

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 689**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2015** E 15186743 (9)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019** EP 3128325

54 Título: **Método para determinar la concentración de células epiteliales en una muestra de sangre o una muestra de aspirado**

30 Prioridad:

**07.08.2015 EP 15180229**

**10.09.2015 EP 15184733**

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

**03.07.2019**

73 Titular/es:

**PACHMANN, ULRICH (50.0%)**

**Brandenburger Strasse 30**

**95448 Bayreuth, DE y**

**PACHMANN, KATHARINA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PACHMANN, ULRICH y**

**PACHMANN, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 718 689 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 determinar la concentración de células epiteliales en una muestra de sangre o una muestra de aspirado

5 La invención se refiere a un procedimiento para determinar una concentración de células epiteliales en una muestra de sangre mezclada con un anticoagulante o en una muestra de aspirado proveniente de un humano o mamífero. La muestra de aspirado puede ser una muestra de aspirado de médula ósea, aspirado pleural o aspirado peritoneal.

10 Un procedimiento de este tipo se conoce a partir de la documentación US 7.615.358 B2. En este caso, las células tumorales epiteliales contenidas en un fluido corporal se marcan mediante la adición de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, dirigiéndose los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra el antígeno epitelial humano reconocido por el anticuerpo monoclonal HEA 125. A continuación, la muestra se coloca en un soporte y se incubaba para permitir que las células tumorales se adhieran al soporte. La superficie del soporte se puede recubrir con un agente que ayude la unión celular no específico, como por ejemplo, poli-L-lisina. La adhesión de las células suele durar de 10 a 15 minutos. A continuación, se identifican las células vitales de las células tumorales epiteliales adherentes y se cuantifican de acuerdo con su morfología, y se calcula la concentración de células tumorales epiteliales vitales en el fluido corporal. La morfología de las células tumorales epiteliales adherentes se analiza mediante la citometría de barrido por láser, lo que permite detectar las células tumorales vivas mediante su tinción de superficie exclusiva, excluyendo las células muertas por su tinción intracelular.

20 La documentación WO 2014/047285 A1 da a conocer un procedimiento para detectar y/o tratar un subgrupo de pacientes con cáncer de próstata que puede beneficiarse de un tratamiento con taxanos. En el marco de este procedimiento, se examina si en una muestra tomada del paciente se encuentra una variante alternativa de corte y empalme del receptor de andrógenos. Para este propósito, se pueden captar células tumorales circulantes de la muestra y analizarlas para detectar la presencia de una de las variantes alternativas de corte y empalme específicas. La captura se puede realizar mediante anticuerpos inmovilizados. Las pruebas comprenden poner en contacto la muestra con un anticuerpo dirigido contra la variante alternativa de corte y empalme y detectar la unión del anticuerpo a la variante alternativa de corte y empalme.

30 A partir de Hekimian, K. et al., Clin. Chem. Lab. Med. 2012; 50(4), páginas 701-708, se conoce un desenmascaramiento de moléculas de adhesión de células epiteliales (EpCAM) a células tumorales epiteliales que circulan en pacientes con cáncer de mama mediante el tratamiento con Tween®20. La publicación especula que la EpCAM está enmascarada por glicoproteínas o lipoproteínas de membrana, lo que impide la unión de anticuerpos. En un experimento, se incubaron respectivamente 1 ml de sangre periférica anticoagulada el día de la extracción y el primer y segundo día de la extracción durante 5 minutos con 20 µl de Tween® 20 o sin el detergente. A continuación, los eritrocitos contenidos allí se lisaron con un tampón de lisis de eritrocitos. Las células epiteliales fueron luego detectadas con un anticuerpo dirigido hacia EpCAM. Al hacerlo, se vio que con el tratamiento con Tween®20 el día de la extracción, el día uno y el día dos tras la extracción, se pudo detectar una cantidad igual de alta de células dentro de los márgenes de error. Sin Tween®20 no se pudieron detectar células el día de la extracción, el primer día se detectaron menos y el segundo día la misma cantidad de células que en el caso del tratamiento con Tween®20. Esto muestra que el almacenamiento de las muestras de sangre previo a su incubación con los anticuerpos también aumenta la accesibilidad a EpCAM para los anticuerpos en las células.

45 El objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento alternativo para determinar una concentración de células tumorales epiteliales en una muestra de sangre mezclada con un anticoagulante o en una muestra de aspirado proveniente de un humano o mamífero.

50 El objetivo se consigue mediante las características de la reivindicación de la patente 1. Las configuraciones ventajosas resultan de las características de las reivindicaciones de la patente 2 a 15.

La invención se refiere a un procedimiento para determinar una concentración de células epiteliales en una muestra de sangre mezclada con un anticoagulante o en una muestra de aspirado proveniente de un humano o mamífero. En el marco de este procedimiento, la muestra se almacena tras la adición de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos, cada uno de ellos dirigido hacia un antígeno específico de células epiteliales, hasta que el aumento en la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos a las células disminuye en función del tiempo, es decir, hasta que la velocidad de unión disminuye, o hasta que la curva de unión respecto al tiempo comienza a aplanarse y a ubicarse en el rango de saturación. Una vez que esto ocurre se puede determinar la cantidad de células marcadas y, en función de esto, la concentración original de estas células en la muestra de sangre o en la muestra de aspirado. Sorprendentemente se ha demostrado que alcanzar el inicio del aplanamiento de la curva de saturación lleva mucho más tiempo del que se esperaría para un número dado de ligandos de unión. Se cree que muchos de los antígenos específicos de células epiteliales primero están enmascarados y con el tiempo se vuelven accesibles para la unión de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos. Únicamente una vez que esto ha ocurrido es posible determinar la cantidad de células de manera confiable.

El procedimiento de acuerdo con la invención para determinar una concentración de células epiteliales en una muestra de sangre mezclada con un anticoagulante o una muestra de aspirado de sangre proveniente de un humano o mamífero comprende concretamente las siguientes etapas:

- 5 a) Lisar los eritrocitos contenidos en la muestra de sangre o la muestra de aspirado mediante la adición de un tampón que permite realizar la lisis de los eritrocitos, separando las células no lisadas y suspendiendo las células separadas en un tampón, almacenando la muestra de sangre o la muestra de aspirado al menos durante 24 horas a una temperatura de entre 0 y 40 °C antes de lisar los eritrocitos,
- 10 b) Añadir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que llevan cada uno al menos una etiqueta y cada uno de ellos está dirigido hacia la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y/o al menos hacia otro antígeno específico de células epiteliales, a una suspensión celular obtenida en la etapa a) separando el subconjunto obtenido de esta suspensión celular, mezclando los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos y la suspensión o el subconjunto de células e incubando una mezcla obtenida de esta manera durante
- 15 al menos el tiempo que sea necesario para alcanzar una velocidad de unión de la unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a las células decreciente con una incubación de al menos 6 horas,
- 20 c) Determinar la cantidad de células marcadas por una unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos en la mezcla obtenida en la etapa d) y
- d) Calcular la concentración de la cantidad de células marcadas en la muestra de sangre o muestra de aspirado determinada en la etapa c).

25 La totalidad del procedimiento se lleva a cabo fuera del cuerpo humano y del cuerpo animal. El mezclado de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos y el subconjunto de acuerdo con la etapa b) puede llevarse a cabo inmediatamente después de haber añadido los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos al subconjunto.

30 Al calcular la concentración de la cantidad de células marcadas determinada en la etapa c) en la muestra de sangre o en la muestra de aspirado de acuerdo con la etapa d), se debe tener en cuenta la dilución y/o el aumento de la concentración de las células en relación con la muestra de sangre o la muestra de aspirado.

35 Normalmente no se encuentran células epiteliales en la sangre circulante. Sin embargo, se ha demostrado que en la sangre de pacientes con un tumor epitelial maligno, como por ejemplo, un tumor de pulmón, mama, colon o próstata, sí se encuentran células tumorales epiteliales circulantes en la sangre. Además, se ha demostrado que en la sangre de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas del tejido epitelial, como por ejemplo, artritis reumatoide, asma, EPOC, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, se pueden encontrar células epiteliales de este tejido en la sangre periférica. Además, debido a circunstancias que dañen el tejido epitelial, como por ejemplo, una operación o una contusión, las células epiteliales pasan a la sangre periférica. Por lo tanto, a los efectos de diagnosticar una

40 enfermedad de un tumor epitelial o una enfermedad inflamatoria crónica del tejido epitelial, es útil para hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad o del proceso de curación, y los exámenes preventivos o para la determinación de perfiles, que la concentración de células epiteliales en una muestra de sangre humana o de mamífero o una muestra de aspirado se pueda determinar con la mayor precisión posible. En este caso, las células pueden ser células de un tumor epitelial, células epiteliales de un tejido inflamado u otras células epiteliales que hayan pasado al

45 torrente sanguíneo debido a una circunstancia que haya dañado el tejido epitelial.

El anticoagulante puede ser, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato o heparina.

50 Los fragmentos de anticuerpos pueden ser, por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o Fab. Sin embargo, estos también pueden ser fragmentos de anticuerpos recombinantes, como por ejemplo, scFv, di-scFv, sdAb (anticuerpo de un solo dominio) o fragmentos de anticuerpos unidos químicamente como F(ab')<sub>2</sub>. Los miméticos de anticuerpos son compuestos que, al igual que los anticuerpos, son capaces de unirse a antígenos sin ser ellos mismos anticuerpos ni fragmentos de anticuerpos. Estos son en su mayoría péptidos, proteínas o lectinas artificiales.

55 La determinación de la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos de acuerdo con la etapa c) se lleva a cabo en función del tiempo a partir de que se mezclan de acuerdo con la etapa b). Los expertos en la técnica del estudio de la unión de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a sustratos conocen cómo se determina la velocidad de unión.

60 Los inventores de la presente invención han reconocido que la unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos marcados a un antígeno específico de células epiteliales en la superficie de las células epiteliales circulantes no alcanza la saturación, como sería de esperar, en unos pocos minutos tras su adición y mezcla, sino que dicha saturación se alcanza solo transcurridas varias horas. Dado que esto no se puede basar únicamente en la reacción antígeno-anticuerpo, se supone que existe un acceso cada vez mayor a los epítotos enmascarados

65 previamente. La accesibilidad se incrementa mediante el almacenamiento previo a la incubación con los anticuerpos, como se da a conocer en Hekimian, K. et al. Sin embargo, se incrementa nuevamente mediante una incubación

prolongada en presencia de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos. La razón de esto podría ser que su unión provoca el desenmascaramiento de los antígenos.

Este tipo de efecto es absolutamente sorprendente para el experto en la materia.

5

Entre las etapas a) y b) se pueden llevar a cabo las siguientes etapas adicionales:

a1) Separar al menos un subconjunto o un subconjunto adicional de la suspensión celular obtenida en la etapa a),

10 a2) Añadir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que llevan cada uno al menos una etiqueta y cada uno de ellos está dirigido hacia la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y/o al menos hacia otro antígeno específico de células epiteliales, a un subconjunto adicional en una cantidad tal que su concentración en el subconjunto adicional sea idéntica a la concentración de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos en la suspensión celular o el subconjunto de acuerdo con la etapa b); mezclar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos y el subconjunto adicional; e incubar una mezcla obtenida de esta manera a una temperatura predeterminada y

15

a3) Determinar de forma continua o reiterada una cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos a las células contenidas en el subconjunto adicional en función del tiempo a partir de que se mezclan de acuerdo con la etapa a2), calcular en función de esto la velocidad de unión y determinar el tiempo que se necesita para alcanzar una velocidad de unión decreciente de la unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a estas células,

20

en la que la incubación en la etapa b) se lleva a cabo a la temperatura predeterminada, seleccionando el tiempo de acuerdo con la etapa b) de tal manera que sea al menos igual al tiempo determinado en la etapa a3).

25

La cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que se determina en la etapa a3) puede ser relativa o absoluta. Una cantidad relativa es suficiente para determinar una velocidad de unión decreciente. Si las etapas de la a) a la c) o de la a) a la d) se llevan a cabo varias veces en condiciones idénticas, es suficiente que las etapas de la a1) a la a3) para determinar el tiempo de acuerdo con la etapa a3) se realicen solo una vez y se seleccione respectivamente el tiempo de acuerdo con la etapa b) para que sea al menos igual que el tiempo determinado una única vez en la etapa a3).

30

Como es habitual en los experimentos de unión, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos se añaden respectivamente en las etapas a2) y b) en una cantidad tal que su concentración en la suspensión celular, el subconjunto o el subconjunto adicional supere ampliamente, pero al menos, duplique la concentración de EpCAM o de otro antígeno específico de células epiteliales.

35

En las etapas b) y a2), tras la adición de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos y una incubación de 5 a 60 minutos, por ejemplo, tras 15 minutos o entre las etapas b) y c) o a2) y a3), se puede llevar a cabo una dilución de la suspensión, por ejemplo, con PBS, para obtener mejores resultados de medición al determinar los tiempos de acuerdo con las etapas c) y a3), por ejemplo, porque se reduce la señal de fondo que proviene de los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y los miméticos de anticuerpos no unidos.

40

Al determinar los tiempos de acuerdo con la etapa a3), se determina el tiempo de incubación de las células que se necesita para determinar de manera confiable una concentración de células epiteliales con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos. Este tiempo puede ser entre 8 y 25 horas. Sin embargo, al seleccionar una temperatura relativamente alta, se puede alcanzar más rápidamente una velocidad de unión decreciente, por ejemplo, tras 6 a 8 horas. A la inversa, a una temperatura relativamente baja, lograr una velocidad de unión decreciente también puede tardar más de 25 horas y, por ejemplo, entre 25 y 30 horas.

45

50

La temperatura predeterminada puede ser una temperatura en el rango de 0 a 30 °C, en particular, de 0 a 20 °C, en particular de 8 a 15 °C.

55

La incubación de acuerdo con la etapa b) se puede llevar a cabo, por ejemplo, durante al menos 6 horas, al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas, al menos 14 horas, al menos 16 horas, al menos 18 horas, al menos 20 horas, al menos 22 horas, al menos 24 horas, al menos 25 horas o al menos 30 horas.

60

La etiqueta puede ser una etiqueta fluorescente por medio de un fluorocromo, como por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE), una etiqueta de color por medio de un cromóforo o una etiqueta detectable indirectamente por medio de biotina, avidina, estreptavidina o cualquier otra etiqueta de afinidad, etiqueta de epítipo o etiqueta de proteína. Un etiquetado directo del anticuerpo tiene la ventaja respecto al etiquetado indirecto, por ejemplo, de que por medio de un anticuerpo secundario se puede prescindir de una etapa de lavado en la que normalmente se pierde una parte de las células epiteliales.

65

La determinación de la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos de acuerdo con la etapa a3) y/o la determinación de la cantidad de células marcadas por una unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos de acuerdo con la etapa c) se puede llevar a cabo por medio de una citometría de barrido por láser, una microscopía de fluorescencia, en particular, una microscopía de fluorescencia cuantitativa o una microscopía óptica, en particular, una microscopía óptica cuantitativa. Al determinar la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos y/o determinar la cantidad de células marcadas mediante una microscopía de fluorescencia o una microscopía óptica, se puede usar un software de reconocimiento de imágenes para detectar las células. Esto permite distinguir las células marcadas de los desechos celulares marcados u otras estructuras marcadas de manera no específica.

Cuando la etiqueta es una etiqueta fluorescente, en la citometría de barrido por láser o en la microscopía de fluorescencia, se puede determinar dinámicamente para cada una de las células una fluorescencia total por célula y una fluorescencia de fondo para esa célula de tal manera que se obtengan valores de fluorescencia equivalentes respectivos como la diferencia entre la fluorescencia total calculada para cada célula y la fluorescencia de fondo calculada para esa célula. En la determinación dinámica de la fluorescencia de fondo, en cada medición de la fluorescencia total de una célula, en el momento de dicha medición se mide también la fluorescencia del fondo en los alrededores de esta célula, es decir, a una distancia de aproximadamente la mitad del diámetro celular de la membrana celular de esta célula. Como resultado, se puede aumentar la precisión de cada medición y la validez de los resultados de la medición.

La separación de las células no lisadas de acuerdo con la etapa a) se puede llevar a cabo mediante centrifugación, una simple sedimentación o filtración. La suspensión de las células separadas en un tampón de acuerdo con la etapa a) tiene lugar inmediatamente después de la separación, es decir, para que las células no se sequen tras la separación y se dañen por el secado. El tampón puede ser PBS, es decir, una solución salina tamponada con fosfato.

En una configuración del procedimiento, en cada caso antes de la adición de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que llevan al menos una etiqueta de acuerdo con las etapas b) y a2) se añade a la suspensión celular, el subconjunto o el subconjunto adicional de la suspensión celular un reactivo de bloqueo para bloquear puntos de unión no específicos y/o por receptores Fc, y que se mezcla e incuba con la suspensión celular, el subconjunto o el subconjunto adicional de la suspensión celular. La incubación se puede llevar a cabo, por ejemplo, durante unos 15 minutos a 8 °C.

En una configuración del procedimiento, en ninguna de las etapas se usa un detergente y/o en ninguna de las etapas hay fijación de las células. Como resultado, se puede evitar el daño a las células epiteliales y, por lo tanto, influir en el resultado de la medición. Esto es particularmente importante si el procedimiento debe determinar una concentración de células con una membrana celular intacta o incluso una concentración de células epiteliales vivas.

Todas las etapas del procedimiento o al menos las etapas b) y c) o al menos las etapas

b), a2), a3) y c) se pueden llevar a cabo automáticamente por medio de un sistema automático diseñado a estos efectos. Como resultado, se puede lograr una objetivación y una mejora de la reproducibilidad de los resultados de la medición.

En una configuración del procedimiento, en la etapa a1), se separan varios subconjuntos, añadiendo en cada caso una cantidad diferente de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a cada uno de los subconjuntos y, en particular, se mezclan inmediatamente con los respectivos subconjuntos, determinando en la etapa a3) el tiempo requerido para alcanzar la velocidad de unión decreciente para cada uno de los subconjuntos, y seleccionando luego para llevar a cabo la etapa b) la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos con la que se alcanza la velocidad de unión decreciente en el tiempo deseado.

El otro antígeno específico de células epiteliales se puede seleccionar, por ejemplo, del siguiente grupo: Receptor de andrógenos, receptor del factor de crecimiento epitelial (receptor de EGF), receptor de estrógenos, receptor de progesterona, antígeno prostático específico (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), ligando 1 de muerte programada (PDL-1), Melan A, B7-H3, receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (receptor de VEGF), Ki67, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (receptor de IGF) y Her2neu.

La muestra de sangre o la muestra de aspirado se pueden almacenar al menos 14 horas, en particular, al menos 16 horas, en particular, al menos 18 horas, en particular, al menos 20 horas, en particular, al menos 22 horas, en particular, al menos 24 horas, a una temperatura entre 0 y 40 °C, en particular, a una temperatura entre 15 y 25 °C, antes de que se lisen los eritrocitos. Como resultado, se puede lograr una mayor mejora de la accesibilidad de los antígenos específicos de células epiteliales.

A continuación, se explica la invención mediante un ejemplo de realización.

Se deja reposar 1 ml de sangre anticoagulada con EDTA durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se llena con un tampón de lisis de eritrocitos (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) hasta 15

## ES 2 718 689 T3

ml y se almacena durante 15 minutos a 8 °C. A continuación, la muestra se centrifuga a 780 g durante 7 minutos. El sobrenadante se desecha en su totalidad. El sedimento se suspende nuevamente en 500 µl PBS-EDTA (137 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 8,1 mM NaHPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, pH 7,4).

5 Se introducen 50 µl de la muestra en un recipiente de reacción y se mezclan con 15 µl de FcR reactivo de bloqueo (Miltenyi Biotec GmbH) y se incuban durante 15 minutos a 8 °C. A continuación, se añaden 5 µl de un anticuerpo monoclonal dirigido hacia EpCAM (HEA 125, Miltenyi Biotec GmbH) y se mezclan con la suspensión. A continuación, se lleva a cabo una incubación protegida contra la luz durante 15 minutos a 8 °C. Luego se añaden 430 µl de PBS-EDTA y se mezclan con la suspensión. La suspensión resultante se incuba a 8 °C en la oscuridad. Tras haber  
10 mezclado nuevamente, se extraen cada vez tras diferentes intervalos de tiempo 100 ml de la suspensión y se miden con un microscopio de escaneo láser iCys (CompuCys, Beckman Coulter GmbH). La medición también se puede llevar a cabo con otro microscopio adecuado para la detección de fluorescencia. Basándose en la unión medida en diferentes momentos, se puede determinar el tiempo a partir de que se ha mezclado con el anticuerpo que se necesita para lograr una velocidad de unión decreciente.

15 A continuación, otros 50 µl del sedimento celular que se ha vuelto a suspender en PBS-EDTA se mezclan con 15 µl de FcR reactivo de bloqueo y se incuban tras mezclarlos durante 15 minutos a 8 °C. A continuación, se añaden 5 µl del anticuerpo anteriormente mencionado dirigido contra EpCAM y se mezclan con la suspensión celular. Tras 15 minutos de incubación protegida contra la luz a 8 °C, se añaden 430 µl de PBS-EDTA y se mezclan con la suspensión.  
20 A continuación, la suspensión se incuba a 8°C en la oscuridad durante el tiempo que sea necesario para alcanzar una velocidad de unión decreciente. Tras mezclar una vez más completamente la suspensión, se extraen 100 µl de esta y se examinan en el microscopio de barrido por láser o en otro microscopio adecuado para la detección de fluorescencia. Se determina la cantidad de células marcadas por una unión de los anticuerpos y, en función de esto, la concentración de estas células en la muestra de sangre original.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para determinar una concentración de células epiteliales en una muestra de sangre mezclada con un anticoagulante o en una muestra de aspirado proveniente de un humano o mamífero con las siguientes etapas:
- 5 a) Lisar los eritrocitos contenidos en la muestra de sangre o la muestra de aspirado mediante la adición de un tampón que permite realizar la lisis de los eritrocitos, separando las células no lisadas y suspendiendo las células separadas en un tampón, almacenando la muestra de sangre o la muestra de aspirado al menos durante 24 horas a una temperatura de entre 0 y 40 °C antes de lisar los eritrocitos,
- 10 b) Añadir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que llevan cada uno al menos una etiqueta y cada uno de ellos está dirigido hacia la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y/o al menos hacia otro antígeno específico de células epiteliales, a una suspensión celular obtenida en la etapa a) o a un subconjunto obtenido separando esta suspensión celular; mezclar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos y la suspensión o el subconjunto de células; e incubar una mezcla obtenida de esta manera durante al menos el tiempo que sea necesario para alcanzar una velocidad de unión de la unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a las células decreciente con una incubación de al menos 6 horas,
- 15 c) Determinar la cantidad de células marcadas por una unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos en la mezcla obtenida en la etapa b) y
- 20 d) Calcular la concentración de las células marcadas en la muestra de sangre o muestra de aspirado, cuya cantidad se ha determinado en la etapa c),
- 25 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que entre las etapas a) y b) se llevan a cabo las siguientes etapas:
- 30 a1) Separar al menos un subconjunto o un subconjunto adicional de la suspensión celular obtenida en la etapa a),
- a2) Añadir anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que llevan cada uno al menos una etiqueta y cada uno de ellos está dirigido hacia la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM) y/o al menos hacia otro antígeno específico de células epiteliales, a un subconjunto adicional en una cantidad tal que su concentración en el subconjunto adicional sea idéntica a la concentración de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos en la suspensión celular o el subconjunto de acuerdo con la etapa b); mezclar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos y el subconjunto adicional; e incubar una mezcla obtenida de esta manera a una temperatura predeterminada y a3) determinar de forma continua o reiterada la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos a las células contenidas en el subconjunto adicional en función del tiempo a partir de que se mezclan de acuerdo al paso a2), calcular en función de esto la velocidad de unión y determinar el tiempo que se necesita para alcanzar una velocidad de unión decreciente de la unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a estas células,
- 35 en la que la incubación en la etapa b) se lleva a cabo a la temperatura predeterminada, seleccionando el tiempo de acuerdo con la etapa b) de tal manera que sea al menos igual al tiempo determinado en la etapa a3).
- 40 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la temperatura predeterminada es una temperatura en el rango de 0 a 30 °C, en particular de 0 a 20 °C, en particular de 8 a 15 °C.
- 45 4. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la incubación de acuerdo con la etapa b) se puede llevar a cabo, por ejemplo, durante al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 10 horas, al menos 12 horas, al menos 14 horas, al menos 16 horas, al menos 18 horas, al menos 20 horas, al menos 22 horas, al menos 24 horas, al menos 25 horas o al menos 30 horas.
- 50 5. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la etiqueta es una etiqueta fluorescente por medio de un fluorocromo, una etiqueta de color por medio de un cromóforo o una etiqueta detectable indirectamente por medio de biotina, avidina, estreptavidina o cualquier otra etiqueta de afinidad, etiqueta de epítipo o etiqueta de proteína.
- 55 6. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos de acuerdo con la etapa a3) y/o la cantidad de células marcadas por una unión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos de acuerdo con la etapa c) mediante una citometría de barrido por láser, una microscopía de fluorescencia o una microscopía óptica.
- 60 65

- 5 7. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos unidos y/o la cantidad de células marcadas se determinan mediante una microscopía de fluorescencia o una microscopía óptica, y se puede usar un software de reconocimiento de imágenes para detectar las células.
- 10 8. Un procedimiento de acuerdo con una la reivindicación 6 o 7, en el que el etiquetado es una etiqueta de fluorescencia y en la citometría de barrido por láser o en la microscopía de fluorescencia, se puede determinar dinámicamente para cada una de las células una fluorescencia total por célula y una fluorescencia de fondo para esa célula de tal manera que se obtengan valores de fluorescencia equivalentes respectivos como la diferencia entre la fluorescencia total calculada para cada célula y la fluorescencia de fondo calculada para esa célula.
- 15 9. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que la separación de acuerdo con la etapa a) se lleva a cabo mediante centrifugación, una simple sedimentación o filtración.
- 20 10. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que en cada caso antes de la adición de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos que llevan al menos una etiqueta de acuerdo con las etapas b) y a2) se añade a la suspensión celular, el subconjunto o el subconjunto adicional de la suspensión celular un reactivo de bloqueo para bloquear puntos de unión no específicos y/o por receptores Fc, y que se mezcla e incuba con la suspensión celular, el subconjunto o el subconjunto adicional de la suspensión celular.
- 25 11. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que en ninguna de las etapas se usa un detergente y/o en ninguna de las etapas hay fijación de las células.
- 30 12. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que todas las etapas del procedimiento o al menos las etapas b) y c) o al menos las etapas b), a2), a3) y c) se pueden llevar a cabo automáticamente por medio de un sistema automático diseñado a estos efectos.
- 35 13. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa a1), se separan varios subconjuntos, añadiendo en cada caso una cantidad diferente de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos a cada uno de los subconjuntos y estos se mezclan con los respectivos subconjuntos, determinando en la etapa a3) el tiempo requerido para alcanzar la velocidad de unión decreciente para cada uno de los subconjuntos, y seleccionando luego para llevar a cabo la etapa b) la cantidad de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos con la que se alcanza la velocidad de unión decreciente en el tiempo deseado.
- 40 14. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en el que el otro antígeno específico de células epiteliales se puede seleccionar, por ejemplo, del siguiente grupo: Receptor de andrógenos, receptor del factor de crecimiento epitelial (receptor de EGF), receptor de estrógenos, receptor de progesterona, antígeno prostático específico (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PS-MA), ligando 1 de muerte programada (PDL-1), Melan A, B7-H3, receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (receptor de VEGF), Ki67, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (receptor de IGF) y Her2neu.