustra una realización de fijación de la membrana en el soporte

10 La figura 4 muestra un cultivo celular in vitro de CTCs separados de sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata, CTCs crecidos en un filtro de membrana

La figura 5 muestra el cultivo in vitro de CTCs en el filtro de membrana, el método de tinción de May-Grünwald se ha utilizado para análisis hematológicos

15 La figura 6 ilustra el procesamiento de las células separadas por inmunohistoquímica (CTCs aislados de sangre de un paciente con cáncer de próstata metastásico teñido por anticuerpo contra la pan-citoqueratina)

La figura 7 muestra un par de CTCs separados que, en el curso del cultivo, penetraron el filtro en el fondo de las concavidades de cultivo (se usó el método de tinción de May-Grünwald para el análisis).

EJEMPLOS

Abreviaturas:

20 CTCs células tumorales circulantes

DTCs células tumorales diseminadas

CFTC células trofoblásticas fetales circulantes

NI-PND diagnóstico no invasivo prenatal

PBS solución reguladora de fosfato con NaCl 0.15 M, solución salina esencialmente regulada

25 FBS suero bovino fetal

EDTA la quelación 2, ácido etilendiaminotetraacético

Ejemplo 1

Determinación de células tumorales circulantes en cáncer de próstata de la sangre periférica de pacientes sometidos a extirpación quirúrgica del tumor primario

30 5-10 ml de sangre periférica se recoge durante la cirugía en un tubo colector con EDTA (por ejemplo, Vacuette K3E (REF 456 036), S-monovette K3E (REF 02.1066.001). La sangre se procesa inmediatamente o se almacena a 4°C durante un máximo de 24 horas.

35 La sangre periférica se aplica gradualmente por la pipeta al recipiente 3 del aparato para realizar la filtración. La sangre presente en el primer lado de la membrana 1 se filtra a través del filtro de membrana 1 del diámetro de 25 mm constituida por una membrana de policarbonato (PCTE) con un tamaño de poro de 8 micras (GE, policarbonato, 8.0 micras, 25 mm), en donde el filtro de membrana 1 está en contacto íntimo con el material absorbente 2, la pulpa (Pur-Zellin Hartmann). El proceso de filtración dura aproximadamente 5 min, dependiendo del volumen de la sangre filtrada y de la viscosidad de la sangre.

Además, es posible proceder de varias maneras:

40 Después de la filtración, el filtro de membrana 1, fijado en un soporte 6 y que comprende CTCs aislados, se transfiere a una concavidad de una placa de cultivo de 6 concavidades en la que el medio de crecimiento RPMI (4 ml), RPMI (Sigma R8758), enriquecido con FBS (F2442, Sigma) y antibióticos (penicilina-estreptomicina (P4458,

Sigma), anfotericina (A2942), Sigma). Las células capturadas se cultivan entonces como cultivo de tejido normal durante al menos 14 días a 37°C, 5% de CO₂, con un intercambio de medio cada 3 días.

El cultivo celular en crecimiento se tiñó de acuerdo con el protocolo estándar de tinción inmunohistoquímica de May-Grünwald y una fotografía de microscopio de luz invertida se muestra en la figura 4.

5 La figura 5 muestra una disposición similar de una variación de la tinción por inmunofluorescencia de CTC en cáncer de próstata (pan-citoqueratina-FITC, Sigma), cubierta con Prolong Gold™ con DAPI).

2. Después de la filtración, el filtro de membrana 1 que contiene CTCs aislados se enjuaga con 1 ml de medio y dicho medio con las células lavadas del filtro se transfiere a continuación a una placa de 24 concavidades donde se superpone sobre una lámina de microscopio colocada en el fondo de la concavidad (Assistent, N.1001, 12 mm de diámetro). Las células crecen directamente sobre el portaobjetos del microscopio, lo que facilita la manipulación durante la tinción inmunohistoquímica y el posterior análisis inmunohistoquímico, al menos 14 días a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%, con cambio medio cada 3 días.

3. Después de la filtración, el filtro de membrana 1 que contiene CTCs aislados se enjuaga con 1 ml del medio, el medio con las células de la membrana se transfiere a continuación por pipeta en cámaras de cultivo (Nunc® Lab-Tek® ChamberSlide™ (4 cámaras) para la microscopía confocal (el sistema de captura de video en tiempo real Time-lapse imaging, Leica) y luego se cultivó como cultivo de tejidos normales al menos 14 días a 37°C, 5% de atmósfera de CO₂, con cambio medio cada 3 días.

En todos los ejemplos mencionados anteriormente, el cultivo de las células esporádicas en la membrana y las células esporádicas lavadas de la membrana se llevó a cabo sin ningún problema. Del mismo modo, el cultivo de células de otros tipos de tumores aislados por el método de la presente invención se llevó a cabo sin ningún problema. Por el contrario, el cultivo exitoso de células esporádicas, separadas de fluidos corporales de pacientes por métodos conocidos en la técnica, tanto en una membrana como sin la membrana, no se ha evidenciado todavía.

4. Después de la filtración y el enjuague de las células esporádicas capturadas en el filtro por los 2 ml de RPMI, el filtro de membrana 1 montada en un soporte que contiene CTCs aislados se tiñe directamente mediante el protocolo de tinción estándar de May-Grünwald y se evalúa la presencia de células esporádicas bajo el microscopio.

Ejemplo 2

Determinación de células tumorales diseminadas en el cáncer de ovario metastásico del derrame pleural

Las células tumorales diseminadas del derrame pleural extraídas de un paciente con cáncer de ovario metastásico se separaron de la siguiente manera: la efusión se aplicó mediante una pipeta al recipiente 3 del aparato de filtración. La efusión en el primer lado de la membrana 1 se filtra a través del filtro de membrana 1 de 25 mm de diámetro hecha de una membrana de policarbonato (PCTE) con un tamaño de poro de 8 µm como en el ejemplo 1, en donde el material absorbente 2, pulpa (Pur-Zellin, Hartmann) es inmediatamente adyacente al filtro de membrana 1. Las células se fijaron al filtro y se analizaron como manchas hematológicas de sangre, se tiñeron mediante el protocolo de tinción estándar de May-Grünwald y se evaluaron bajo el microscopio.

Ejemplo 3

Aparatos para la filtración

Una realización del aparato para realizar la filtración mostrada en las figuras 1-3 comprende un filtro de membrana 1 de policarbonato, con un tamaño de poro de 8 µm, cuyo material 2 absorbente consiste en pulpa que está en contacto íntimo, desde el lado inferior de dicha membrana. El aparato incluye además un recipiente 3 hueco de arriba y abajo para recibir una mezcla de células esporádicas presentes en el fluido corporal. Para un vertido más fácil de líquidos, el borde superior del recipiente 3 se ensancha para formar un embudo. La periferia inferior del recipiente 3 está en contacto estrecho con el primer lado superior de la membrana 1 y el segundo lado inferior de la membrana 1 está en contacto íntimo con el material 2 absorbente, de manera que la membrana 1 separa el espacio interior del recipiente 3 de dicho material 2 absorbente.

El material 2 absorbente está dispuesto en un recipiente 4 colector de base provisto de una tapa 5 superior, en cuya tapa un soporte 6 de membrana circunferencial se acopla de forma liberable desde arriba. El soporte 6 es móvil verticalmente con respecto a la tapa 5 y por lo tanto también al material 2 absorbente, que permite el contacto íntimo del filtro de membrana 1 con el material 2 absorbente, o el empuje del anillo de presión 7 en el material 2 absorbente respectivamente para un contacto perfecto de la membrana 1 y del material 2 absorbente. El soporte 6 sujeta la membrana 1 a lo largo de su circunferencia por medio del anillo 7 de presión, de manera que pueda soltarse de forma liberable utilizando una rosca, de modo que el conjunto del soporte 6, el filtro de membrana 1 y el anillo 7 de presión pueden ser retirados del aparato en su conjunto y las células capturadas pueden teñirse o cultivarse

directamente sobre la membrana 1. El recipiente 3 está unido de manera liberable mediante una conexión de bayoneta al soporte 6 a lo largo de su circunferencia.

Ejemplo 4

Comparación de dos tipos de tecnología de filtro en relación con la presencia de un precipitado

- 5 El objetivo del experimento fue comparar la filtración de células sanguíneas que contienen células esporádicas aceleradas por vacío con la filtración usando fuerzas de capilaridad de acuerdo con la invención en relación con una evaluación de la presencia de células esporádicas recogidas en el filtro de membrana, que depende principalmente de la presencia de un precipitado y de elementos residuales de células sanguíneas en el filtro de membrana.
- 10 Ambos procedimientos utilizan una membrana con un tamaño de poro declarado de 7-8 μm y un material absorbente como en el ejemplo 1. Con el fin de conseguir unos tiempos de filtración aproximadamente iguales se utilizaron filtros de diferentes tamaños - se usó el filtro con un diámetro de 7 mm para la filtración al vacío y el filtro de diámetro de 25 mm para una filtración usando fuerzas capilares.
- 15 El mismo volumen de 2 ml de sangre obtenido como en el ejemplo 1 de un paciente con cáncer de próstata se filtró a través de los dos sistemas de membrana a temperatura ambiente, con los tiempos 87 s de filtración para la filtración usando el sistema de vacío y 97 s para la filtración usando fuerzas capilares de acuerdo con la invención.
- En el caso de la filtración al vacío se ha observado una frecuencia de precipitación sanguínea en los filtros, lo que hizo imposible evaluar la presencia de células esporádicas en el filtro durante la microscopía. Cuando se utiliza el método de filtración por fuerzas capilares de acuerdo con la invención, no hay precipitado presente en el filtro.

Ejemplo 5

- 20 Comparación de dos tipos de tecnología de filtro desde el punto de vista del enjuague
- Se usó la misma configuración que en el ejemplo 4, excepto que la muestra de sangre se tomó de un paciente con cáncer de mama. Debido a que frecuentemente se encontró formación de coágulos durante la filtración a vacío en este tipo de muestras, lo que condujo a una evaluación difícil debido principalmente a los glóbulos rojos atrapados en el precipitado, los filtros se lavaron con 2 ml adicionales de medio de crecimiento (RPMI) después de la filtración de sangre.
- 25 Como era de esperar, el precipitado permaneció en el filtro después de la filtración a vacío, pero el enjuague ayudó a eliminar el residuo de glóbulos rojos, y por lo tanto la evaluación global de la presencia de células esporádicas en el filtro después del enjuague con RPMI es mejor que en el caso sin enjuagar. La filtración total y el tiempo de aclarado del filtro con un medio RPMI fue de 4 min 37 s.
- 30 Después de utilizar las fuerzas capilares para la filtración, el filtro mostró una mejor evaluación incluso sin aclarado que el filtro después del uso del vacío. La evaluación de la presencia de células esporádicas en el filtro después del enjuague con RPMI mejoró adicionalmente y fue mejor que la evaluación del filtro enjuagado usando vacío. El tiempo total de filtración y enjuague para el filtro con medio RPMI fue de sólo 39 s en este caso.
- 35 En consecuencia, se confirmó la ventaja del uso de fuerzas capilares para la separación por filtración de células esporádicas, tanto en vista de la aparición de coágulos, como también en vista de la evaluación de la presencia de células esporádicas. Además, se observó una reducción en el tiempo de filtración en la etapa de enjuague con medio RPMI.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un método para la separación de células esporádicas, presente en el fluido corporal de un paciente, capturándolas en un filtro de membrana que tiene aberturas menores que el diámetro de las células, en el que a partir de las células esporádicas presentes en dicho fluido corporal presentes en el primer lado del filtro de membrana, el fluido corporal libre de células esporádicas se extrae a través del filtro de membrana en virtud de la fuerza capilar en un material absorbente situado en contacto íntimo con el segundo lado de dicho filtro de membrana para obtener dichas células esporádicas capturadas sobre la membrana que permanecen mecánicamente y químicamente sin cambios y por lo tanto viables, lo que permite su posterior cultivo eficaz.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque las células esporádicas presentes en el fluido corporal son células tumorales circulantes, células tumorales diseminadas, células endometriales y células trofoblásticas fetales circulantes.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el fluido corporal se selecciona de sangre periférica o central, médula ósea, fluido ascítico, derrame pleural, líquido de lavado peritoneal, lavado bronco alveolar y líquido amniótico.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque dicho fluido corporal es un fluido corporal de pacientes con melanoma, cáncer de mama, tumores del tracto gastrointestinal tales como carcinoma gástrico, carcinoma de colon, carcinoma de páncreas y carcinoma de hígado; tumores urogenitales y tumores de tejidos blandos tales como tumores de cabeza y cuello y otros tumores sólidos.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque la sangre periférica se recoge como sangre periférica anticoagulada.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque antes de la separación el precipitado que contiene el fluido corporal se diluye con una solución reguladora, particularmente con PBS, con el fin de disolver el precipitado.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque después de la separación, se lleva a cabo la detección y/o cuantificación y/o cultivo de las células separadas en el filtro de membrana o las células expulsadas del filtro de membrana en un recipiente de cultivo.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque antes de la separación el fluido corporal se diluye con un medio de cultivo, RPMI en particular, para aumentar el éxito del cultivo subsiguiente.
9. Un aparato para la separación de células esporádicas, presentes en el fluido corporal de un paciente, capturándolas en un filtro de membrana que tiene aberturas menores que el diámetro de las células, en el que a partir de las células esporádicas presentes en dicho fluido corporal presentes en el primer lado del filtro de membrana, el fluido corporal libre de células esporádicas se extrae a través del filtro de membrana en virtud de la fuerza capilar en un material absorbente situado en un contacto íntimo con el segundo lado de dicho filtro de membrana, para obtener dichas células esporádicas capturadas sobre la membrana permaneciendo mecánicamente y químicamente inalteradas y por lo tanto viables, lo que permite su posterior cultivo eficaz., caracterizado porque dicho aparato comprende un recipiente (3) hueco abierto superior e inferior para recibir una mezcla de células esporádicas presentes en el fluido corporal, en donde la periferia inferior del recipiente (3) está en contacto estrecho con al menos una parte del primer lado superior de la membrana (1), teniendo dicha membrana el tamaño de poro de 7-10 μm y estando hecha de un material biocompatible, y en donde al menos una parte del segundo lado inferior de la membrana (1) está en contacto íntimo con el material (2) absorbente de manera que la membrana (1) separa el espacio interior del recipiente (3) de dicho material (2) absorbente.
10. El aparato de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el material (2) absorbente está dispuesto en un recipiente (4) colector de base provisto de una tapa (5) superior, en cuya tapa un soporte (6) de membrana circunferencial se acopla de forma liberable desde arriba, y en donde dicho soporte (6), por medio de un anillo (7) de presión, retiene de forma liberable la membrana (1) a lo largo de su circunferencia y en donde el depósito (3) desde arriba del soporte (6) se puede fijar herméticamente a lo largo de la circunferencia de dicho soporte (6).
11. Aparato según la reivindicación 9 o 10, caracterizado porque el filtro de membrana (1) tiene un tamaño de poro de 8 μm .
12. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, caracterizado porque el filtro de membrana (1) está hecho de policarbonato.
13. El aparato de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, caracterizado porque el material absorbente (2) está constituido por celulosa, papel fino, fibras textiles o una combinación de las mismas.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque para llevar a cabo la detección y/o cuantificación y/o cultivo, las células separadas son transferidas sobre el filtro de membrana (1) fijada en un soporte (6) de la reivindicación 10.

Fig. 1

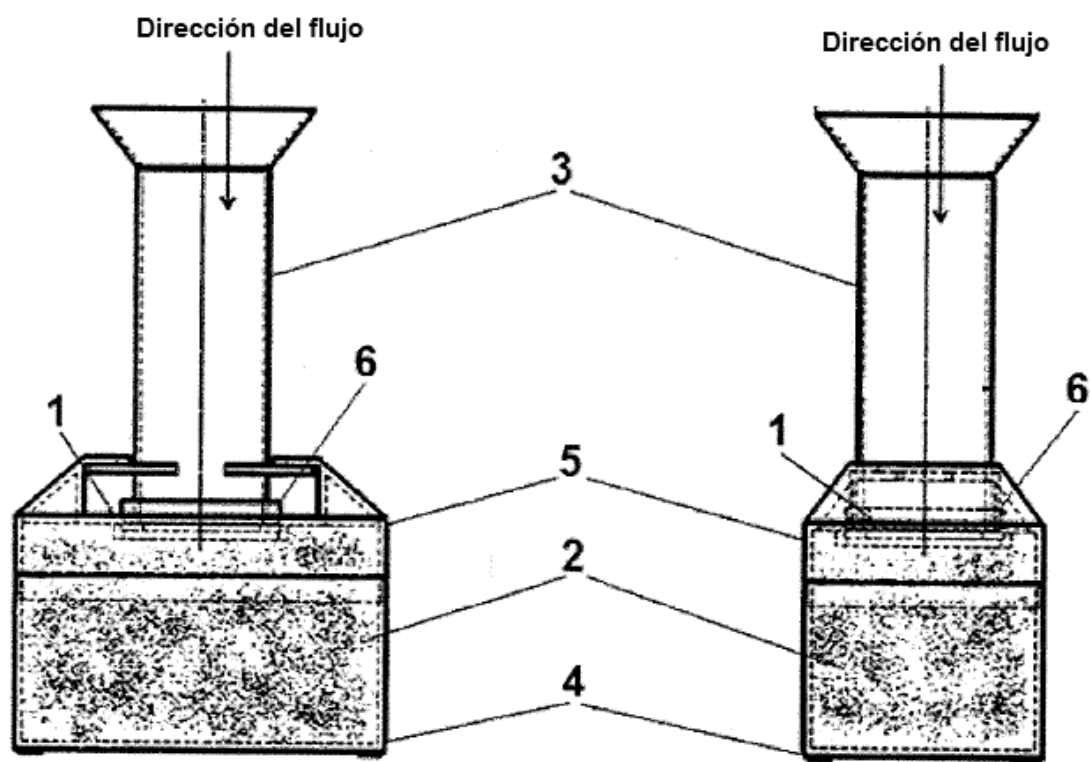


Fig. 2

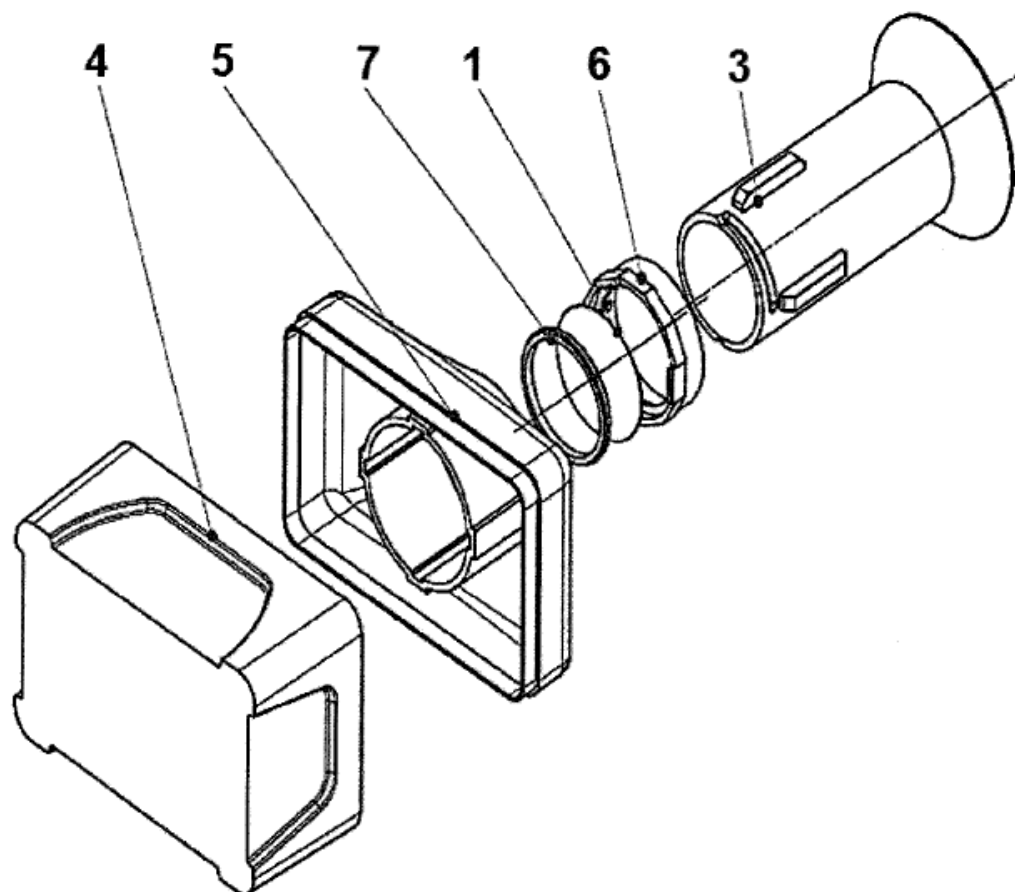


Fig. 3

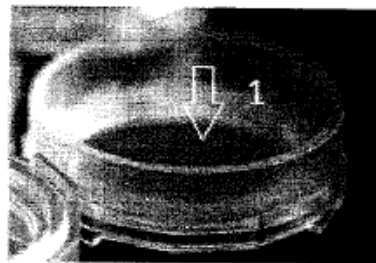
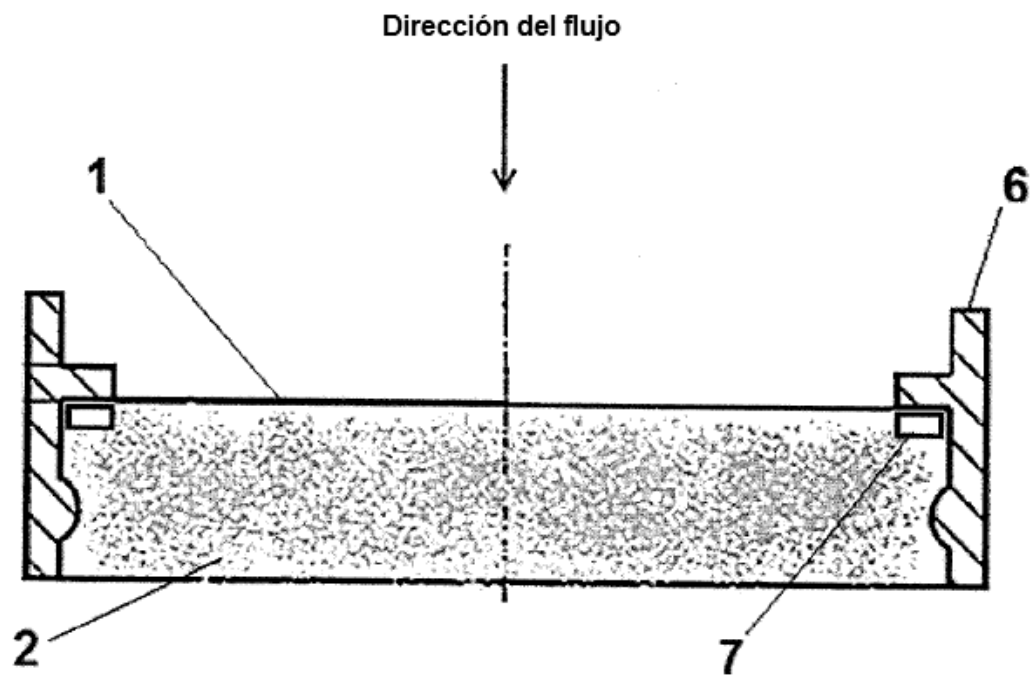


Fig. 4

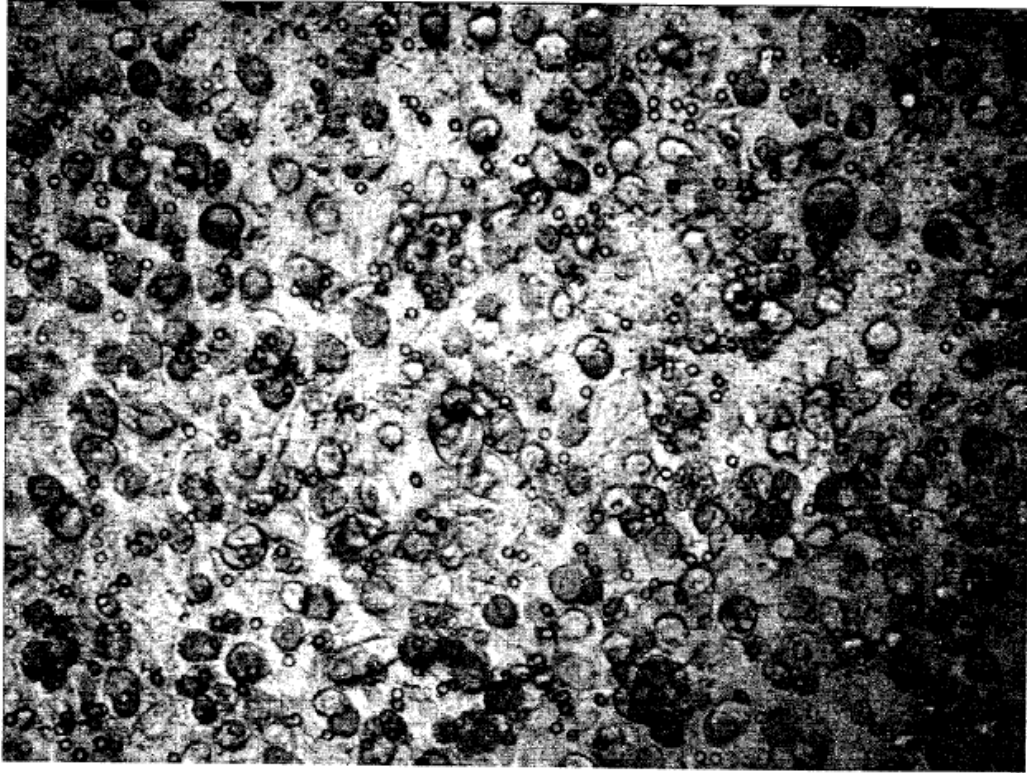


Fig. 5

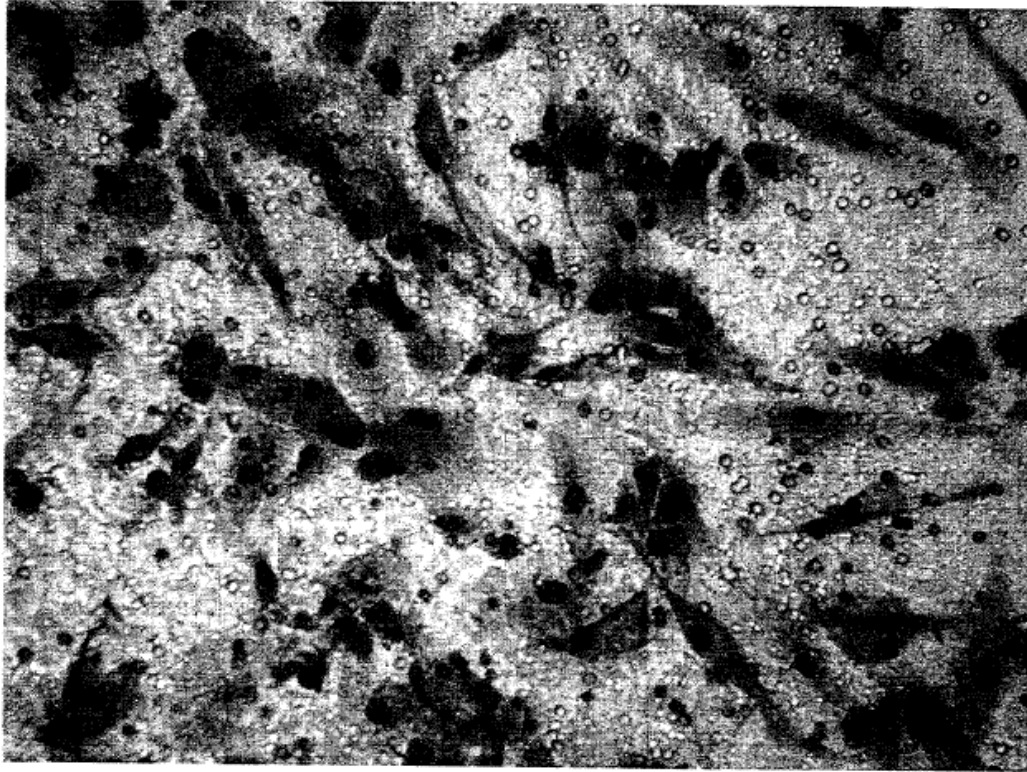


Fig. 6

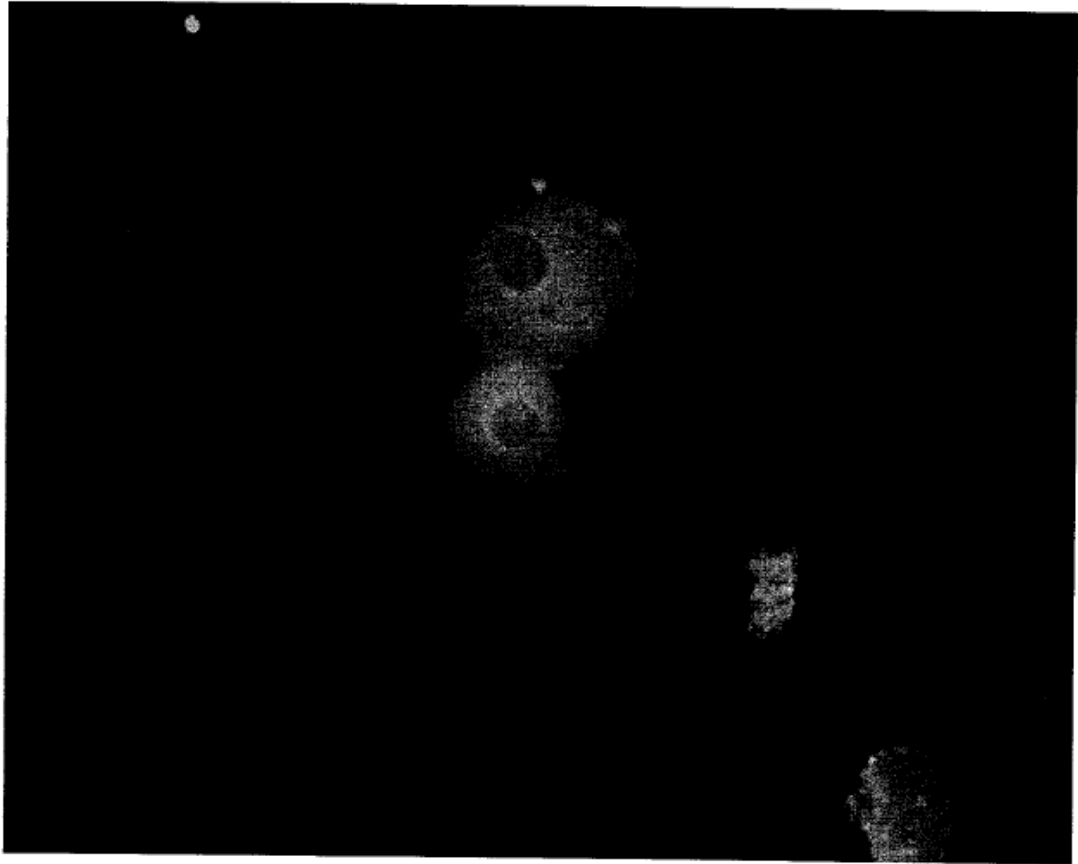


Fig. 7

