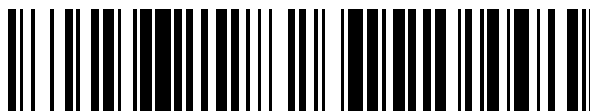


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 760**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
C12Q 1/56 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2014** **PCT/US2014/031895**
87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14160796**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2014** **E 14776499 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 2979093**

54 Título: **Concentración de células raras**

30 Prioridad:

29.03.2013 US 201361806581 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.06.2020

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

PUGIA, MICHAEL

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 766 760 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

Concentración de células raras

5 Antecedentes

La invención se refiere a métodos para aumentar una razón de células raras con respecto a células no raras en una muestra de sangre y para identificar las células raras. Más particularmente, la invención se refiere a métodos para aumentar una razón de células cancerosas con respecto a glóbulos blancos en una muestra de sangre y para identificar las células cancerosas.

La filtración de células para la separación de células cancerosas usando una matriz porosa se usa para clasificar células por tamaño y, en la mayoría de los casos, tales métodos de filtración permiten la extracción de células tras la separación. Tanto los métodos de post microfluídicos como los de membrana microfluídica se usan en estos enfoques de filtración. Sin embargo, los métodos de filtración existentes están limitados por determinados factores, que incluyen, por ejemplo, el intervalo de diámetros que tienen las células *in vitro* en lugar de un único diámetro. Este intervalo de diámetros se demuestra, por ejemplo, en el caso de poblaciones de células cancerosas y poblaciones de glóbulos blancos, que tienen diámetros superpuestos. Durante la filtración, se pierden las células cancerosas pequeñas y los glóbulos blancos más grandes contaminan el material separado. Además, las poblaciones de células cancerosas y las poblaciones de glóbulos blancos son muy heterogéneas y comprenden una variedad de tipos de diámetro de célula dentro de estas poblaciones individuales. Por ejemplo, el intervalo de diámetros para los glóbulos blancos es mucho más amplio cuando se consideran muestras que incluyen poblaciones de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, linfocitos y macrófagos. Las células cancerosas en la sangre también pueden variar en tamaño.

Otra limitación en la selectividad de un método de filtración de células es que el tamaño de poro ideal se ve afectado por la deformabilidad de diversas células. Esta deformabilidad reduce además la selectividad para la exclusión por tamaños para aislar diferentes células. Una célula de diámetro pequeño con baja deformabilidad requiere el uso de una matriz que tenga incluso un tamaño de poro más pequeño que el de otro modo podría usarse. Usando tamaños de poro más pequeños aumenta el número de células deseadas capturadas (por ejemplo, células cancerosas) pero da como resultado una separación menos pura. Además, cuando los poros se hacen más pequeños tienden a la obstrucción. La presión aumenta a medida que disminuye el tamaño de poro. La obstrucción y la presión más alta pueden reducirse temporalmente mediante una fuerza de flujo oscilatorio (on/off). Evitar que se forme una presión a lo largo de la microestructura de separación es importante ya que presiones más altas reducen el impacto del tamaño de célula en la separación.

Además, los glóbulos sanguíneos se fijan normalmente antes de la separación por filtración para mejorar la separación de las células. La recuperación de células diana se reduce cuando no se usa la fijación dado que algunas células diana tienen una deformabilidad mayor que otras células diana. La fijación provoca que todas las células tengan una deformabilidad similar (propiedades viscoelásticas). Sin embargo, existen varias desventajas para fijar las células tales como, por ejemplo, el requisito de presión más grande para el paso de las células fijadas a través de una matriz porosa. A medida que aumenta la presión, disminuye el tamaño de poro ideal. Los poros más pequeños conducen a una captura más grande de células no deseadas. Otra desventaja es que las células fijadas no son viables y no pueden hacerse crecer o usarse para medir las respuestas de las células al estímulo.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un método de separación por filtración que no requiera la fijación. El método debe mejorar la recuperación celular y ser independiente de diferencias en diámetro de célula y diferencias en propiedades viscoelásticas.

Desitter *et al.*, Anticancer Research, vol. 31, n.º 2, febrero de 2011, págs.427-42, dan a conocer un dispositivo para el aislamiento rápido por tamaño y la caracterización de células tumorales circulantes raras.

El documento US 2010/247492 proporciona métodos para revelar, detectar y analizar células tumorales circulantes en la sangre de un sujeto. Revelar células tumorales circulantes detectables permite la detección en fase temprana y el diagnóstico además del pronóstico a largo plazo en sujetos con cáncer. Adicionalmente, el enriquecimiento permite la detección robusta y el análisis clínicamente significativo de muestras de volumen bajo para su uso en la práctica clínica, así como en métodos innovadores para el tratamiento de cánceres.

Sumario

Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos para aumentar una razón de células raras con respecto a células no raras en una muestra de sangre que se sospecha que contiene células raras y células no raras. Una muestra de sangre tratada se prepara proporcionando en combinación la muestra de sangre, un agente de desactivación de plaquetas, un agente de detención de formación de fibrina y fibrina en una cantidad suficiente para provocar un nivel de aglutinación predeterminado de las células raras. A continuación, la muestra de sangre tratada se pone en contacto con una matriz porosa de manera que las células

raras aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa.

Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos para aumentar una razón de células cancerosas con respecto a células no cancerosas en una muestra de sangre que se sospecha que contiene células cancerosas y células no cancerosas. En el método, una muestra de sangre tratada se prepara combinando la muestra de sangre, un agente de desactivación de plaquetas, un agente de detención de formación de fibrina y fibrina en una cantidad suficiente para provocar la aglutinación de las células raras en una cantidad de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 100% basándose en una cantidad de área superficial de las células raras cubierta con fibrina grande. La muestra de sangre tratada se diluye con un medio de dilución y se dispone en un lado de una matriz porosa. Se aplica presión a la muestra de sangre tratada dispuesta y las células cancerosas aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa.

Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos para identificar al menos un tipo de célula rara en una muestra de sangre que se sospecha que contiene el tipo de célula rara. Se proporciona una combinación que comprende la muestra de sangre, un agente de desactivación de plaquetas, un agente de detención de formación de fibrina y fibrina en una cantidad de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 10 mg/l basándose en el volumen de la muestra de sangre para provocar la aglutinación de las células raras y para preparar una muestra de sangre tratada. Tras la dilución de la muestra de sangre tratada con un medio de dilución, la muestra de sangre tratada diluida se pone en contacto con una matriz porosa de manera que las células raras aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa. A continuación, las células raras se ponen en contacto con un agente de identificación para identificar las células raras.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos proporcionados en el presente documento no están a escala y se proporciona con el fin de facilitar el entendimiento de determinados ejemplos según los principios descritos en el presente documento, y se proporcionan a modo de ilustración y no como limitación del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La figura 1 representa una visualización de células y fibrina usando inmunofluorescencia directa basándose en los experimentos descritos en la sección de ejemplos a continuación, que se realizaron según los principios descritos en el presente documento. La visualización corresponde a los resultados resumidos en la tabla 1 para el tipo de muestra 3.

La figura 2 representa una visualización de células y fibrina usando inmunofluorescencia directa basándose en los experimentos descritos en la sección de ejemplos a continuación. La visualización corresponde a los resultados resumidos en la tabla 1 para el tipo de muestra 2, que no es según los principios descritos en el presente documento, pero se proporciona con fines de comparación.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Descripción general

Los ejemplos según los principios descritos en el presente documento permiten la separación de diferentes tipos de célula tales como, por ejemplo, células cancerosas de glóbulos blancos. Una muestra de sangre que se sospecha que contiene los diferentes tipos de célula se trata para minimizar la formación de plaquetas y para detener la formación de fibrina que resulta de la coagulación de la sangre que resulta de factores de coagulación de sangre naturales presentes en la muestra de sangre. La fibrina se añade a la muestra de sangre para obtener un nivel de aglutinación predeterminado de uno o más de los diferentes tipos de célula sobre otros tipos de célula en la muestra de sangre. El nivel de aglutinación predeterminado de algunos de los diferentes tipos de célula permite que una muestra de sangre diluida tratada tal como se describió anteriormente se filtre a través de una matriz porosa con tamaños de poro relativamente pequeños. Las células aglutinadas se retienen en la matriz porosa después de la filtración y las células no aglutinadas, que son principalmente células no deseadas, pasan a través de la matriz porosa.

La separación lograda según los principios descritos en el presente documento es independiente de las propiedades viscoelásticas de las células y del diámetro de las células. Además, los métodos según los principios descritos en el presente documento funcionan para células vivas fijadas y no fijadas. Además, los métodos según los principios descritos en el presente documento evitan cantidades variables de fibrina formada entre diferentes sujetos por uno o más motivos relacionados con las deficiencias que pueden dar lugar a la cascada de coagulación natural de los diferentes sujetos.

Las células raras son aquellas células que están presentes en una muestra en cantidades relativamente pequeñas cuando se compara con la cantidad de células no raras en una muestra. En algunos ejemplos, las células raras están presentes en una cantidad de aproximadamente el 10⁻⁸% a aproximadamente el 10⁻²% en peso de una población celular total en una muestra que se sospecha que contiene las células raras. Las células raras pueden ser, pero no se limitan a, células malignas tales como neoplasias malignas o células cancerosas; células endoteliales

circulantes; células epiteliales circulantes; células fetales; células inmunitarias (células B, células T, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, monocitos); células madre; glóbulos rojos nucleados (normoblastos o eritroblastos); y granulocitos inmaduros; por ejemplo.

Las células no raras son aquellas células que están presentes en cantidades relativamente grandes cuando se compara con la cantidad de células raras en una muestra. En algunos ejemplos, las células no raras son al menos aproximadamente 10^2 veces, o al menos aproximadamente 10^3 veces, o al menos aproximadamente 10^4 veces, o al menos aproximadamente 10^5 veces, o al menos aproximadamente 10^6 veces, o al menos aproximadamente 10^7 veces, o al menos aproximadamente 10^8 veces mayor que la cantidad de las células raras en la población celular total en una muestra que se sospecha que contiene células no raras y células raras. Las células no raras pueden ser, pero no se limitan a, glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos, por ejemplo.

La muestra que va a someterse a prueba es una muestra de sangre de un mamífero tal como, pero sin limitarse a, un sujeto humano, por ejemplo. La muestra de sangre es una que contiene células tales como, por ejemplo, células no raras y células raras. En algunos ejemplos, la muestra de sangre es plasma o sangre completa.

Las muestras se recogen del cuerpo de un sujeto en un recipiente adecuado tal como, pero sin limitarse a, una bolsa, un frasco, una aguja o un recipiente VACUTAINER®, por ejemplo. El recipiente puede contener un medio de extracción en el que se administra la muestra. El medio de recogida es habitualmente un medio seco y puede comprender una cantidad de agente de desactivación de plaquetas eficaz para lograr la desactivación de plaquetas en la muestra de sangre cuando se mezcla con la muestra de sangre. El medio de recogida también puede comprender un agente de detención de formación de fibrina en una cantidad suficiente para detener la formación de fibrina a partir de proteínas que se producen de manera natural en la muestra de sangre.

Los agentes de desactivación de plaquetas incluyen, pero no se limitan a, agentes quelantes tales como, por ejemplo, agentes quelantes que comprenden un resto de ácido triacético o una sal del mismo, un resto de ácido tetraacético o una sal del mismo, un resto de ácido pentaacético o una sal del mismo, o un resto de ácido hexaacético o una sal del mismo. En algunos ejemplos, el agente quelante es ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales o tetraacetato de etilenglicol (EGTA) y sus sales. La cantidad eficaz de agente de desactivación de plaquetas es dependiente de uno o más de la naturaleza del agente de desactivación de plaquetas, la naturaleza de la muestra de sangre, el nivel de activación de plaquetas y la fuerza iónica, por ejemplo. En algunos ejemplos, para EDTA como el antiagregante plaquetario, la cantidad de EDTA seco en el recipiente es aquella que producirá una concentración de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 mg/ml de sangre, o aproximadamente 1,5 mg/ml de la sangre. La cantidad del agente de desactivación de plaquetas es aquella que es suficiente para lograr al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95%, o al menos aproximadamente el 99% de desactivación de plaquetas.

Tal como se mencionó anteriormente, la muestra de sangre también se combina con un agente de detención de formación de fibrina, que puede estar presente en un recipiente de extracción sanguínea o añadirse posteriormente a la extracción de la muestra de sangre. El agente de detención de formación de fibrina es una sustancia que, cuando se combina con la muestra de sangre, detiene la formación de fibrina en la superficie de las células raras, que se forma como resultado de la presencia en la muestra de sangre de proteínas de coagulación que se producen de manera natural tales como, por ejemplo, fibrinógeno. Tales agentes de detención de formación de fibrina incluyen, por ejemplo, agentes de desactivación de plaquetas, anticoagulantes y agentes de fijación.

Los agentes de desactivación de plaquetas incluyen aquellos mencionados anteriormente. En algunos ejemplos, el agente de desactivación de plaquetas es, pero no se limita a, quelantes tales como, por ejemplo, EDTA; citrato; inhibidores de la ciclooxigenasa; inhibidor del receptor adenosín difosfato (ADP); inhibidores de la glicoproteína IIB/IIIA; inhibidores de la fosfodiesterasa; inhibidores de tromboxano; e inhibidores de la recaptación de adenosina, por ejemplo.

Los anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores del factor VII, inhibidores del factor X, inhibidores directos de la trombina, cumarinas, heparina y proteínas antitrombina, por ejemplo.

Los agentes de fijación incluyen, pero no se limitan a, sustancias que actúan para reticular proteínas y/o para desactivar enzimas proteolíticas y evitar la generación natural de fibrina. En algunos ejemplos, el agente de fijación es un reactivo de aldehído (tal como, por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído) y ureas (tal como, por ejemplo, diazolidinil urea o imidazolidinil urea).

Una cantidad de agente de detención de formación de fibrina empleada es dependiente del número de factores tales como, por ejemplo, la naturaleza del agente de detención de formación de fibrina, el número de células en la muestra, la naturaleza de la muestra de sangre, el nivel de desactivación de plaquetas, el nivel de activación de la coagulación y la fuerza iónica. El intervalo normal para la fibrina en sangre es de 0,22 a 0,50 $\mu\text{g/ml}$ (mg/l), que se traduce en de 110 a 250 ng/ml de dímero D, un fragmento de proteína o un producto de degradación de fibrina que resulta de la degradación de fibrina por fibrinólisis. Los valores anómalos para la fibrina en sangre son de 0,5 a

5,0 mg/l, lo que se traduce en valores de 250 a 2500 ng/ml para el dímero D. El precursor de fibrina, el fibrinógeno, está presente normalmente a una concentración de 1,5-4,0 g/l. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, la cantidad de agente de detención de formación de fibrina es de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,5%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,4%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,3%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,2%, o de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,1%, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,4%, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,3%, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,2%, por ejemplo, en peso de la muestra de sangre. La cantidad del agente de detención de formación de fibrina es aquella que es suficiente para reducir la formación de fibrina a no más de aproximadamente 0,5 mg/l, o no más de aproximadamente el 0,4% mg/l, o no más de aproximadamente el 0,3% mg/l, o no más de aproximadamente el 0,2% mg/l, o no más de aproximadamente el 0,1% mg/l, por ejemplo, de la muestra de sangre. En algunos ejemplos, el agente de detención de formación de fibrina se emplea en el medio de recogida como reactivo seco.

El medio de recogida también puede contener uno o más agentes adicionales tales como, pero sin limitarse a, CrCl_3 o MnCl_2 , dextrosa, glucosa, citrato, adenosín trifosfato, inosina, dihidroxiacetona, 2,3-difosfoglicerol, cloramfenicol, sulfato de neomicina, cloruro de magnesio, yodoacetamida, ascorbato de sodio, ácido acético, dimetilsulfóxido, sulfato de zinc, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, urea y derivados de urea, acetamida, formamida, hidantoína, alcoholes, ácido acético, ácido fórmico, oxidante deshidratado (osmio), efecto de protección de disolvente orgánico mediado por tampón de HEPES-ácido glutámico (HOPE) (Polysciences, Inc.), agentes de fijación de diimidoésteres que usan suberimidato de dimetilo (DMS), inhibidores de la transferrina de factores de crecimiento e inhibidores para la fosforilación y otras enzimas, por ejemplo. Estos agentes adicionales, si están presentes, están presentes en cantidades que logran sus respectivos fines previstos. En algunos ejemplos, el medio de recogida es un medio anticoagulante o una extracción sanguínea convencional.

La muestra de sangre también se combina con fibrina, de manera o bien simultánea o bien secuencial, con los otros agentes en el medio de recogida tal como se expuso anteriormente o después de que se extraiga la muestra de sangre en el medio de recogida. La fibrina (factor Ia) es una proteína fibrosa no globular formada a partir de fibrinógeno por la proteasa trombina y luego se polimeriza para formar un coágulo con plaquetas sobre el sitio de la herida. El fibrinógeno se sintetiza en el hígado y circula en plasma a de aproximadamente 200 mg/dl a aproximadamente 450 mg/dl. La fibrina es una glicoproteína dimérica que se compone de tres pares de cadenas peptídicas. Las dos subunidades se componen de un dominio D que comprende una región globular y un dominio E que comprende un enlace disulfuro que une las dos subunidades. La masa molecular del dímero soluble es: 340 kilodalton (kDa) (cadena α : 63,5 kDa, cadena β : 56 kDa, cadena γ : 47 kDa). La fibrina se glicosila con glicanos unidos a asparagina biantenaria de tipo complejo que varían en el grado de fucosilación del núcleo y los tipos de enlaces de ácido siálico y galactosa. La fibrina está disponible comercialmente de, por ejemplo, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO.

La fibrina añadida se emplea en una cantidad suficiente para provocar un nivel de aglutinación predeterminado de las células raras. La cantidad de fibrina y el nivel de aglutinación predeterminado de las células raras son dependientes de varios factores tales como, por ejemplo, el número de células en la muestra de sangre, la naturaleza de la muestra de sangre, el nivel de activación de plaquetas y el nivel de activación de la coagulación. La expresión "nivel de aglutinación" se refiere al porcentaje (%) de células con fibrina grande en la superficie. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el nivel de aglutinación predeterminado de las células raras es de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 100%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 60%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 40%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 30%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 20%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 8%, o de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 5%, o de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 10%, o de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 8%, por ejemplo, basándose en el área de la superficie externa de las células raras. En algunos ejemplos, el porcentaje de células que tienen fibrina grande en la superficie es no más de aproximadamente el 20%, o no más de aproximadamente el 15%, o no más de aproximadamente el 10% para controlar el nivel de aglutinación entre células. En algunos ejemplos, el porcentaje de células que tienen fibrina grande en la superficie debe estar en un intervalo de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 10%. La expresión "fibrina grande" se refiere al grado de formación de red por filamentos de fibrina que tienen un tamaño que es más grande que el tamaño de una célula en sí.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, la cantidad de fibrina añadida es de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, o de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 7,5 mg/l, o de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 5,0 mg/l, o de 0,2 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l, o de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l, o de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, o de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 7,5 mg/l, o de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 5,0 mg/l, o de 0,5 mg/l a aproximadamente 2,5 mg/l, o de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 1,0 mg/l, o de aproximadamente 1,0 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, o de aproximadamente 1,0 mg/l a aproximadamente 7,5 mg/l, o de aproximadamente 1,0 mg/l a aproximadamente 5,0 mg/l, o de 1,0 mg/l a

aproximadamente 2,5 mg/l, o de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 10 mg/l, o de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 7,5 mg/l, o de aproximadamente 2 mg/l a aproximadamente 5,0 mg/l, basándose en el volumen de la muestra de sangre. La fibrina se emplea como reactivo seco, por ejemplo, en el medio de recogida, o está presente en, por ejemplo, un medio acuoso.

En ejemplos según los principios descritos en el presente documento, la aglutinación entre células debe minimizarse. La expresión "aglutinación entre células" se refiere a células que están en contacto entre sí.

La muestra de sangre se mantiene en condiciones para la formación de fibrina en una superficie de las células raras para provocar un nivel de aglutinación predeterminado de las células raras. Estas condiciones incluyen mantener la muestra de sangre a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 4°C a aproximadamente 30°C, o de aproximadamente 4°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 4°C a aproximadamente 20°C, o de aproximadamente 4°C a aproximadamente 15°C, o de aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 20°C, o de aproximadamente 10°C a aproximadamente 15°C, por ejemplo. El periodo de tiempo es de aproximadamente 0 segundos a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días, o de aproximadamente 0 segundos a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 5 días, o de aproximadamente 0 segundos a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 día, o de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 1 día, por ejemplo.

El nivel de aglutinación de las células raras puede controlarse mediante la cantidad de fibrina añadida a la muestra de sangre. En algunos casos, puede ser necesario detener la aglutinación inducida por fibrina de las células raras de manera que se mantenga el nivel de aglutinación predeterminado de las células raras. En algunos ejemplos, la acción de la fibrina puede detenerse empleando una pareja de unión específica para la fibrina, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para la fibrina. Un anticuerpo para la fibrina puede referirse a un epítipo de la molécula de fibrina o a un epítipo de un fragmento de fibrina que resulta de la degradación de fibrina tal como, por ejemplo, el dímero D, que, tal como se mencionó anteriormente, es un fragmento de proteína o un producto de degradación de fibrina que resulta de la degradación de fibrina por fibrinólisis. Los anticuerpos específicos para la fibrina para su uso en la monitorización de la formación de fibrina pueden ser monoclonales o policlonales. Tales anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica tales como inmunización de un huésped y extracción de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonales) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de los mismos que codifican al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂ y Fab', por ejemplo. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

En algunos ejemplos, el anticuerpo puede comprender un marcador, cuya naturaleza es dependiente del formato de ensayo particular elegido para monitorizar la formación de fibrina. El marcador, que se comenta en más detalle a continuación en la descripción general de los ensayos, es cualquier molécula que produce o que puede producir una señal, y puede ser, por ejemplo, un agente que fluoresce, un radiomarcador, una enzima, un quimioluminiscente o un fotosensibilizador. Por tanto, la señal se detecta y/o se mide detectando la actividad enzimática, la luminiscencia, la absorbancia de luz o la radiactividad, dependiendo de la naturaleza del marcador. El marcador puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, fluorescentes, pueden absorber luz ultravioleta y visible, cuando la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. A continuación, esta energía absorbida se disipa mediante la emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y tintes. En algunos ejemplos, el marcador forma parte de un sistema que produce señales, que puede incluir componentes distintos del marcador para generar una señal junto con el marcador. En algunos ejemplos, el anticuerpo marcado tinte la fibrina.

Después de la adición del anticuerpo para la fibrina, la muestra de sangre tratada se mantiene en condiciones para

la unión del anticuerpo a la fibrina. Estas condiciones incluyen mantener la mezcla fibrina-anticuerpo y la muestra de sangre a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 38°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 25°C a aproximadamente 35°C, o de aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C, durante un periodo de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, por ejemplo.

Tras el tratamiento de la muestra de sangre con la fibrina y otros agentes tal como se describió anteriormente, la muestra de sangre se pone en contacto con una matriz porosa de manera que las células raras aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa y las células no raras pasan a través de la matriz porosa. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, la muestra de sangre tratada se diluye con un medio de dilución antes de ponerse en contacto con la matriz porosa. En algunos ejemplos, el medio de dilución es un medio acuoso, que puede estar tamponado. El pH para un medio tamponado acuoso es habitualmente un pH moderado. En algunos ejemplos, el pH del medio de dilución es de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, o pH fisiológico, por ejemplo. Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante cualquier periodo de incubación. Los tampones ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, borato, fosfato (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINE, por ejemplo.

El medio de dilución también puede comprender un agente de lisis para la lisis de células. Un agente de lisis es un compuesto o una mezcla de compuestos que altera la integridad de las membranas de células, liberando de ese modo los contenidos intracelulares de las células. Los ejemplos de agentes de lisis incluyen, pero no se limitan a, detergentes no iónicos, detergentes aniónicos, detergentes anfóteros, disoluciones acuosas de fuerza iónica baja (disoluciones hipotónicas), agentes bacterianos, aldehídos alifáticos y anticuerpos que provocan la lisis dependiente del complemento, por ejemplo. Pueden estar presentes diversos materiales auxiliares en el medio de dilución. Todos los materiales en el medio de dilución están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr la función o el efecto deseado.

La cantidad de medio de dilución combinado con la muestra de sangre es dependiente de uno o más de varios factores tales como, por ejemplo, la naturaleza de la matriz porosa, la naturaleza de la muestra de sangre y la naturaleza de las células raras. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, la cantidad de medio de dilución es de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 100 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 80 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 60 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 50 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 30 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 20 ml, o de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 10 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 100 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 80 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 60 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 30 ml, o de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 20 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 100 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 80 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 60 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 50 ml, o de aproximadamente 20 ml a aproximadamente 30 ml, por ejemplo, basándose en 10 ml de la muestra de sangre.

La matriz porosa es un material sólido o semisólido y puede estar compuesto por un material insoluble en agua orgánico o inorgánico. La matriz porosa puede tener un número cualquiera de formas tales como, por ejemplo, tubular (por ejemplo, fibra hueca, enrollada en espiral y fibra fina hueca), superficie grabada o plana o superficie aplanada (por ejemplo, tira, disco, película, membrana y placa). La matriz puede fabricarse de una amplia variedad de materiales, que pueden ser sintéticos o que se producen de manera natural, poliméricos o no poliméricos, fibrosos o no fibrosos. Los ejemplos, a modo de ilustración y no de limitación, de tales materiales para fabricar una matriz porosa incluyen celulosa (incluyendo papel), nitrocelulosa, acetato de celulosa, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(etilentereftalato), nailon y poli(butirato de vinilo), material cerámico, material metálico, por ejemplo, o bien usados por sí mismos o bien junto con ellos mismos y/o con otros materiales.

El tamaño de los poros de la matriz porosa es aquel que es suficiente para mantener preferentemente las células raras aglutinadas mientras que permiten el paso de otras células incluyendo células no raras a través de los poros según los principios descritos en el presente documento. El tamaño de los poros de la matriz porosa es dependiente de la naturaleza y el tamaño de las células raras y las células no raras, la naturaleza y el tamaño de las células raras aglutinadas, la presión aplicada a la muestra de sangre, por ejemplo. En algunos ejemplos, el tamaño promedio de los poros de la matriz porosa es de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 100 µm, o de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 75 µm, o de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 50 µm, o de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 20 µm, o de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 10 µm, o de aproximadamente

5 μm a aproximadamente 100 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 75 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 50 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 20 μm , o de aproximadamente 5 μm a aproximadamente 10 μm , por ejemplo. La densidad de poros en la matriz porosa es de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70%, por ejemplo.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, se aplica presión a la muestra de sangre en la matriz porosa para facilitar el paso de células no raras a través de la membrana. El término "presión" se refiere a diferencias de presión de la presión atmosférica normal y puede ser o bien presión positiva (aumento en presión con respecto a la presión atmosférica normal) o bien presión negativa (vacío) (disminución en presión con respecto a la presión atmosférica normal). El nivel de presión aplicada es dependiente de uno o más de la naturaleza y el tamaño de las células no raras, la naturaleza y el tamaño de las células raras aglutinadas, la naturaleza de la matriz porosa y el tamaño de los poros de la matriz porosa, por ejemplo. En algunos ejemplos, el nivel de presión positiva aplicada es de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 500 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 400 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 300 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 200 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 100 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 50 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 25 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 20 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 15 milibar, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 30 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 25 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 20 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 15 milibar, o de aproximadamente 5 milibar a aproximadamente 10 milibar, por ejemplo. El nivel de presión negativa (vacío) aplicada es el negativo de los intervalos anteriores.

En algunos ejemplos, la presión aplicada a la muestra de sangre en la matriz porosa es una presión oscilante, lo que significa que la presión se aplica de manera intermitente a intervalos regulares o irregulares, que pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 250 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 100 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 50 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 250 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 100 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 50 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 250 segundos, por ejemplo. En este enfoque, la presión oscila entre aproximadamente 0 milibar y aproximadamente 10 milibar, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 10 milibar, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 7,5 milibar, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 5,0 milibar, o entre aproximadamente 1 milibar y aproximadamente 2,5 milibar, por ejemplo, durante parte o toda la aplicación de presión a la muestra de sangre. La presión oscilante se logra usando un interruptor de encendido/apagado, por ejemplo, y puede realizarse de manera automática o manual. Se permiten altas caídas de presión dependiendo de uno o más de volumen de reserva, volumen de muestra y velocidad de filtración.

El contacto de la muestra de sangre con la matriz porosa se continúa durante un periodo de tiempo suficiente para lograr un enriquecimiento de las células raras con respecto a las células no raras en la matriz porosa. El periodo de tiempo es dependiente de uno o más de la naturaleza y el tamaño de las células no raras, la naturaleza y el tamaño de las células raras aglutinadas, la naturaleza de la matriz porosa, el tamaño de los poros de la matriz porosa, el nivel de presión aplicada a la muestra de sangre en la matriz porosa, el volumen que va a filtrarse, el área superficial del filtro, por ejemplo. En algunos ejemplos, el periodo de contacto es de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 45 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, por ejemplo.

Puede emplearse un número cualquiera de técnicas de filtración para llevar a cabo el contacto de la muestra de sangre con una matriz porosa. Tales técnicas de filtración incluyen, pero no se limitan a, microfiltración, ultrafiltración o filtración de flujo cruzado, por ejemplo. En general, la matriz porosa forma parte de un módulo de filtración en el que la matriz porosa forma parte de un conjunto para su uso conveniente durante la filtración.

Los métodos según los principios descritos en el presente documento logran un aumento en la razón de células raras con respecto a células no raras en una muestra de sangre que se sospecha que contiene células raras y células no raras de al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 20 veces, o al menos

aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 75 veces, o al menos aproximadamente 100 veces sobre la razón de las células raras con respecto a las células no raras en la muestra de sangre original. En algunos ejemplos, el aumento de la razón de células raras con respecto a células no raras logrado en métodos según los principios descritos en el presente documento es de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 200 veces, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 150 veces, o de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 25 veces a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 50 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo.

Descripción general de técnicas de ensayo para la identificación de células

Puede emplearse cualquier ensayo adecuado para determinar la identidad de una célula. Los ensayos se llevan a cabo combinando las células aisladas mediante métodos según los principios descritos en el presente documento con reactivos para identificar las células, que incluyen un agente de identificación, es decir, un agente que reconoce o se une de manera específica a un antígeno asociado con una célula. La naturaleza de los reactivos es dependiente del tipo de ensayo particular que va a realizarse. En general, el ensayo es un método para la determinación de la identidad de una célula. El ensayo puede ser un ensayo inmunitario o un ensayo no inmunitario. Se comentan a continuación diversos métodos de ensayo a modo de ilustración y no de limitación.

En muchas realizaciones, los reactivos comprenden, como agente de identificación, al menos un anticuerpo específico para un antígeno en la célula que es característico de la célula, es decir, se sabe que el antígeno se asocia con la célula particular en cuestión. Este ensayo se denomina generalmente ensayo inmunitario ya que se distingue de ensayos que no utilizan un anticuerpo, que se denominan ensayo no inmunitario. Mediante la expresión "anticuerpo para un antígeno" quiere decirse un anticuerpo que se une específicamente al antígeno y que no se une en ningún grado significativo a otras sustancias que alterarían el análisis para el antígeno particular.

Los anticuerpos específicos para un antígeno para su uso en ensayos inmunitarios para identificar células pueden ser monoclonales o policlonales. Tales anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica tales como inmunización de un huésped y extracción de sueros (policlonales) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonales) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de los mismos que codifican al menos para las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales.

Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂ y Fab', por ejemplo. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión para una molécula particular.

Se incluyen otros reactivos en el medio de ensayo dependiendo de la naturaleza del ensayo que va a realizarse. Tales ensayos implican normalmente reacciones entre parejas de unión tales como un antígeno (proteína) en una célula y un anticuerpo correspondiente o la unión entre un anticuerpo y una pareja de unión correspondiente tal como un segundo anticuerpo que se une al primer anticuerpo. El anticuerpo y el antígeno son miembros de un par de unión específico ("miembro sbp"), que es una de dos moléculas diferentes, que tiene un área en la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a y, por tanto, se define como complementario con una organización espacial y polar particular de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico serán normalmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo y hapteno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específicos incluyen, por ejemplo, biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácidos nucleicos, IgG-proteína A y pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN.

Tal como se comentó anteriormente, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes entre sí cuando se compara con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas. En muchas realizaciones de ensayos, las parejas de unión preferidas son anticuerpos y los ensayos se denominan ensayos inmunitarios.

Los ensayos inmunitarios pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los ensayos inmunitarios que implican reactivos no marcados comprenden normalmente la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y de aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los ensayos inmunitarios marcados incluyen ensayos inmunitarios de enzimas, ensayos inmunitarios marcados con fluorescencia, ensayos inmunitarios de polarización fluorescente, ensayo radioinmunitario, ensayo de inhibición, luminiscencia inducida y ensayo de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

Los ensayos pueden realizarse o bien sin separación (homogéneos) o bien con separación (heterogéneos) de

cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los ensayos inmunitarios homogéneos incluyen, pero no se limitan a, técnicas de inmunocitoquímica, la prueba de anticuerpo fluorescente directo o la prueba de inmunofluorescencia directa, ensayos inmunitarios de enzimas homogéneos incluyendo el ensayo EMIT® ensayo dado a conocer en la patente estadounidense n.º 3.817.837; métodos de inmunofluorescencia tales como los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 3.996.345; ensayos inmunitarios de canalización de enzimas tales como los dados a conocer en la patente estadounidense n.º 4.233.402; y el ensayo inmunitario de polarización fluorescente tal como se da a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.354.693; por ejemplo.

Otros ensayos inmunitarios de enzimas incluyen el ensayo inmunitario mediado por modulación enzimática; el ensayo inmunitario de fluorescencia con el sustrato marcado; los ensayos inmunitarios combinados de donantes de enzimas; ensayos inmunitarios homogéneos con partículas marcadas tales como ensayos inmunitarios de inhibición turbidimétricos potenciados por partículas y el ensayo inmunitario turbidimétrico potenciado por partículas; por ejemplo. Otros ensayos incluyen el ensayo inmunitario de partículas de sol; el ensayo inmunitario de tinte disperso; el metaloinmunoensayo; los ensayos inmunitarios de membrana enzimática; ensayos luminoinmunitarios; ensayos inmunitarios de marcado con éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como fase sólida; por ejemplo. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que implican la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de una superficie inmovilizada con anticuerpos tras la unión de un fármaco hidrófobo. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores de transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos, ensayos de electrodo amperométricos, y similares.

En muchos de los ensayos comentados en el presente documento para la determinación de un antígeno celular, se emplea un marcador; el marcador forma parte normalmente de un sistema de producción de señales ("sps"). La naturaleza del marcador es dependiente del formato de ensayo particular. Un sistema de producción de señales normalmente incluye uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador detectable, que genera una señal detectable que se refiere a la cantidad de marcador unido y/o no unido, es decir la cantidad de marcador unido o no unido al analito que va a detectarse o a un agente que refleja la cantidad del analito que va a detectarse. El marcador es cualquier molécula que produce o que puede inducirse para producir una señal, y puede ser, por ejemplo, un agente que fluoresce, un radiomarcador, una enzima, un quimioluminiscente o un fotosensibilizador. Por tanto, la señal se detecta y/o se mide detectando la actividad enzimática, la luminiscencia, la absorbancia de luz o la radiactividad, dependiendo de la naturaleza del marcador.

Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, tintes; fluorescentes, tales como fluoresceína, isotiocianato, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina; enzimas tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), β -galactosidasa y peroxidasa del rábano picante; ribozima; un sustrato para una replicasa tal como replicasa QB; promotores; complejos tales como los preparados a partir de CdSe y ZnS presentes en nanocristales semiconductores conocidos como puntos cuánticos; quimioluminiscentes tales como isoluminol y ésteres de acridinio, por ejemplo; sensibilizadores; coenzimas; sustratos de enzimas; radiomarcadores tales como ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H , ^{57}Co y ^{75}Se ; partículas tales como partículas de látex, partículas de carbono, partículas metálicas incluyendo partículas magnéticas, por ejemplo, partículas de dióxido de cromo (CrO_2), y similares; sol metálico; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse adicionalmente con un tinte, un catalizador u otro grupo detectable.

El marcador puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, fluorescentes, pueden absorber luz ultravioleta y visible, cuando la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. A continuación, esta energía absorbida se disipa mediante la emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y tintes.

Alternativamente, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señales incluiría, por tanto, todos los componentes necesarios para producir una señal medible. Tales otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias que generan señales. Una descripción detallada de sistemas de producción de señales adecuados puede encontrarse en la patente estadounidense n.º 5.185.243, columnas 11-13.

El marcador u otros miembros de sps pueden unirse a un soporte o unirse a una molécula tal como una célula que se dispone sobre un soporte. Las células pueden unirse a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, siempre que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de un antígeno en la célula para unirse con un anticuerpo. En algunas realizaciones, las células pueden recubrirse o unirse de manera covalente directamente al soporte sólido. También pueden usarse grupos de unión para acoplar de manera covalente el soporte sólido y las células. También son posibles otros métodos de unión de las células. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un aglutinante para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o un anticuerpo, y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede unirse a las células o

viceversa. La unión de los componentes a la superficie de un soporte puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente, y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía.

El soporte puede estar compuesto por un material insoluble en agua, orgánico o inorgánico, sólido o fluido, que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener un número cualquiera de formas, tales como partícula, incluyendo perla, película, membrana, tubo, cavidad, tira, bastón, superficies planas (tales como, por ejemplo, lámina, placa y platina), y fibra, por ejemplo. Dependiendo del tipo de ensayo, el soporte puede o no suspenderse en el medio en el que se emplea. Los ejemplos de soportes que pueden suspenderse son materiales poliméricos tales como látex; bicapas lipídicas o liposomas; gotas de aceite, y soportes metálicos tales como, por ejemplo, partículas magnéticas; por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(etilentereftalato), nailon y poli(butirato de vinilo), usados o bien por sí mismos o bien junto con otros materiales.

El marcador y/u otros miembros de sps pueden unirse a un miembro de sbp u otra molécula. Por ejemplo, el marcador puede unirse de manera covalente a un miembro de sbp tal como, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor para un anticuerpo, o un receptor que puede unirse a una molécula pequeña conjugada a un anticuerpo. El enlace del marcador al miembro de sbp puede lograrse mediante reacciones químicas que dan como resultado el reemplazo de un átomo de hidrógeno del marcador por un enlace al miembro de sbp o pueden incluir un grupo de unión entre el marcador y el miembro de sbp. Otros miembros de sps también pueden unirse de manera covalente a miembros de sbp. Por ejemplo, dos miembros de sps tales como un agente que fluoresce y un extintor pueden unirse cada uno a un anticuerpo diferente que forma un complejo específico con el analito. La formación del complejo aproxima el agente que fluoresce y el extintor, permitiendo de ese modo que el extintor interaccione con el agente que fluoresce para producir una señal.

Los ensayos comentados anteriormente se llevan a cabo normalmente en un medio tamponado acuoso a un pH moderado, que generalmente proporciona sensibilidad óptima de ensayo. El pH para el medio de ensayo estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5. El pH será normalmente un compromiso entre unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específico y el pH óptimo para los otros reactivos del ensayo tales como los miembros de un sistema de producción de señales, por ejemplo. Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el periodo de incubación. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINE, y similares. Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de tampones y conservantes, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como albúminas; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; y potenciadores de unión, por ejemplo. Todos los materiales anteriores están presentes en una concentración o cantidad suficiente para lograr la función o el efecto deseado.

Puede aplicarse uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre adiciones de diversos reactivos mencionados anteriormente. El medio se incuba normalmente a una temperatura y durante un tiempo suficientes para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos. Se emplean normalmente temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y normalmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 99°C o entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 70°C, o entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 45°C, por ejemplo. El periodo de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. El periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos. Las temperaturas durante las mediciones oscilarán generalmente entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 50°C o entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 40°C.

La concentración de antígeno que puede someterse a ensayo varía generalmente desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, o desde aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-14} M. Consideraciones, tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad de analito de fármaco eritrocitófilo presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración del analito determinan normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán generalmente mediante el intervalo de concentración de interés del antígeno, la naturaleza del ensayo, la afinidad y la avidéz del anticuerpo y la fragmentación del anticuerpo, por ejemplo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos se determina normalmente de manera empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo sobre el intervalo. Consideraciones tales como la naturaleza de un sistema de producción de señales y la naturaleza del analito determinan normalmente las concentraciones de los diversos reactivos.

Mientras que el orden de adición puede variarse ampliamente, habrá determinadas preferencias dependiendo de la naturaleza del ensayo. El orden de adición más simple es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, los reactivos pueden combinarse de manera secuencial. Opcionalmente, puede estar involucrada una etapa de incubación posterior a cada adición tal como se comentó anteriormente. La duración del periodo de incubación es aquella que es suficiente para lograr la función deseada.

Realizaciones específicas de ensayos para la identificación celular

Se comentan a continuación realizaciones específicas de ensayos que pueden emplearse para identificar células en una preparación de células enriquecida según los principios descritos en el presente documento a modo de ilustración y no de limitación.

En un ejemplo, se emplea una técnica de inmunocitoquímica para determinar si está presente o no uno o más antígenos específicos para células raras de interés respectivas en las células raras preparadas según los principios descritos en el presente documento. La preparación de células raras se coloca en un soporte sólido, que puede ser, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio. La preparación de células raras puede retirarse de una membrana de filtro, por ejemplo, y colocarse en un soporte sólido para su examen o la propia membrana de filtro puede colocarse en el soporte sólido. La preparación de células raras puede tratarse para fijar las células y/o para permeabilizar las células, si se desea.

La fijación de las células raras inmoviliza las células y conserva la estructura celular y mantiene a las células en una condición que se parece mucho a las células en una condición similar a *in vivo* y una en la que los antígenos de interés pueden reconocerse mediante un anticuerpo específico. La cantidad de fijador empleado es aquella que conserva las células, pero no conduce a resultados erróneos en un ensayo posterior. La cantidad de fijador depende de uno o más de la naturaleza del fijador y la naturaleza de las células raras, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad de fijador es de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,15%, o de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 0,10%, o de aproximadamente el 0,10% a aproximadamente el 0,15%, por ejemplo, en volumen de la muestra de sangre. Los agentes para llevar a cabo la fijación de las células raras incluyen, pero no se limitan a, agentes de reticulación tales como, por ejemplo, un reactivo de aldehído (tal como, por ejemplo, formaldehído, glutaraldehído y paraformaldehído); un alcohol (tal como, por ejemplo, alcoholes C1-C5 tales como metanol, etanol e isopropanol); una cetona (tal como una cetona C3-C5 tal como acetona); por ejemplo. Las designaciones C1-C5 o C3-C5 se refieren al número de átomos de carbono en el alcohol o la cetona. Pueden llevarse a cabo una o más etapas de lavado en las células fijadas usando un medio acuoso tamponado.

Si es necesario después de la fijación, la preparación de células raras también se somete a permeabilización. En algunos casos, un agente de fijación tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol) o una cetona (por ejemplo, acetona) también da como resultado la permeabilización y no es necesaria una etapa de permeabilización adicional. La permeabilización proporciona acceso a través de la membrana celular a antígenos de interés. La cantidad de agente de permeabilización empleado es aquella que altera la membrana celular y permite el acceso a los antígenos. La cantidad de agente de permeabilización depende de uno o más de la naturaleza del agente de permeabilización y la naturaleza y cantidad de las células raras, por ejemplo. En algunos ejemplos, la cantidad de agente de permeabilización es de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,4%, o de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,3%, o aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,2%, o de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 0,5%, o aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 0,4%, o de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 0,3%, por ejemplo. Los agentes para llevar a cabo la permeabilización de las células raras incluyen, pero no se limitan a, un alcohol (tal como, por ejemplo, alcoholes C1-C5 tales como metanol y etanol); una cetona (tal como una cetona C3-C5 tal como acetona); un detergente (tal como, por ejemplo, saponina, TRITON® X-100 y TWEEN®-20); por ejemplo. Pueden llevarse a cabo una o más etapas de lavado en las células permeabilizadas usando un medio acuoso tamponado.

En la técnica de inmunocitoquímica, se emplea un anticuerpo marcado específico para un antígeno en una célula rara para cada presunta célula rara diferente en la preparación de células raras obtenida según los principios descritos en el presente documento. Los marcadores son marcadores fluorescentes y se emplea un marcador fluorescente diferente para cada célula rara diferente de manera que pueden emplearse múltiples anticuerpos marcados por agente que fluoresce en cualquier ensayo realizado en una preparación de células raras aislada obtenida según los principios descritos en el presente documento.

Tras la fijación y la permeabilizada, la preparación de células raras se pone en contacto con un medio acuoso que contiene uno o más anticuerpos marcados tal como se describió anteriormente. El medio acuoso puede ser un medio de ensayo tal como se describió anteriormente y la cantidad de cada anticuerpo marcado es aquella que es suficiente para identificar cada una de las células raras en la preparación de células raras. En algunos ejemplos, la cantidad de cada anticuerpo marcado está en exceso de la presunta cantidad de las células raras en la preparación de células raras. Las células raras se incuban con los anticuerpos marcados en condiciones que permiten la unión

de los anticuerpos marcados a sus respectivos antígenos. Tales condiciones se comentan anteriormente con respecto a los ensayos en general. Tras la incubación, la preparación de células raras se somete a una o más etapas de lavado usando un medio tamponado acuoso para retirar los anticuerpos marcados no unidos.

Se emplea un tinte de ADN fluorescente tal como, por ejemplo, 4',6-diamidino-2-fenilindol, yoduro de propidio, bromuro de etidio, SYBR® Green I, VISTRA™ GREEN, SYTO® GREEN, SYBR® Gold, YO-PRO-1™, TOTO-3™, TO-PRO-3™, NUCLEAR-ID™ Red o tinte Hoechst, para potenciar el contraste en la imagen de la preparación de células raras durante el examen microscópico. Tras la tinción, pueden llevarse a cabo una o más etapas de lavado en las células usando un medio acuoso tamponado. A continuación, las células se examinan usando un microscopio fluorescente y se usa cada uno de los diferentes marcadores fluorescentes en la detección directa de una célula rara respectiva en la preparación de células raras.

Alternativamente, en el procedimiento anterior pueden emplearse anticuerpos no marcados y los respectivos anticuerpos se detectan indirectamente empleando un miembro de unión específica para cada uno de los respectivos anticuerpos en los que los diferentes miembros de unión específica se marcan con un marcador fluorescente respectivo o un marcador enzimático respectivo (tal como, por ejemplo, antioxidante específico de tiol (enzima TSA)), por ejemplo. Los marcadores respectivos de los miembros de unión específica se detectan mediante medios apropiados. Los miembros de unión específica pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para cada uno de los respectivos anticuerpos no marcados usados para la unión a un antígeno respectivo de una célula rara.

Kits para realizar ensayos en preparaciones de células raras

Los reactivos para realizar un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar de manera conveniente un ensayo para la determinación de uno o más tipos de células raras. En una realización, un kit comprende en una combinación envasada un agente de detención de formación de fibrina para detener la formación de fibrina según los principios descritos en el presente documento. El kit también puede comprender uno o más anticuerpos marcados o no marcados específicos para un antígeno que es característico de una célula rara particular que puede estar presente en una muestra que va a someterse a prueba. Cuando se emplean anticuerpos no marcados, el kit también puede contener uno o más miembros de pares de unión específica marcados para cada uno de los respectivos anticuerpos no marcados. También pueden incluirse en el kit otros reactivos para realizar un ensayo, dependiendo la naturaleza de tales reactivos del formato de ensayo particular que va a emplearse. Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir adicionalmente otros reactivos envasados por separado para realizar un ensayo tal como miembros de pares de unión específica adicionales, reactivos auxiliares tales como un sustrato enzimático auxiliar, aglutinantes, recipientes para la recogida de muestras y soportes para células tales como, por ejemplo, portaobjetos de microscopio, para realizar un análisis, por ejemplo.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits puede variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que necesitan producirse durante los presentes métodos y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancia apropiadas, pueden proporcionarse uno o más de los reactivos en el kit como polvo seco, habitualmente liofilizado, que incluye excipientes, que en disolución proporcionará una disolución de reactivos que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo. El kit puede incluir adicionalmente una descripción escrita de un método que utiliza reactivos según los principios descritos en el presente documento.

La expresión "al menos" tal como se usa en el presente documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual a o mayor que el número indicado. La expresión "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento significa que el número indicado puede diferir en más o menos el 10%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación, y se pretende que describan y no que limiten el alcance de la invención. Las partes y los porcentajes dados a conocer en el presente documento son en volumen a menos que se indique lo contrario.

Ejemplos

Todas las sustancias químicas pueden adquirirse de la empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a menos que se indique lo contrario.

Abreviaturas:

K₃EDTA = sal de potasio de etilendiaminotetraacetato

WBC = glóbulos blancos

RBC = glóbulos rojos

FITC = isotiocianato de fluoresceína

5 DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol

DABCO= 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

min = minuto(s)

10 μm = micrómetro(s)

ml = mililitro(s)

15 mg = miligramo(s)

μg = microgramo(s)

20 PBS = solución salina tamponada con fosfato (Na_2HPO_4 3,2 mM, KH_2PO_4 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, pH 7,4)

mbar = milibar

TA = temperatura ambiente

25 Se prepararon muestras de sangre completa para someterse a prueba mediante la extracción de sangre de sujetos normales que carecían de cualesquiera células raras debido a enfermedad. Las muestras de sangre (7-10 ml) se recogieron en tubos VACUTAINER® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) que contenían K_3EDTA . Los WBC eran aproximadamente 10^7 por 10 ml sangre y los RBC eran aproximadamente 5×10^{10} por 10 ml de
30 sangre. Se añadieron células raras cultivadas, que eran o bien células cancerosas, células endoteliales o bien células epiteliales cultivadas (ATCC Manassas, VA), a las muestras de sangre a un nivel de 10 células por 10 ml de muestra de sangre. Por tanto, antes de la filtración, la razón de células raras con respecto a todas las células normales era del 0,00000002% y la razón de células raras con respecto a WBC era del 0,00001%. Se añadió fibrina a de 0,2 a 10 mg/l a algunas muestras según los principios descritos en el presente documento. En algunas
35 muestras, se añadió paraformaldehído adicional al 0,05% en volumen de la muestra de sangre.

En un plazo de un día después del almacenamiento a 25°C, las muestras de sangre se filtraron a través de una membrana que tenía un tamaño de poro promedio de 8 μm según un método dado a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0315664. Durante la filtración, la muestra en la membrana se sometió a
40 mbar negativos, es decir, una disminución mayor de aproximadamente -30 mbar de la presión atmosférica. El vacío aplicado varía desde 1 hasta -30 mbar a medida que se reduce el volumen de la muestra durante la filtración. Se permiten altas caídas de presión dependiendo del depósito y el volumen de muestra y la velocidad de filtración. Justo antes de la filtración, se transfirió una muestra (7-10 ml) a un tubo Falcon de 50 ml, que se llenó hasta 20 ml con PBS frío. Los tubos Falcon se volcaron manualmente dos veces y se sometieron a centrifugación durante 10
45 min, a 400 x g a 20°C. La muestra diluida se colocó en la estación de filtración sin mezclar y la muestra diluida se filtró a través de la membrana. Tras la filtración, la membrana se lavó con PBS, y la muestra se fijó con formaldehído, se lavó con PBS, se sometió a permeabilización usando TRITON® X100 al 0,2% en PBS y se lavó de nuevo con PBS.

50 Las células capturadas en la membrana se detectaron con un procedimiento de inmunocitoquímica (ICC) basándose en la unión de anticuerpos específicos para proteínas o antígenos específicos en células. Se dispuso un tampón de bloqueo de caseína al 10% en PBS en la membrana. Después de un periodo de incubación de 5 min, la membrana se lavó con PBS para bloquear la unión no específica a la membrana. A continuación, se dispuso una mezcla de conjugados de anticuerpos a la membrana seguido por un periodo de incubación de 20 min a TA. La mezcla de
55 conjugados de anticuerpo (en caseína al 10% en PBS) incluía el anticuerpo anti-fibrina (reactivo con el dímero D) conjugado a FITC a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, anticuerpo anti-células cancerosas (reactivo con CK8/18) conjugado a Dy550 a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y anticuerpo anti-CD45 (usados para WBC) conjugado a Dy650 a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La mezcla de conjugados de anticuerpo puede incluir anticuerpo anti-células endoteliales (reactivo con CT105) conjugado a Dy550 o anticuerpo anti-células epiteliales (reactivo con EPCAM) conjugado a Dy550 a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en lugar del anticuerpo anti-células cancerosas (reactivo con CK8/18) conjugado a Dy550. El anticuerpo no unido se retiró por lavado (PBS + TWEEN®
60 20 al 0,05%) y DAPI (0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS), se añadió un tinte de ADN fluorescente para teñir los núcleos de las células. Se realizó una última etapa de lavado con PBS, seguido por medios de cobertura para ayudar a conservar la intensidad fluorescente de las sondas. Los portaobjetos se realizaron con DABCO como medio cubreobjetos (0,25 g de DABCO para 9 ml de glicerol y 1 ml de 10 x PBS).

65

A continuación, los portaobjetos de colocaron en un soporte de portaobjetos de un microscopio fluorescente (Leica DM5000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania)), en el que las imágenes se capturaron durante la exploración automatizada de la membrana para cada una de las sondas fluorescentes usadas para la detección de células seleccionadas como diana. Los conjugados de anticuerpos se unieron a la proteína o el antígeno de una célula, y los marcadores fluorescentes se detectaron usando un microscopio fluorescente con excitación, emisión y filtros de valor de corte específicos para cada marcador. Se usan múltiples marcadores fluorescentes, cada uno con un anticuerpo específico diferente, para detectar múltiples antígenos o proteínas en las células aisladas.

A continuación, las células se caracterizaron explorando la membrana mediante microscopía de fluorescencia realizada con un dispositivo Leica DM5000 usando los conjuntos de filtros para marcadores fluoróforos respectivos usados en los conjugados de anticuerpos anteriores, concretamente, FITC, Dylight 550 (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA), Dylight 650 (ThermoFisher Scientific, Inc.) o DAPI. El enriquecimiento de células raras logrado se midió contando las células raras (positivas a o bien CK o bien CD105 o bien EpCAM) y comparando con el recuento de las células normales restantes en la membrana. Los RBC o bien se lisaron o bien se hicieron pasar a través de la membrana; todas las células normales eran WBC (positivas a CD45).

Los resultados para seis tipos de muestra se resumen a continuación en la tabla 1. Los resultados se clasifican como sangre completa con y sin paraformaldehído químico como agente de detención de formación de fibrina y sangre completa sin fibrina añadida (no según los principios descritos en el presente documento) y con fibrina adicional (según los principios descritos en el presente documento) para llegar a una cantidad entre 0,2 mg/l y aproximadamente 10 mg/l. Se midió la razón de enriquecimiento, el porcentaje de agregados de células con fibrina grande en su superficie y el porcentaje de células aglutinadas a otras células.

Tabla 1

Tipo de muestra	Fibrina añadida	Paraformaldehído (%)	% de células con fibrina en la superficie	Razón de enriquecimiento raras/normales
1	0	0,05	0,3	0,0020
2	0	0,05	1,4	0,0050
3	0,2	0,05	2,5	0,0140
4	0,2	0	5,3	0,1001
5	2,0	0,05	8,2	0,1818
6	10	0,05	32,4	0,0769

Con referencia a la figura 1, para el tipo de muestra 3, se observaron agregados de fibrina grande y husillos de fibrina pequeña en la membrana después de la filtración de sangre completa con células cancerosas cultivadas. Los resultados muestran una cobertura con fibrina aumentada de células y muestran células cancerosas (flecha) que están atrapadas en la fibrina según los principios descritos en el presente documento. La figura 2 representa resultados que no son según los principios descritos en el presente documento, pero se presentan con fines de comparación; en este ejemplo, no se añadió fibrina.

Los resultados anteriores demuestran que la eficacia de separación dependía de la cantidad de fibrina añadida. Para los tipos de muestra 1 y 2, la razón de enriquecimiento mostró un aumento desde el 0,0020% hasta el 0,0050% con un cambio en el porcentaje de células con fibrina en la superficie celular de desde el 0,3% hasta el 1,4%. Los tipos de muestra 1 y 2 tuvieron menos del 1,4% de fibrina detectada en las células y el enriquecimiento más bajo de células raras/WBC de $\leq 0,005$. Si bien se mejoró en una razón células raras/WBC del 0,000009% antes de cualquier separación, esta razón estaba por debajo de la razón de enriquecimiento $\geq 0,01\%$ deseada encontrada cuando se añadió fibrina según los principios descritos en el presente documento. Los tipos de muestra 1 y 2 representan extracciones de diferentes pacientes, que tienen variaciones en fibrina. El tipo de muestra 1 representa un paciente normal (80% de los pacientes). El tipo de muestra 2 es de un paciente con formación continua de fibrina antes de la extracción de sangre. Las diferencias en formación de fibrina para estos dos tipos de paciente demuestran el problema que se origina si la fibrina endógena (es decir, fibrina que se forma a partir de componentes endógenos de la cascada de coagulación de sangre) no se detiene y no se añade fibrina. Los tipos de muestra 1 y 2 también muestran que el nivel de fibrina endógena típico está por debajo de 0,2 mg/l.

La adición de 0,2 mg/l de fibrina a el tipo de muestra 3 permitió el 2,5% de células con fibrina y una razón de enriquecimiento significativamente mejorada del 0,0140%. La razón de enriquecimiento aumentó adicionalmente hasta el 0,1818% con la adición de 2 mg/l de fibrina en el tipo de muestra 5. La razón de enriquecimiento disminuyó hasta el 0,0769% con la adición de 10 mg/l de fibrina a la muestra de sangre tal como se muestra en el tipo de muestra 6, que mostró una ligera aglutinación entre células. Los tipos de muestra 3-5 mostraron menos aglutinación entre células. Por tanto, dentro del intervalo de fibrina añadida de 0,2 mg/l a 10 mg/l, la razón de enriquecimiento se potenció significativamente a la vez que se minimiza la aglutinación entre células.

Para los tipos de muestra 3-5 en los que el contenido de fibrina añadida es de 0,2 mg/l a 2,0 mg/l y $>2,5\%$ de las

- 5 células estaban cubiertas con fibrina grande, los agregados de células con fibrina son demasiado grandes ($>50\text{ }\mu\text{m}$) para pasar a través de poros de tamaño micrométrico. Tal como se representa en la figura 1, se observaron pequeñas espinas de fibrina ($1\text{-}10\text{ }\mu\text{m}$) a un aumento mayor en la mayoría de células raras. Por tanto, la filtración de células con fibrina $>2,0\text{ mg/l}$ era independiente del tamaño de poro y la deformación celular. Los poros de una membrana pueden ser más grandes que el diámetro promedio de una célula cancerosa y las células con fibrina grande en la superficie a niveles según los principios descritos en el presente documento no pasarán a través de la membrana y se retienen en su superficie mientras que otras células pasan a través, dando como resultado de ese modo el enriquecimiento de la razón de células raras con respecto a células no raras.
- 10 Los experimentos anteriores demuestran que los métodos de filtración de células raras en sangre completa preparada según los principios descritos en el presente documento no aíslan células raras individuales sino agregados de células raras y fibrina, y que el contenido de fibrina es un factor importante para lograr los enriquecimientos deseados. Dado que la coagulación es un proceso natural, se produce algún grado de formación de fibrina en todos los métodos de filtración, pero no hasta un nivel para lograr los enriquecimientos deseados ni en una cantidad controlada para lograr una separación uniforme. Una cantidad de fibrina añadida por encima de
- 15 $0,2\text{ mg/l}$ y el $2,5\%$ o más de células raras que forman agregados de fibrina da como resultado la separación de células raras de células no raras. La fibrina provoca que las células raras se comporten como células raras con fibrina en su superficie en lugar de como células individuales como es el caso de las células no raras, que no parecen ser sensibles a la agregación de fibrina como las células raras. Por tanto, la cobertura de fibrina (nivel de formación de fibrina) en la superficie de células raras es un factor importante para lograr el enriquecimiento mediante
- 20 filtración.

REIVINDICACIONES

1. Método para aumentar una razón de células raras con respecto a células no raras en una muestra de sangre que se sospecha que contiene células raras y células no raras, comprendiendo el método:
5
(a) proporcionar en combinación la muestra de sangre, un agente de desactivación de plaquetas, un agente de detención de formación de fibrina y fibrina en una cantidad suficiente para producir un nivel de aglutinación predeterminado de las células raras, preparando de ese modo una muestra de sangre tratada, y
10
(b) poner en contacto la muestra de sangre tratada con una matriz porosa de manera que las células raras aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de aglutinación predeterminado de las células raras a fibrina es de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 100% basándose en una cantidad de área superficial de las células raras cubierta con fibrina grande.
15
3. Método según la reivindicación 1, en el que poner en contacto la muestra de sangre tratada con una matriz porosa comprende disponer la muestra de sangre tratada en un lado de la matriz porosa y aplicar presión a la muestra de sangre tratada dispuesta.
20
4. Método según la reivindicación 1, en el que antes de poner en contacto la muestra de sangre tratada con la matriz porosa, la muestra de sangre tratada se diluye con un medio de dilución.
- 25 5. Método según la reivindicación 4, en el que el medio de dilución es un medio tamponado acuoso.
6. Método según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) y (b) se realizan sustancialmente de manera simultánea.
- 30 7. Método para aumentar una razón de células cancerosas con respecto a células no cancerosas en una muestra de sangre que se sospecha que contiene células cancerosas y células no cancerosas, comprendiendo el método:
(a) preparar una muestra de sangre tratada combinando la muestra de sangre con un agente de desactivación de plaquetas, un agente de detención de formación de fibrina y fibrina en una cantidad suficiente para provocar la aglutinación de las células raras en una cantidad de aproximadamente el 2,5% a aproximadamente el 100% basándose en una cantidad de área superficial de las células raras cubierta con fibrina grande,
35
(b) diluir la muestra de sangre tratada con un medio de dilución, y
40
(c) disponer la muestra de sangre tratada diluida en un lado de una matriz porosa y aplicar presión a la muestra de sangre tratada dispuesta, en el que las células cancerosas aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa.
45
8. Método según la reivindicación 1 ó 7, en el que la cantidad de fibrina es de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 10 mg/l.
9. Método según la reivindicación 3 ó 7, en el que la presión aplicada es de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibar.
50
10. Método según la reivindicación 1 ó 7, en el que el tamaño de poro de la matriz porosa es de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 100 µm.
- 55 11. Método según la reivindicación 1 ó 7, en el que las células raras separadas se someten a un método de identificación.
12. Método para identificar al menos un tipo de célula rara en una muestra de sangre que se sospecha que contiene el tipo de célula rara, comprendiendo el método:
60
(a) proporcionar en combinación la muestra de sangre, un agente de desactivación de plaquetas, un agente de detención de formación de fibrina y fibrina en una cantidad de aproximadamente 0,2 mg/l a aproximadamente 10 mg/l para provocar la aglutinación de las células raras y para preparar una muestra de sangre tratada,
65
(b) diluir la muestra de sangre tratada con un medio de dilución,

(c) poner en contacto la muestra de sangre tratada diluida con una matriz porosa de manera que las células raras aglutinadas se retienen preferentemente en la matriz porosa, y

5 (d) poner en contacto las células raras con un agente de identificación.

13. Método según la reivindicación 12, en el que poner en contacto la muestra de sangre tratada con una matriz porosa comprende disponer la muestra de sangre tratada en un lado de la matriz porosa que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 100 μm , y aplicar presión a la muestra de
10 sangre dispuesta, en el que la presión aplicada es de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibar.

14. Método según la reivindicación 12, en el que el agente de identificación es un miembro de unión específica
15 marcado para las células raras.

15. Método según la reivindicación 1 ó 12, en el que las células raras son células cancerosas.

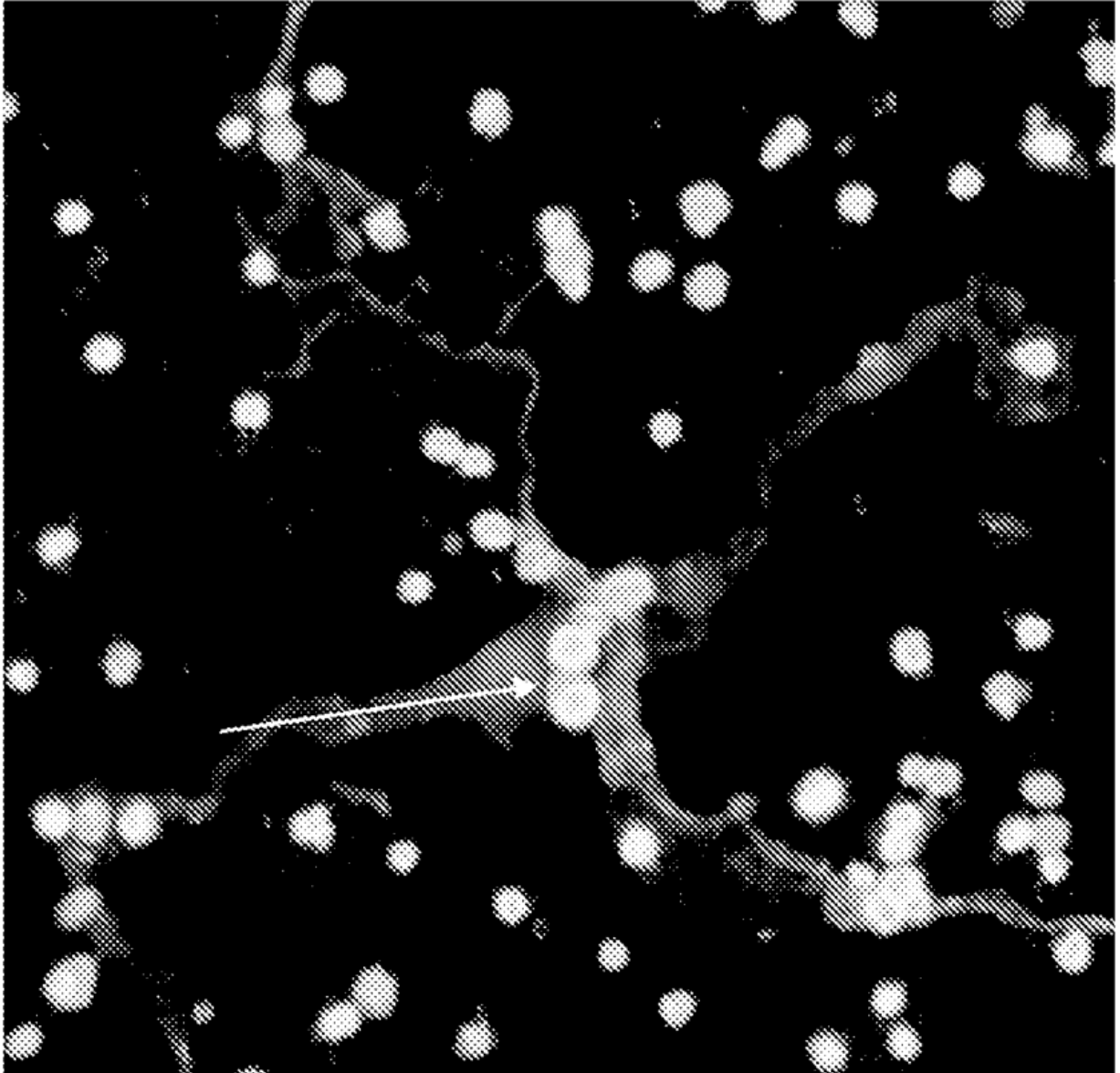


Figura 1

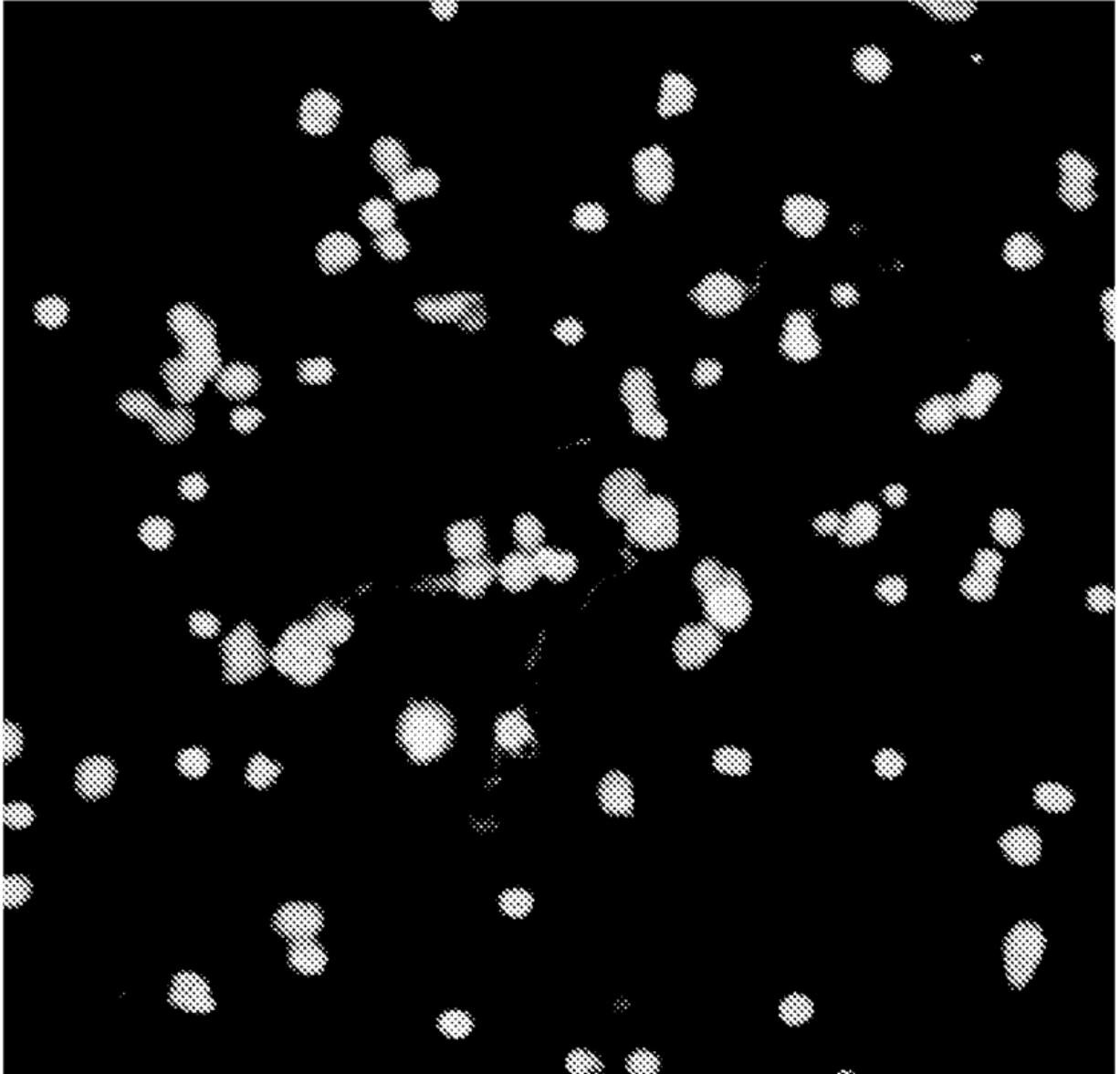


Figura 2