

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 381**

51 Int. Cl.:

C12M 1/26 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01)
C12N 5/09 (2010.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2014 PCT/JP2014/076004**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15046557**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2014 E 14848880 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024 EP 3054001**

54 Título: **Dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes y método para la concentración y separación de células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

30.09.2013 JP 2013203613

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.08.2024

73 Titular/es:

**SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (100.0%)
 13-5, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku
 Tokyo 103-0027, JP**

72 Inventor/es:

**OKAMOTO, RYUSUKE y
 INOUE, TOMONORI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 977 381 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

Dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes y método para la concentración y separación de células tumorales circulantes

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes a partir de una muestra derivada de sangre. Más específicamente, la presente invención se refiere a un dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes, en el que puede formarse un reparto de un agente de separación de células de manera media entre células tumorales y otras células sanguíneas tras centrifugación usando una diferencia de densidad relativa, y a un método de separación.

10

Antecedentes de la técnica

15

Las células tumorales circulantes (CTC) son células cancerosas distribuidas en la sangre periférica mediante liberación a partir de tejido de tumor primario o tejido de tumor metastásico e infiltración en la sangre. Tales células tumorales circulantes están asociadas en gran medida con metástasis de cáncer. Por tanto, se ha centrado atención, por ejemplo, en la detección de células tumorales circulantes y la observación de su dinámica.

20

Mientras tanto, se considera que las células tumorales circulantes están presentes únicamente en una cantidad traza en la sangre. Por tanto, para detectar células tumorales circulantes u observar la dinámica de células tumorales circulantes, ha sido necesario concentrar y separar células tumorales circulantes presentes en la sangre hasta una concentración observable. Convencionalmente se han propuesto diversos métodos como métodos para la concentración y separación de células tumorales circulantes en una muestra de sangre. Por ejemplo, se conoce un método que implica añadir un agente hemolizante a una muestra de sangre completa para retirar eritrocitos como células sanguíneas. Sin embargo, ha habido un problema ya que muchos eritrocitos permanecen sin hemolizar. También ha habido un problema ya que no pueden retirarse los leucocitos. Además, ha habido un problema ya que la adición de una gran cantidad del agente hemolizante a una muestra derivada de sangre es muy invasiva con respecto a las células tumorales previstas.

25

30

El siguiente documento de patente 1 da a conocer un método que implica hacer reaccionar perlas magnéticas con moléculas de adhesión a células epiteliales (EpCAM) expresadas en células tumorales circulantes, clasificar magnéticamente las células tumorales a partir de otras células, y recuperar de manera selectiva las células tumorales. El siguiente documento de patente 2 da a conocer un método que implica usar un filtro de separación de hematocitos para clasificar células tumorales basándose en el tamaño de células. El siguiente documento no de patente 1 describe un método de centrifugación por gradiente de densidad que usa un agente de separación comercial cuya densidad relativa se considera que es de 1,077 g/ml. El documento US 2912/0308446 A1 se refiere a un agente de separación de sangre que puede formar una pared de división en una capa intermedia entre coágulo y suero o entre componentes de células sanguíneas y plasma, en el que el agente de separación de sangre contiene un polímero que está compuesto por un polímero basado en éster de ácido (met)acrílico, un polvo inorgánico específico y un polialquilenglicol que tiene un peso molecular promedio en número de 700 o más.

35

40

El artículo científico "Esmailsabzali *et al.*, Biotechnology Advances, vol. 31, págs. 1063-1084" se refiere a un método para el análisis cuantitativo y cualitativo de células tumorales circulantes que da a conocer un dispositivo Rosette Sep™ para la concentración y separación de células tumorales circulantes que comprende un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo, un agente de separación de células con propiedad tixotrópica y un agente de agregación de células.

50

El documento EP 2 410 329 A1 se refiere a una composición para separación de plasma y suero y a un dispositivo para análisis de sangre. El documento D5 da a conocer que un componente de resina líquida del agente de separación puede tener una densidad relativa de 1,02 a 1,07.

55

El documento US 2003/0185817 A1 se refiere a un método para separar células, tales como células tumorales, usando un agente de agregación de células, centrifugación y una etapa de recuperar las células concentradas.

Lista de referencias

60

Bibliografía de patentes

Documento de patente 1: patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2012-022002.

Documento de patente 2: patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2013-042689.

65

Bibliografía no de patentes

Documento no de patente 1: GE Healthcare Bio-Sciences AB "Instructions 71-7167-00 AG Ficoll-Paque PLUS".

Sumario de la invención

5

Problema técnico

10 El método descrito en el documento de patente 1 sólo puede detectar células tumorales derivadas de células epiteliales. Por consiguiente, el método tiene un problema de tener una baja tasa de recuperación de células tumorales. También requiere un anticuerpo marcado de manera magnética, un imán y similares y tiene un procedimiento de funcionamiento complicado. Además, el método requiere mucho tiempo para las pruebas.

15 El método descrito en el documento de patente 2 también tiene una tasa de recuperación baja de células tumorales porque estaban presentes células tumorales que no podían recuperarse mediante un filtro de separación de sangre. Además, puede no ser posible realizar una concentración y separación exactas.

20 El método descrito en el documento no de patente 1 había dado como resultado algunas veces una disminución local de la densidad relativa cuando los leucocitos se dispersaban por debajo de la superficie del agente de separación. Por consiguiente, tenía que colocarse una muestra de sangre de modo que no se perturbara la superficie de contacto entre la muestra y el agente de separación. Por tanto, su funcionamiento era complicado. El método también requiere una operación cuidadosa para la recuperación de células tumorales. Además, la superficie de contacto entre la capa de células tumorales y el medio de separación no estaba clara. Por consiguiente, la tasa de recuperación de células tumorales era baja.

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes y un método para la concentración y separación de células tumorales circulantes, que eliminen los inconvenientes anteriormente mencionados de la técnica relacionada y que puedan concentrar y separar células tumorales circulantes en una muestra derivada de sangre a una alta tasa de recuperación mediante una operación sencilla sin aumentar la invasión de células.

30

Solución al problema

35 A la vista de los problemas anteriormente descritos, los presentes inventores han encontrado que puede usarse un agente de separación de células con propiedad tixotrópica, que tiene una densidad relativa particular, para resolver los problemas anteriores. Específicamente, el problema se resuelve mediante las reivindicaciones adjuntas.

Efectos ventajosos de la invención

40 Según el dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes y el método para la concentración y separación según la presente invención, pueden concentrarse y separarse células tumorales circulantes en una muestra derivada de sangre a una alta tasa de recuperación mediante una operación sencilla sin aumentar la invasión de células. Por tanto, pueden recuperarse eficazmente células tumorales circulantes a partir de una muestra derivada de sangre.

45

50 El dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención puede recuperar células tumorales presentes únicamente en una cantidad traza en una muestra derivada de sangre tal como se describió anteriormente con alta pureza y, por tanto, por ejemplo, permite una mejora de la tasa de detección y la precisión de detección en la detección de células tumorales en un citómetro de flujo usando una muestra concentrada y separada. Alternativamente, puede realizarse una operación de analizar mediante citología células tumorales concentradas y separadas con microscopio de manera eficiente y con alta precisión. Además, la capacidad de recuperar células tumorales mediante una operación sencilla, a una alta tasa de recuperación y con alta pureza puede contribuir al desarrollo de un nuevo agente terapéutico eficaz para tumores y al descubrimiento de una nueva diana terapéutica y de diagnóstico.

55

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 es una vista frontal en sección esquemática que muestra un ejemplo estructural del dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención.

60

Descripción de realizaciones

65 La presente invención se aclarará a continuación describiendo realizaciones específicas según la presente invención. El dispositivo proporcionado por la presente invención es un dispositivo para concentrar y separar una cantidad traza de células tumorales presentes en una muestra derivada de sangre, en el que un agente de separación de células con propiedad tixotrópica que tiene una densidad relativa intermedia entre las células

tumorales y otras células sanguíneas y que permite la separación de ambas células mediante una operación de centrifugación está alojado en un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo.

5 (Células sanguíneas)

El dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención puede retirar células sanguíneas contenidas en una muestra derivada de sangre usando un agente de agregación de células que va a describirse a continuación. Tal como se usa en el presente documento, las células sanguíneas representan células sanguíneas presentes en una muestra derivada de sangre, distintas de células tumorales deseadas, y ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, células de hematocitos y células de plaquetas, más específicamente, eritrocitos, células B, células T, monocitos, células NK y granulocitos.

15 (Densidad relativa de células tumorales circulantes y densidad relativa de otras células sanguíneas)

Dependiendo del tipo de células tumorales, la densidad relativa de células tumorales circulantes es generalmente del orden de 1,040 a 1,065. Por otro lado, la densidad relativa de eritrocitos es de 1,095 y la densidad relativa de leucocitos es del orden de 1,063 a 1,085. Por tanto, la densidad relativa de células distintas de células tumorales circulantes está normalmente en el intervalo de 1,063 a 1,095.

20 (Muestra derivada de sangre)

Además de una muestra tal como una muestra de sangre completa extraída de un sujeto que se usa tal cual, la muestra derivada de sangre en el presente documento también incluye, por ejemplo, una a la que se le añade cualquiera de diversos agentes para la conservación de las propiedades de la sangre o con el fin de ajustar condiciones de modo que favorezcan la separación y concentración de células tumorales, o similares.

Los ejemplos del agente añadido a la muestra derivada de sangre incluyen, pero no se limitan a, sacáridos, tales como glucosa y maltosa, y citrato de sodio. El anticoagulante sanguíneo que va a describirse a continuación puede estar configurado para estar contenido en la muestra derivada de sangre por adelantado.

30 (Agente de separación de células)

La presente invención resuelve los problemas anteriores proporcionando un dispositivo en el que un agente de separación de células con propiedad tixotrópica está alojado en un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo.

Tal como se describió anteriormente, según la presente invención, es necesario que la densidad relativa del agente de separación de células sea un valor entre la densidad relativa de células tumorales circulantes y la densidad relativa de células sanguíneas distintas de las células tumorales circulantes. Permite garantizar la formación de un reparto entre células tumorales circulantes y otras células sanguíneas tras una operación de centrifugación.

Mientras tanto, para un agente de separación de células con propiedad tixotrópica, la capacidad de respuesta de flujo frente a fuerza centrífuga se deteriora generalmente a medida que aumenta su densidad relativa y, por tanto, el agente de separación para suero o plasma habitualmente usado se ajusta hasta una densidad relativa de 1,040 a 1,055.

La densidad relativa del agente de separación de células según la presente invención está en el intervalo de 1,050 a 1,080. Por tanto, pueden separarse células tumorales y otras células sanguíneas. Preferiblemente, la densidad relativa está en el intervalo de 1,055 a 1,080, más preferiblemente en el intervalo de 1,065 a 1,077. Todavía más preferiblemente, la densidad relativa está en el intervalo de 1,070 a 1,077. Un intervalo de densidad relativa de este tipo permite la separación más segura de células tumorales circulantes y otras células sanguíneas.

Sin embargo, una densidad relativa superior puede reducir la fluidez del agente de separación de células. Por tanto, es preferible añadir un potenciador de la tixotropía que va a describirse a continuación. Tal como se describirá a continuación en el presente documento, el potenciador de la tixotropía que va a usarse puede ser preferiblemente un polialquilenglicol que tiene un peso molecular promedio en número de 700 o más. Un potenciador de la tixotropía de este tipo puede añadirse para permitir la formación más segura de un reparto suficientemente resistente entre células tumorales y otras células sanguíneas tras centrifugación.

El agente de separación de células de la presente invención contiene un componente líquido y un polvo inorgánico. El componente líquido y el polvo inorgánico pueden combinarse para proporcionar fácilmente el intervalo anteriormente descrito de densidad relativa. El polvo inorgánico puede ser un polvo inorgánico cuya superficie es hidrófila, o un polvo inorgánico cuya superficie es hidrófoba. El polvo inorgánico puede ser una

combinación de un polvo inorgánico cuya superficie es hidrófila y un polvo inorgánico cuya superficie es hidrófoba.

5 En el agente de separación de células según la presente invención, el componente líquido es líquido a temperatura habitual, siendo uno basado en silicona, basado en copolímero de α -olefina-diéster de fumarato, basado en acrílico, basado en poliéster, basado en copolímero de sebacato/2,2-dimetil-1,3-propanodiol/1,2-propanodiol, basado en poliéter-poliuretano, basado en poliéter-éster u otra resina líquida y una mezcla de líquido/líquido o sólido/líquido, siendo la mezcla una mezcla de polímero de poli- α -pineno e hidrocarburo clorado, una mezcla líquida de polibuteno clorado y un compuesto líquido (por ejemplo, epoxidado de un aceite animal o vegetal), una mezcla líquida de trifluoruro de cloruro de etileno, un derivado de éster alquílico de ácido benceno-polycarboxílico y un polioalquilenglicol, o una mezcla líquida de oligómero de ciclopentadieno y un éster de ftalato.

15 El polvo inorgánico es uno o dos o más (mezcla) seleccionados del grupo que consiste en polvos finos basados en dióxido de silicio, tales como sílice producida mediante un procedimiento en fase gaseosa conocido (también denominado método en seco) y un mineral de arcilla compuesto por bentonita, esmectita y polvos finos basados en óxido de titanio y basados en alúmina.

20 Según la presente invención, el polvo inorgánico puede ser hidrófilo o hidrófobo en la superficie. El polvo inorgánico hidrófobo en la superficie y el polvo inorgánico hidrófilo en la superficie pueden usarse en combinación.

Según la presente invención, como polvo inorgánico, se usa preferiblemente un polvo basado en dióxido de silicio o un polvo basado en óxido de titanio, y ambos polvos pueden usarse en combinación.

25 Como sílice hidrófila entre los polvos basados en dióxido de silicio, por ejemplo, una sílice hidrófila de procedimiento en fase gaseosa, tal como la serie Aerosil, por ejemplo, Aerosil (R) 90G, 130, 200 ó 300 (de Nippon Aerosil Co., Ltd.), la serie Reolosil, por ejemplo, Reolosil (R) QS-10, QS-20 o QS-30 (de Tokuyama Corporation), o la serie Wacker HDK, por ejemplo, Wacker HDK S13, N20 o T30 (de Wacker Asahikasei Silicone Co., Ltd.), está disponible y es fácil de usar.

30 Como sílice hidrófoba, por ejemplo, una sílice hidrófoba de procedimiento en fase gaseosa, tal como la serie Aerosil, por ejemplo, Aerosil R972, R974, R805 o R812 (de Nippon Aerosil Co., Ltd.), la serie Reolosil, por ejemplo, Reolosil MT-10, DM-30S, HM-30S, KS-20S o PM-20 (de Tokuyama Corporation), o la serie Wacker HDK, por ejemplo, Wacker HDK H15, H18 o H30 (de Wacker Asahikasei Silicone Co., Ltd.), está fácilmente disponible y es fácil de usar.

40 Según la presente invención, es preferible añadir además un potenciador de la tixotropía. El potenciador de la tixotropía no está particularmente limitado, siempre que potencie la propiedad tixotrópica; sin embargo, preferiblemente se usa un polialquilenglicol. Más preferiblemente se usa un polímero preparado polimerizando uno o dos o más monómeros de óxido de alquileo que tienen de 2 a 4 átomos de carbono. Todavía más preferiblemente se usa un polialquilenglicol con un peso molecular promedio en número de 700 o más como polímero preparado polimerizando uno o dos o más monómeros de óxido de alquileo que tienen 3 ó 4 átomos de carbono. La adición de un potenciador de la tixotropía de este tipo permite la formación más segura de un reparto tras centrifugación y permite la formación de un reparto suficientemente resistente.

En el agente de separación de células según la presente invención, los polialquilenglicoles particulares anteriores pueden usarse solos, o pueden combinarse dos o más de los mismos.

50 El polialquilenglicol usado en la presente invención que contiene un exceso del componente de polimerización de monómero de etilenglicol, que tiene 2 átomos de carbono, en la molécula no se prefiere porque tiene una solubilidad en agua aumentada; preferiblemente se usa uno que tiene un valor de HLB según el método de Davie de 16 o menos. El valor de HLB según el método de Davies se calcula mediante la siguiente ecuación.

55 $\langle \text{Valor de HLB} = 7 + \text{la suma de los números de grupos hidrófilos} - \text{la suma de los números de grupos lipófilos} \rangle$

El número de grupos se refiere a un valor numérico específico asignado a cada grupo funcional.

60 Dependiendo del número de grupos hidroxilo derivado del número de grupos funcionales de un alcohol que proporciona una sustancia de partida, o dependiendo de la presencia de la ocupación de centros reactivos del grupo hidroxilo con un grupo alquilo, se usan polialquilenglicoles que tienen uno o más de un grupo hidroxilo. Para reducir la solubilidad en agua, el número de grupos hidroxilo por molécula es preferiblemente de 3 o menos.

65 Un residuo hidrófobo introducido, excepto con el fin de ocupar los centros reactivos del grupo hidroxilo, puede estar contenido en la molécula del polialquilenglicol. Los ejemplos del residuo hidrófobo incluyen un grupo alquileo, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo de anillo aromático y un grupo sustituyente basado en

dimetilsiloxano.

5 La molécula puede contener, en lugar del grupo hidroxilo o de manera adicional, un grupo polar de formación de enlaces de hidrógeno, tal como un grupo carbonilo, un grupo amino o un grupo tiol. Para reducir la solubilidad en agua, de nuevo el número de grupos polares por molécula es preferiblemente de 3 o menos.

10 Un peso molecular promedio en número del polialquilenglicol de menos de 700 algunas veces da como resultado la generación de grietas en el reparto formado tras centrifugación. Por consiguiente, pueden mezclarse células de hematocitos con células tumorales para reducir la pureza de las células tumorales. Por tanto, es preferible que el peso molecular promedio en número sea de 700 o más. Más preferiblemente, el peso molecular promedio en número es preferiblemente de 1.000 o más para el polialquilenglicol que tiene dos o más grupos hidroxilo. El valor de límite superior del peso molecular promedio en número del polialquilenglicol no está particularmente limitado; sin embargo, es preferiblemente de 100.000 o menos. Por encima de 100.000, tiene una densidad de grupos hidroxilo reducida y puede no actuar como potenciador de la tixotropía.

15 La concentración del polialquilenglicol es preferiblemente del 5 % en peso o menos basándose en la totalidad del agente de separación de sangre. La concentración del 5 % en peso o menos puede ajustar más fácilmente el agente de separación de células hasta un intervalo de viscosidad deseable. Más preferiblemente es del 3 % en peso o menos, todavía más preferiblemente del 2 % en peso o menos. El límite inferior de la concentración del polialquilenglicol es preferiblemente del 0,1 % en peso. La concentración del 0,1 % en peso o más puede ajustar fácilmente el intervalo de viscosidad del agente de separación de células hasta un intervalo deseable.

20 Los ejemplos específicos del polialquilenglicol particular pueden incluir los siguientes diversos polialquilenglicoles. Sin embargo, no se pretende que se limiten a las sustancias mostradas a continuación a modo de ejemplo.

25 Los ejemplos del polialquilenglicol que tiene más de un grupo hidroxilo terminal incluyen polibutilenglicoles (serie Uniol (R) PB, tal como PB-700, PB-1000 y PB-2000, de NOF Corporation), polipropilenglicoles (serie Uniol D, tal como D-700, D-1200 y D-4000, de NOF Corporation), gliceril éteres de polioxipropileno (serie Uniol TG, tal como TG-1000, TG-3000 y TG-4000, de NOF Corporation), polioxipropileno-sorbitoles (serie Uniol HS, tal como HS-1600D, de NOF Corporation), poliserinas (serie Polyserine DCB, tal como DCB-1000, DCB-2000 y DCB-4000 y serie Polyserine DC, tal como DC-1100, DC-1800E y DC-3000E, de NOF Corporation), digliceril éteres de polioxipropileno (serie Unilube (R), tal como DGP-700, de NOF Corporation), gliceril éteres de polioxipropileno (serie Preminol, tal como S3003, S3006 y S3011, de Asahi Glass Co., Ltd.), polipropilenglicoles (serie Preminol (R), tal como S4001, S4006, S4011 y S4015, de Asahi Glass Co., Ltd.), polioxietileno-polioxipropilenglicoles (serie New Pole (R) PE, tal como PE-34, PE 61, PE-62, PE-64, PE-71 y PE-74, de Sanyo Chemical Industries, Ltd.) y gliceril éteres de polioxietileno-polioxipropileno (Adeka Polyether, tal como AM-502, de Adeka Corporation).

30 Los ejemplos del polialquilenglicol que tiene un grupo hidroxilo terminal incluyen butil éteres de polioxipropileno (serie Unilube MB, tal como MB-7, MB-14, MB-38 y MB-700, de NOF Corporation), monoéteres de polioxipropilenglicol (serie New Pole LB, tal como LB-285, LB-625, LB-3000 y LB-1800X, de Sanyo Chemical Industries, Ltd.) y alquil éteres de polioxipropileno (serie Preminol, tal como S1004F y S1005, de Asahi Glass Co., Ltd.).

35 45 En el agente de separación de células según la presente invención, pueden combinarse adicionalmente aditivos, tales como un compatibilizante y un antioxidante, en el intervalo que permite el mantenimiento del rendimiento como agente de separación de células.

40 La densidad relativa del agente de separación de células según la presente invención se ajusta hasta de 1,050 a 1,080. La densidad relativa del agente de separación de células según la presente invención se ajusta preferiblemente hasta de 1,055 a 1,080, más preferiblemente de 1,065 a 1,077. Una densidad relativa de menos de 1,055 disminuye algunas veces la tasa de recuperación de células tumorales deseadas, probablemente porque la densidad relativa es inferior a la de las células tumorales. Por otro lado, una densidad relativa de más de 1,080 reduce algunas veces la fluidez del agente de separación de células en centrifugación haciendo que sea imposible formar un reparto de manera media entre células tumorales y otras células sanguíneas porque pasa a ser muy próxima a la densidad relativa de células sanguíneas no deseadas distintas de células tumorales, particularmente células de hematocitos.

(Anticoagulante sanguíneo)

50 60 Puede añadirse un anticoagulante sanguíneo al dispositivo para la concentración y separación de células tumorales según la presente invención, si es necesario. El anticoagulante sanguíneo puede estar en una forma que existe conjuntamente con un agente de agregación de células que va a describirse a continuación y una muestra derivada de sangre cuando se hace reaccionar el agente con la muestra. Específicamente, el anticoagulante sanguíneo puede estar en una forma alojada en el recipiente por adelantado, o puede estar en una forma añadida de manera independiente a la muestra derivada de sangre por adelantado. Cuando el

anticoagulante sanguíneo está en una forma alojada en el recipiente por adelantado, puede estar en una forma aplicada a la superficie de pared interna del recipiente o en una forma alojada en el recipiente realizándose en una forma que se disuelve fácilmente en la muestra derivada de sangre, tal como en una forma granular o una forma de lámina.

5 El anticoagulante sanguíneo usado en la presente invención no está particularmente limitado; pueden usarse anticoagulantes sanguíneos conocidos, tales como ácido cítrico, heparina y EDTA.

(Agente de agregación de células)

10 El dispositivo para la concentración y separación de células tumorales según la presente invención contiene un agente de agregación de células. El agente de agregación de células según la presente invención significa un agente que puede agregar de manera selectiva células sanguíneas distintas de células tumorales deseadas para facilitar la precipitación y separación de las mismas mediante una operación de centrifugación usando una
15 diferencia de densidad relativa para aumentar la pureza de las células tumorales. Por ese motivo, puede aplicarse cualquier agente conocido siempre que sea un agente que tiene un mecanismo de acción de este tipo; sin embargo, preferiblemente se usa un anticuerpo que tiene tanto un sitio de reconocimiento de antígeno que puede unirse a un antígeno característico de la superficie de leucocitos como un sitio de reconocimiento de antígeno que puede unirse a un antígeno característico de la superficie de eritrocitos (cóctel de agotamiento de
20 CD45 humano RosetteSep, de STEMCELL Technologies, Inc.).

Como agente que tiene un mecanismo diferente de agregación, también puede usarse un agente en el que un sitio de reconocimiento de antígeno que puede unirse a un antígeno característico de la superficie de leucocitos está física o químicamente unido a un portador que tiene una alta densidad relativa, o un agente para adsorber
25 físicamente células de hematocitos en un portador insoluble, tal como microperlas.

(Método para producir un agente de separación de células)

30 El método para producir un agente de separación de células según la presente invención puede ser un método conocido anteriormente y no está particularmente limitado. Específicamente, el componente líquido anteriormente descrito, el polvo inorgánico anteriormente descrito y el polialquilenglicol particular anteriormente descrito pueden mezclarse mediante un método apropiado. El método de mezclado no está particularmente limitado; los ejemplos del mismo pueden incluir métodos que usan máquinas de amasado conocidas, tales como una mezcladora planetaria, un molino de cilindros y un homogeneizador.

35 (Dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes)

40 El dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención comprende, como constituyentes, un cuerpo de recipiente, y el agente de separación de células y el agente de agregación de células y, si es necesario, el anticoagulante sanguíneo según la presente invención que están alojados en el cuerpo de recipiente. El cuerpo de recipiente no está particularmente limitado, y es un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo que puede centrifugarse, tal como un tubo de ensayo, un tubo de centrifuga o un microtubo, que incluye un recipiente en forma de tubo con fondo ampliamente usado como recipiente de recogida de sangre.

45 La figura 1 es una vista frontal en sección esquemática que muestra un ejemplo estructural de un dispositivo de este tipo para la concentración y separación de células tumorales circulantes. El dispositivo 1 para la concentración y separación de células tumorales circulantes comprende un cuerpo 2 de recipiente que consiste en un recipiente en forma de tubo con fondo. Un agente 3 de separación de células está alojado en el cuerpo 2
50 de recipiente.

Un extremo abierto del recipiente en forma de tubo con fondo está al menos parcialmente sellado mediante un tapón configurado para poder perforarse, y el interior del recipiente puede estar despresurizado. El material del cuerpo de recipiente tampoco está particularmente limitado, siempre que pueda resistir la centrifugación; puede
55 usarse cualquier material, tal como resina sintética o vidrio.

El cuerpo de recipiente y el tapón pueden someterse, cada uno, a un tratamiento de superficie interna con el fin de lograr el efecto de prevenir la adhesión de coágulos de sangre.

60 Normalmente, la cantidad de adición del agente de separación de células es preferiblemente del orden de 0,3 g a 3,0 g por recipiente; sin embargo, la cantidad de adición óptima puede seleccionarse dependiendo del volumen y la forma del recipiente usado.

65 En el dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención, el agente de agregación de células está preferiblemente alojado en el recipiente de modo que su cantidad de adición es de 25 a 150 µl basándose en 1 ml de la muestra derivada de sangre. Permite la

separación más eficaz de células tumorales y células sanguíneas distintas de células tumorales según la presente invención.

5 También se incluye en la presente invención el uso de un dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes en una muestra derivada de sangre. La presente invención proporciona el uso de un dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes presentes en una muestra derivada de sangre, que comprende un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo y un agente de separación de células con propiedad tixotrópica alojado en el recipiente en forma de tubo y que puede separar células tumorales y células sanguíneas distintas de las células tumorales tras centrifugación, teniendo el agente de separación de células una densidad relativa que oscila entre 1,050 y 1,080.

10 Tal como se describió anteriormente, el uso del dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención puede proporcionar un método para concentrar y separar células tumorales en una muestra derivada de sangre. El método para concentrar y separar células tumorales en una muestra derivada de sangre que usa el dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la presente invención comprende las siguientes etapas.

(Método para concentrar y separar células tumorales circulantes en muestra derivada de sangre usando un dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes)

20 (1) Una etapa de dejar que una muestra derivada de sangre, un agente de agregación de células para agregar de manera selectiva células sanguíneas distintas de células tumorales y precipitar lo resultante mediante una operación de centrifugación, y un anticoagulante sanguíneo, coexistan en un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo, en el que está alojado un agente de separación de células con propiedades tixotrópicas y con una densidad relativa que oscila entre 1,050 y 1,080, permitiendo la separación de las células tumorales y células sanguíneas distintas de las células tumorales mediante una operación de centrifugación,

25 (2) una etapa de hacer reaccionar el agente de agregación de células con la muestra derivada de sangre en el recipiente,

30 (3) una etapa de centrifugar el recipiente para formar un reparto del agente de separación de células entre las células tumorales y otras células sanguíneas, y

35 (4) una etapa de recuperar las células tumorales concentradas y separadas en el plasma por encima del reparto, conteniendo el agente (3) de separación de células un componente líquido y un polvo inorgánico,

40 en el que el componente líquido es uno o más seleccionados de uno basado en silicona, basado en copolímero de α -olefina-diéster de fumarato, basado en acrílico, basado en poliéster, basado en copolímero de sebacato/2,2-dimetil-1,3-propanodiol/1,2-propanodiol, basado en poliéter-poliuretano, basado en poliéter-éster y una mezcla de líquido/líquido o sólido/líquido, siendo la mezcla una mezcla de polímero de poli- α -pineno e hidrocarburo clorado, una mezcla líquida de polibuteno clorado y un compuesto líquido, una mezcla líquida de trifluoruro de cloruro de etileno, un éster alquílico de ácido benceno-policarboxílico y un polioxialquilenglicol, o una mezcla líquida de oligómero de ciclopentadieno y un éster de ftalato, y

45 el polvo inorgánico es uno o más seleccionados de polvos finos basados en dióxido de silicio, un mineral de arcilla compuesto por bentonita o esmectita, polvos finos basados en óxido de titanio y polvos finos basados en alúmina.

50 Detalles referentes al dispositivo son tal como se describió anteriormente, y un experto en la técnica que lea la presente memoria descriptiva puede llevar a cabo el método para concentrar y separar células tumorales circulantes en una muestra derivada de sangre según la presente invención haciendo referencia a la descripción de la memoria descriptiva y realizando modificaciones apropiadas.

55 Las células tumorales circulantes concentradas y separadas usando el dispositivo según la presente invención pueden contarse y analizarse usando un método, tal como citometría de flujo, después de marcar con un reactivo de detección. Los ejemplos del reactivo de detección incluyen un reactivo que contiene un anticuerpo que reconoce un antígeno característico expresado en la superficie de células tumorales circulantes, y un reactivo que contiene un virus que puede infectar células tumorales, proliferar en respuesta a actividad telomerasa característica de células tumorales, y emitir fluorescencia.

60 El uso del dispositivo de la presente invención permite la recuperación de células tumorales con alta pureza y, por tanto, se espera que mejore la eficiencia y precisión de la detección de células tumorales usando un citómetro de flujo.

65

Ejemplos

A continuación se aclarará la presente invención facilitando ejemplos y ejemplos comparativos específicos de la presente invención. Sin embargo, no se pretende que la presente invención se limite a los siguientes ejemplos.

5 [Ejemplos 1 a 12 y ejemplos comparativos 1 a 2]

(Sustancias suadas en los ejemplos 1 a 12 y ejemplos comparativos 1 a 2)

10 1) Componente líquido

Componente líquido 1: polímero de éster acrílico (densidad relativa: 1,032, viscosidad a 25 °C: 65 Pa.s).

15 La viscosidad se midió usando un reómetro, DV-III (Brookfield AMETEK, Inc.).

2) Polvo inorgánico

20 Como polvo inorgánico, se usó una combinación de sílice hidrófoba (Aerosil R974 de Nippon Aerosil Co., Ltd., diámetro de partícula: aproximadamente 12 nm, área de superficie específica: aproximadamente 170 m²/g, vuelta hidrófoba mediante tratamiento químico de la superficie con un grupo CH₃) y óxido de titanio (Tipaque A-100 de Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., diámetro de partícula: 0,15 µm).

3) Polialquilenglicol

25 Se usaron polialquilenglicoles tal como se muestra en la tabla 1 a continuación como potenciadores de la tixotropía 1 a 3.

Potenciador 1: gliceril éter de polioxipropileno (Preminol S3011 de Asahi Glass Co., Ltd.)

30 Potenciador 2: polibutilenglicol (Uniol PB700 de NOF Corporation)

Potenciador 3: gliceril éter de polioxipropileno (Adeka Polyether G300 de Adeka Corporation)

[Tabla 1]

35

	Nombre de sustancia	Nombre comercial	Mn	HLB (método de Davies)
Potenciador 1	Gliceril éter de polioxipropileno	S3011	10.000	-13
Potenciador 2	Polibutilenglicol	PB700	700	5
Potenciador 3	Gliceril éter de polioxipropileno	G300	350	12

(Preparación de agente de separación de células)

(Ejemplo 1)

40

Tal como se muestra en la tabla 2 a continuación, se combinaron componente líquido 1, el polvo inorgánico como mezcla, y potenciador de la tixotropía 1 mostrado en la tabla 1 como polialquilenglicol, en cantidades del 94,9 % en peso, el 4,6 % en peso y el 0,5 % en peso, respectivamente, y se agitaron y se mezclaron usando una mezcladora planetaria a temperatura ambiente para preparar un agente de separación de células.

45

(Ejemplos 2 a 12 y ejemplos comparativos 1 a 2)

50 Se prepararon agentes de separación de células de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto por cambiar el material y la razón de combinación usada tal como se muestra en la tabla 2 a continuación. En el ejemplo 11, no se usó ningún polialquilenglicol. En el ejemplo 12, se usó potenciador de la tixotropía 3, que tiene un peso molecular promedio en número de 350. En el ejemplo comparativo 1, se ajustó el agente de separación de células hasta una densidad relativa de 1,045. En el ejemplo comparativo 2, se ajustó el agente de separación de células hasta una densidad relativa de 1,085.

55 [Tabla 2]

	Componente líquido	Polvo inorgánico (% en peso)	Polialquilenglicol	Densidad relativa de agente de
--	--------------------	------------------------------	--------------------	--------------------------------

ES 2 977 381 T3

	% en peso	R974	A-100	Tipo	% en peso	separación de células
Ejemplo 1	94,9	4,0	0,6	Potenciador 1	0,5	1,055
Ejemplo 2	93,7	4,0	1,8	Potenciador 1	0,5	1,065
Ejemplo 3	93,0	4,0	2,5	Potenciador 1	0,5	1,071
Ejemplo 4	91,0	4,0	2,5	Potenciador 1	2,5	1,071
Ejemplo 5	88,5	4,0	2,5	Potenciador 1	5,0	1,071
Ejemplo 6	93,0	4,0	2,5	Potenciador 2	0,5	1,071
Ejemplo 7	88,5	4,0	2,5	Potenciador 2	5,0	1,071
Ejemplo 8	92,5	4,0	3,0	Potenciador 1	0,5	1,077
Ejemplo 9	92,0	4,0	3,5	Potenciador 1	0,5	1,080
Ejemplo 10	83,5	4,0	2,5	Potenciador 1	10,0	1,071
Ejemplo 11	93,5	4,0	2,5	-	-	1,071
Ejemplo 12	93,0	4,0	2,5	Potenciador 3	0,5	1,071
Ej. comp. 1	96,5	3,0	0,0	Potenciador 1	0,5	1,045
Ej. comp. 2	91,5	4,0	4,0	Potenciador 1	0,5	1,085

(Preparación de dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes)

- 5 Se usaron tubos cónicos de 15 ml (de BD Biosciences) y se alojaron aproximadamente 1,8 g de cada uno de los agentes de separación de células de los ejemplos 1 a 12 y los ejemplos comparativos 1 a 2 en los tubos para preparar dispositivos para la concentración y separación de células tumorales circulantes.

(Evaluación)

- 10 Se llevó a cabo la siguiente evaluación usando una pseudo-sangre de paciente en la que se añadieron células cultivadas de adenocarcinoma de colon (DLD-1) a 50 células/ml de sangre a sangre humana normal sometida a tratamiento de anticoagulación con EDTA.

1) Evaluación de la fluidez de agente de separación de células

- 15 Tras verter 2 ml de una pseudo-sangre de paciente en cada uno de 3 dispositivos para la concentración y separación de células tumorales circulantes, se llevó a cabo una centrifugación en condiciones de 1.200 g × 20 minutos/temperatura ambiente. El caso en el que el reparto del agente de separación de células tenía un grosor promedio de 5 mm o más se designó como "buena"; el caso en el que tenía un grosor de 2 mm (incluido) a 5 mm (excluido) se designó como "aceptable"; y el caso en el que tenía un grosor de menos de 2 mm se determinó como "mala". Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

2) Resistencia de reparto

- 25 Se dejó caer lateralmente cada dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes tras centrifugación y se aplicó vibración a 60 Hz durante 1 hora. El caso en el que el reparto no se movió se determinó como "buena"; el caso en el que se movió pero se mantuvo intacto, "aceptable"; y el caso en el que se alteró el reparto y se mezcló con células de hematocitos, "mala". Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación.

3) Evaluación del estado de formación de reparto

- 35 Se observaron visualmente el estado del reparto formado tras la centrifugación y la presencia de materia aceitosa en suspensión y película aceitosa. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación. En la tabla 3, el caso en el que se produjeron grietas en el reparto se describió como "agrietamiento". El caso en el que se formó materia aceitosa en suspensión y película aceitosa se describió como "aceptable/aceite". El caso en el que no se observó nada de eso se describió como "bueno".

4) Tasa de recuperación de células tumorales

- 40 Tras centrifugación, se suspendieron las células tumorales concentradas y separadas en plasma por encima del reparto y se recuperaron mediante pipeta. Dado que DLD-1 eran células epiteliales, se añadió anticuerpo frente a CD326-FITC (de Miltenyi Biotec) a la suspensión recuperada para formar un marcaje fluorescente. Se marcaron de manera fluorescente los leucocitos no deseados restantes con CD45-APC (de Miltenyi Inc.); se contó el número de células CD326+/CD45- usando un citómetro de flujo (FACSAria de BD Co., Ltd.); y se calculó la tasa de recuperación basándose en el número (100 células) de células tumorales contenidas en la pseudo-sangre de paciente. Los resultados se muestran en la tabla 3.

[Tabla 3]

	Fluidez (1200G × 20 min./ Temp. amb.)	Resistencia de reparto	Estado de la formación de reparto	Tasa de recuperación de células tumorales (%)
Ejemplo 1	Buena	Buena	Bueno	65
Ejemplo 2	Buena	Buena	Bueno	80
Ejemplo 3	Buena	Buena	Bueno	95
Ejemplo 4	Buena	Buena	Bueno	90
Ejemplo 5	Buena	Buena	Bueno	91
Ejemplo 6	Buena	Buena	Bueno	89
Ejemplo 7	Buena	Buena	Bueno	91
Ejemplo 8	Buena	Buena	Bueno	95
Ejemplo 9	Buena	Buena	Bueno	92
Ejemplo 10	Buena	Aceptable	Aceptable/Aceite	89
Ejemplo 11	Buena	Aceptable	Cracking	85
Ejemplo 12	Buena	Buena	Cracking	86
Ej. comp. 1	Buena	Buena	Bueno	39
Ej. comp. 2	Mala	-	-	-

Tal como se muestra en la tabla 3, en los ejemplos 1 a 9, se mostraron resultados favorables para la totalidad de la fluidez de agente de separación de células, la resistencia de reparto, el estado de formación de reparto y la tasa de recuperación de células tumorales. En el ejemplo 10, se formaron materia aceitosa en suspensión y película aceitosa en la observación del estado de formación de reparto y la resistencia de reparto fue ligeramente baja, pero pudieron recuperarse células tumorales a una alta tasa de recuperación como en los ejemplos 1 a 9. En el ejemplo 10, la adición del polioxialquilenglicol en una cantidad de hasta el 10 % en peso produjo probablemente la materia aceitosa en suspensión y la película aceitosa.

En cambio, en el ejemplo 11 en el que no se añadió ningún polialquilenglicol, no se obtuvo una propiedad tixotrópica suficiente y tampoco se obtuvo una resistencia de reparto suficiente, pero la tasa de recuperación de células tumorales fue favorable.

En el ejemplo 12 en el que se usó el polialquilenglicol que tenía un peso molecular promedio de 350, se formaron grietas en el reparto tras centrifugación aunque la tasa de recuperación de células tumorales fue favorable. Ni siquiera el uso del polialquilenglicol que tenía un peso molecular promedio de 350 dio probablemente como resultado la formación de un reparto suficientemente resistente porque no aumentó suficientemente la propiedad tixotrópica, como en el ejemplo 11. Sin embargo, en el ejemplo 12, aunque probablemente no se formó un reparto suficientemente resistente, la tasa de recuperación de células tumorales también fue favorable como en el ejemplo 11.

Cuando no se obtiene una resistencia de reparto suficiente o se forman grietas en el reparto, puede producirse la fuga de hematocitos y células tumorales separadas mediante el agente de separación. Esto puede afectar a la tasa de recuperación de células tumorales y puede dar como resultado el mezclado de hematocitos en la fase líquida que contiene las células tumorales recuperadas.

En el ejemplo comparativo 1 en el que la densidad relativa del agente de separación de células se ajustó hasta 1,045, la fluidez, la resistencia de reparto y el estado de reparto fueron favorables, pero la tasa de recuperación de células tumorales fue de tan sólo el 39 %. En el ejemplo comparativo 2 en el que la densidad relativa del agente de separación de células se ajustó hasta 1,085, la centrifugación no dio como resultado la formación de un reparto.

Por tanto, la densidad relativa del agente de separación de células se ajusta preferiblemente hasta de 1,055 a 1,080. Además, para permitir obtener células tumorales a una tasa de recuperación superior y hacer que la fluidez del agente de separación de células sea superior, la densidad relativa del agente de separación de células se ajusta preferiblemente hasta de 1,065 a 1,077.

[Ejemplos 13 a 18]

Se describirán los siguientes ejemplos 13 a 18 en los que coexisten una muestra derivada de sangre y un agente de agregación de células.

En la siguiente evaluación, se usaron el mismo dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes y pseudo-sangre de paciente que los del ejemplo 3.

(Ejemplo 13)

Se usó cóctel de agotamiento de CD45 humano RosetteSep (de STEMCELL Technologies, Co., Inc.) como agente de agregación de células. Se añadieron 10 µl (5 µl/1 ml de sangre) del agente de agregación de células a 2 ml de la pseudo-sangre de paciente sometida a tratamiento de anticoagulación con EDTA, que entonces se mezcló mediante agitación y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido por centrifugación en condiciones de 1.200 G × 20 minutos/temperatura ambiente.

Tras centrifugación, se suspendieron las células tumorales concentradas y separadas en plasma por encima del reparto y se recuperaron mediante pipeta. Se sometió la suspensión recuperada a marcaje fluorescente con anticuerpo frente a CD326-FITC (de Miltenyi Inc.) y CD45-APC (de Miltenyi Inc.), y se contaron el número de células CD326+/CD45- y el número total de células usando un citómetro de flujo (FACSAria de BD Co., Ltd.) para calcular la tasa de recuperación basándose en el número (100 células) de células tumorales contenidas en la pseudo-sangre de paciente y el número de células sanguíneas no deseadas restantes distintas de las células tumorales. Los resultados se muestran en la tabla 4.

(Ejemplos 14 a 18)

Se llevó a cabo la evaluación de la misma manera que en el ejemplo 13 excepto por cambiar la cantidad de adición del agente de agregación de células tal como se muestra en la tabla 4 a continuación. Los resultados se muestran en la tabla 4. En la tabla, la cantidad de adición del agente de agregación de células y el número de células sanguíneas distintas de células tumorales se facilitan por ml de la muestra derivada de sangre.

[Tabla 4]

	Cantidad de adición de agente de agregación de células (µl/1 ml de sangre)	Tasa de recuperación de células tumorales (%)	Número de células nucleadas distintas de células tumorales (células/1 ml de sangre)
Ejemplo 3	0	95	2438560
Ejemplo 13	5	88	1087873
Ejemplo 14	10	93	499884
Ejemplo 15	25	90	161254
Ejemplo 16	50	96	108933
Ejemplo 17	100	92	84453
Ejemplo 18	150	89	148634

Tal como se muestra en la tabla 4, a medida que se aumentó la cantidad de adición del agente de agregación de células basándose en 1 ml de la muestra derivada de sangre, disminuyó el número de las células sanguíneas distintas de células tumorales. La adición de 25 µl o más del agente de agregación de células basándose en 1 ml de la muestra derivada de sangre disminuyó notablemente el número de células sanguíneas restantes distintas de células tumorales. Por tanto, los resultados muestran que la cantidad de adición del agente de agregación de células es preferiblemente de 25 µl o más basándose en 1 ml de la muestra derivada de sangre.

En los ejemplos 13 a 17, a medida que se aumentó la cantidad de adición del agente de agregación de células, disminuyó progresivamente el número de células sanguíneas distintas de células tumorales. Sin embargo, en el ejemplo 18, el número de tales células sanguíneas restantes tendió a aumentar ligeramente. Por tanto, la cantidad de adición del agente de agregación de células se establece preferiblemente a 150 µl o menos basándose en 1 ml de la muestra derivada de sangre.

Por tanto, la cantidad de adición del agente de agregación de células basándose en 1 ml de la muestra derivada de sangre se establece preferiblemente a de 25 µl a 150 µl.

Tal como se observa a partir de los resultados de la tabla 4, el dispositivo para la concentración y separación de células tumorales que contiene un agente de separación de células puede usarse con aproximadamente 5.300.000.000 células sanguíneas presentes en 1 ml de la muestra derivada de sangre para retirar fácilmente células sanguíneas distintas de células tumorales en la muestra derivada de sangre hasta aproximadamente 1/2.000. La cantidad de adición del agente de agregación de células en la muestra derivada de sangre puede establecerse a un intervalo preferible de 25 µl a 150 µl para retirar fácilmente células sanguíneas distintas de células tumorales hasta aproximadamente 1/50.000 células. De nuevo, la tasa de recuperación de células tumorales fue alta.

Es probable que se espere que la recuperación de células tumorales presentes únicamente en una cantidad traza en una muestra derivada de sangre con alta pureza mejore la eficiencia y precisión de la detección de células tumorales usando un citómetro de flujo o permita realizar la operación de analizar mediante citología células tumorales con microscopio de manera eficiente y con alta precisión. Además, el dispositivo para la concentración y separación de células tumorales según la presente invención puede recuperar células tumorales a una alta tasa de recuperación y con alta pureza mediante una operación sencilla y, por tanto, probablemente

puede contribuir a desarrollar un nuevo agente terapéutico eficaz para tumores y ayudar a encontrar una nueva diana terapéutica y de diagnóstico.

Lista de signos de referencia

- 5 1 Dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes
- 2 Cuerpo de recipiente
- 10 3 Agente de separación de células

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes presentes en una muestra derivada de sangre, que comprende:
- 5 un recipiente (2) en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo;
- un agente (3) de separación de células con propiedad tixotrópica alojado en el recipiente (2) en forma de tubo y que puede separar células tumorales a partir de células sanguíneas distintas de las células tumorales tras centrifugación,
- 10 conteniendo el agente (3) de separación de células un componente líquido y un polvo inorgánico,
- en el que el componente líquido es uno o más seleccionados de uno basado en silicona, basado en copolímero de α -olefina-diéster de fumarato, basado en acrílico, basado en poliéster, basado en copolímero de sebacato/2,2-dimetil-1,3-propanodiol/1,2-propanodiol, basado en poliéter-poliuretano, basado en poliéter-éster, y una mezcla de líquido/líquido o sólido/líquido, siendo la mezcla una mezcla de polímero de poli- α -pineno e hidrocarburo clorado, una mezcla líquida de polibuteno clorado y un compuesto líquido, una mezcla líquida de trifluoruro de cloruro de etileno, un éster alquílico de ácido benceno-policarboxílico y un polioxialquilenglicol, o una mezcla
- 15 líquida de oligómero de ciclopentadieno y un éster de ftalato, y
- el polvo inorgánico es uno o más seleccionados de polvos finos basados en dióxido de silicio, un mineral de arcilla compuesto por bentonita o esmectita, polvos finos basados en óxido de titanio y polvos finos basados en alúmina,
- 25 caracterizado porque el dispositivo para la concentración y separación de células tumorales circulantes comprende además un agente de agregación de células que puede agregar además de manera selectiva células sanguíneas distintas de las células tumorales, y el agente (3) de separación de células tiene una densidad relativa que oscila entre 1,050 y 1,080.
- 30
2. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la reivindicación 1, en el que el agente (3) de separación de células tiene una densidad relativa que oscila entre 1,055 y 1,080.
3. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la reivindicación 1, en el que el agente (3) de separación de células tiene una densidad relativa que oscila entre 1,065 y 1,077.
- 35
4. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente (3) de separación de células comprende un polialquilenglicol con un peso molecular promedio en número de 700 o más como agente que confiere una propiedad tixotrópica y el polialquilenglicol se combina a una concentración del 5 % en peso o menos basándose en la totalidad del agente de separación de células.
- 40
5. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la reivindicación 1, que comprende además un anticoagulante sanguíneo alojado en el recipiente en forma de tubo.
- 45
6. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la reivindicación 1, en el que el agente de agregación de células es un anticuerpo que tiene la capacidad para formar un complejo inmunitario.
- 50
7. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo como agente de agregación de células comprende tanto un sitio de reconocimiento de antígeno que puede unirse a un antígeno característico de la superficie de leucocitos como un sitio de reconocimiento de antígeno que puede unirse a un antígeno característico de la superficie de eritrocitos.
- 55
8. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente de agregación de células se añade de modo que la cantidad añadida es de 25 a 150 μ l basándose en 1 ml de una muestra derivada de sangre.
- 60
9. Dispositivo (1) para la concentración y separación de células tumorales circulantes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la abertura del recipiente en forma de tubo con fondo está al menos parcialmente sellada mediante un tapón configurado para poder perforarse y el interior del mismo está despresurizado.
- 65
10. Método para concentrar y separar células tumorales circulantes en una muestra derivada de sangre, que comprende:

- 5 (1) una etapa de dejar que una muestra derivada de sangre, un agente de agregación de células para agregar de manera selectiva células sanguíneas distintas de células tumorales y precipitar lo resultante mediante una operación de centrifugación, y un anticoagulante sanguíneo, coexistan en un recipiente en forma de tubo con fondo cerrado en un extremo y abierto en el otro extremo, en el que está alojado un agente de separación de células con propiedades tixotrópicas y permitir la separación de las células tumorales a partir de células sanguíneas distintas de las células tumorales mediante una operación de centrifugación;
- 10 (2) una etapa de centrifugar el recipiente para formar un reparto del agente de separación de células entre las células tumorales y otras células sanguíneas; y
- (3) una etapa de recuperar las células tumorales concentradas y separadas en plasma por encima del reparto, caracterizado porque
- 15 el agente (3) de separación de células contiene un componente líquido y un polvo inorgánico, y tiene una densidad relativa que oscila entre 1,050 y 1,080,
- 20 en el que el componente líquido es uno o más seleccionados de uno basado en silicona, basado en copolímero de α -olefina-diéster de fumarato, basado en acrílico, basado en poliéster, basado en copolímero de sebacato/2,2-dimetil-1,3-propanodiol/1,2-propanodiol, basado en poliéter-poliuretano, basado en poliéter-éster y una mezcla de líquido/líquido o sólido/líquido, siendo la mezcla una mezcla de polímero de poli- α -pineno e hidrocarburo clorado, una mezcla líquida de polibuteno clorado y un compuesto líquido, una mezcla líquida de trifluoruro de cloruro de etileno, un éster alquílico de ácido benceno-policarboxílico y un polioxialquilenglicol, o una mezcla líquida de oligómero de ciclopentadieno y un éster de ftalato, y
- 25 el polvo inorgánico es uno o más seleccionados de polvos finos basados en dióxido de silicio, un mineral de arcilla compuesto por bentonita o esmectita, polvos finos basados en óxido de titanio y polvos finos basados en alúmina.

[FIG. 1]

