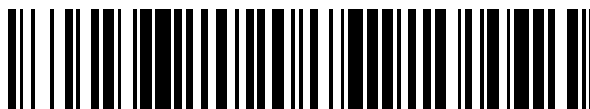


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 078**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2009** **PCT/US2009/044510**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009** **WO2009143149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2009** **E 09751377 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016** **EP 2288919**

54 Título: **Imagen mejorada de células raras enriquecidas inmunomagnéticamente**

30 Prioridad:

**19.05.2008 US 54219 P**

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

**20.06.2017**

73 Titular/es:

**JANSSEN DIAGNOSTICS, LLC (100.0%)**

**700 US Highway 202**

**Raritan, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**SCHOLTENS, TYCHO, M.;**

**SCHREUDER, FREDERIK;**

**GREVE, JAN;**

**TIBBE, ARJAN y**

**TERSTAPPEN, LEON, W., M., M.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 618 078 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).

**Imagen mejorada de células raras enriquecidas inmunomagnéticamente****DESCRIPCIÓN****5 Antecedentes**

La presente invención se refiere a aparatos y métodos mejorados para la realización de análisis cualitativos y cuantitativos de especímenes biológicos microscópicos. En particular, la invención se refiere a dichos aparatos y métodos para aislar, recoger, inmovilizar y / o analizar especímenes o sustancias biológicos microscópicos o sustancias que son susceptibles a unión inmuno-específica o inespecífica con partículas de respuesta magnéticas que tienen un agente de unión para la producción de especies marcadas magnéticamente dentro de un medio fluido. Tal como se usa en el presente documento, los términos tales como "especimen marcado magnéticamente" harán referencia a dichos especímenes o sustancias biológicos de interés en investigación que son susceptibles a dicho marcaje magnético.

La patente de Estados Unidos n.º 5.985.153 describe un aparato y un método en el que se usa un gradiente magnético externo para atraer especímenes diana marcados magnéticamente presentes en una cámara de recogida a una de sus superficies y en el que se emplea un gradiente magnético interno para obtener una alineación precisa de dichos especímenes en dicha superficie. El movimiento de los especímenes biológicos marcados magnéticamente hacia la superficie de recogida se obtiene aplicando un gradiente magnético vertical para mover los especímenes biológicos marcados magnéticamente a la superficie de recogida. La superficie de recogida está provista de una estructura de captura ferromagnética, tal como una pluralidad de líneas ferromagnéticas soportadas sobre una cara ópticamente transparente (visualización) de una cámara de muestra.

Una vez que los especímenes biológicos marcados magnéticamente han sido atraídos suficientemente cerca de la superficie por el gradiente aplicado externamente, caen bajo la influencia de un intenso gradiente local producido por la estructura de captura ferromagnética y se inmovilizan en posiciones lateralmente adyacentes a la misma. El gradiente local supera, preferiblemente, las fuerzas de adhesión que pueden fijar los especímenes biológicos a la superficie transparente después de que chocan con la superficie. Como alternativa, la adhesividad de la superficie debe ser lo suficientemente débil como para permitir que la fuerza magnética horizontal para mover los especímenes biológicos marcados magnéticamente hacia las estructuras ferromagnéticas. La suavidad y la naturaleza hidrófoba o hidrófila de la superficie son factores que pueden influir sobre el material elegido para la superficie de captura o el tratamiento de esta superficie para obtener una superficie resbaladiza.

En los documentos U.S. 10/733829 y U.S. 6,790,366 se describen métodos y aparatos para la separación, inmovilización, y cuantificación de sustancias biológicas en un espécimen de fluido, que incorpora los principios del gradiente aplicado externamente descrito anteriormente e incorpora además una estructura de captura magnética de gradiente interno alto en la pared de recogida transparente. La estructura de captura fomenta una alineación uniforme de las sustancias biológicas capturadas para el análisis cuantitativo con técnicas de enumeración automatizadas.

En el documento US 11/447562 (US 2006/257847) se describen pequeñas ranuras en forma de V en el lado del fluido de la cara ópticamente transparente (de visualización) de la cámara para alinear los especímenes diana para el análisis óptico automatizado. Las pequeñas ranuras en forma de V en el lado del fluido de la cara ópticamente transparente (visualización) de la cámara, y con la dilución óptima de los especímenes marcados magnéticamente, proporciona una superficie de alineación para el análisis óptico automatizado. Los especímenes marcados magnéticamente y las partículas magnéticas no unidas se mueven hacia la superficie interior de la cara de visión de la cámara, bajo la influencia del gradiente magnético aplicado externamente. Cuando se acercan a la superficie, entran en contacto con la pendiente de la ranura en forma de V, obligando a que los especímenes marcados magnéticamente y las partículas magnéticas no unidas se muevan a la parte superior de la ranura.

En el documento US 11/344757 se describen un dispositivo y un método para la recogida automatizada y el análisis de la imagen de las células diana raras marcadas de manera que se puedan detectar. Estas células raras marcadas magnéticamente se someten a obtención de imágenes de integración de retraso de tiempo (TDI) en la Plataforma CellTracks. Sin embargo, al evaluar las células tumorales circulantes (CTC) en la sangre de pacientes con cáncer con el fin establecer una correlación con la actividad de la enfermedad, las partículas magnéticas no unidas que han sobrado de la separación inmunomagnética distorsionarán la imagen e interferirán con la confirmación de una diana capturada, tal como una CTC.

La presente invención proporciona un diseño de ranura pequeña que permite la retirada completa de las partículas magnéticas no unidas en el análisis de células raras marcadas utilizando TDI en la plataforma CellTracks.

El documento WO 2005/027037 se refiere a dispositivos y métodos para obtener imágenes de objetos mediante integración de retraso de tiempo. Tibbe et al. (Nat. Biotech., 1999) tratar el seguimiento óptico y la detección de células alineadas e inmunomagnéticamente seleccionadas.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 es un diagrama esquemático de la estructura de alineación de las células.

La figura 2 muestra una imagen de la huella de PDMS utilizando un microscopio electrónico de barrido con las superficies de alineación y de imagen suaves.

La figura 3 muestra el espectro de transmisión de una plancha de PDMS a 1,3 mm y una plancha de PMMA con un espesor de 0,5 mm en comparación con un portaobjetos típico de vidrio de 1,0 mm de espesor.

La figura 4 espécimen el efecto de un exceso de partículas magnéticas no unidas sobre la intensidad de la imagen. El aumento de los niveles de ferrofluido EpCAM da lugar a una disminución de la intensidad de la imagen y a un incremento en la variación en la evaluación de la intensidad.

La figura 5 espécimen la diferencia en las intensidades totales con y sin 40 ug/ml de ferrofluido presente. La distribución es peor con el ferrofluido presente.

La figura 6 muestra la imagen combinada de campo claro, DAPI y PE que muestra células SKBR3 alineadas.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La invención proporciona un método para analizar ópticamente células raras suspendidas en un medio fluido utilizando una muestra de sangre de un paciente sospechoso de tener cáncer, en el que el método comprende: (a) mezclar dicha muestra de sangre con partículas de ferrofluido unidas a un anticuerpo específico para el antígeno EpCAM sobre la superficie de las células epiteliales; (b) separar el ferrofluido no unido del ferrofluido unido; y (c) visualizar los componentes magnéticamente sensibles en la muestra de sangre usando la integración de retraso de tiempo en una cámara de visualización en el que dichos componentes se distribuyen uniformemente dentro de la estructura de alineación preformada a lo largo de la superficie de visualización sobre la superficie interior de la cara ópticamente transparente de dicha cámara.

Se sabe que las células tumorales circulantes (CTC) en la sangre de pacientes con cáncer se correlacionan con la actividad de la enfermedad. La plataforma CellTracks proporciona un enriquecimiento y análisis de imagen de las células raras sospechosas para la enumeración y la correlación con el estado de la enfermedad. Objetivos tales como células, desechos celulares y componentes celulares se recogen contra de una superficie de recogida de un vaso, sin la posterior alineación adyacente a una estructura de recogida ferromagnética. Estas células incluyen glóbulos blancos, células de origen epitelial, células endoteliales, células fúngicas y células bacterianas. La superficie de recogida está orientada perpendicular a un gradiente de campo magnético producido por los imanes externos. La imagen resultante incluye nanopartículas magnéticas y especímenes biológicos marcados magnéticamente, recogidos en una distribución sustancialmente homogénea en la cara ópticamente transparente de la cámara, mientras que las entidades no seleccionadas se mantienen debajo, en el medio fluido.

La incorporación de Integración de retraso de tiempo (documento US 11/344757) en la plataforma CellTracks en el análisis de células raras se utiliza para detectar y caracterizar rápidamente las CTC. La separación inmunomagnética de las células raras (CTC) diana se logra mediante la selección de EpCAM positivo. Las células circulantes que expresan el antígeno para la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) se seleccionan mediante el anticuerpo monoclonal específico o EpCAM y se unen covalentemente a nanopartículas magnéticas. El complejo se separa de los componentes de la sangre restantes cuando se expone a un campo magnético.

El análisis posterior de la diana capturada se determina mediante una serie de marcaje fluorescente de los componentes dentro de la célula. El colorante fluorescente DAPI se utiliza para marcar los núcleos de las CTC y los leucocitos seleccionados no específicamente, el citoesqueleto de las CTC se marca con citoqueratina-PE y los leucocitos con CD45-APC. Las células marcadas se manipulan magnéticamente para que se alineen a lo largo de una superficie de análisis. Sin embargo, en este sistema, las partículas magnéticas no unidas que quedan de la separación inmunomagnética causarán distorsión de la imagen y reducirán la capacidad para confirmar la presencia de una CTC.

Para proporcionar una recogida espacialmente modelada de especímenes diana para el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras biológicas microscópicas, la presente invención se refiere a la utilización de estructuras premoldeadas sobre la superficie interior de la cámara de formación de imágenes. Generalmente, las ranuras premoldeadas son ranuras largas en forma de V, pre-moldeadas en la parte interior de la superficie de visualización en la cámara de formación de imágenes. Estas estructuras proporcionan una alineación de las células tan buena o incluso mejor que las líneas de Ni notificadas previamente. Adicionalmente, están hechas de un material altamente transparente, ópticamente adecuado para obtener imágenes de toda la célula.

La figura 1 ilustra el principio de alineación de las células usando las ranuras de la presente invención. El movimiento de células inducido magnéticamente dentro de la cámara se produce en presencia de un gradiente magnético. En el presente documento, las células marcadas magnéticamente chocarán con la superficie inclinada de la estructura (superficie de alineación) y se deslizarán en la parte superior de la ranura (superficie de formación de imágenes indicada) o golpearán directamente la parte superior de la superficie de formación de imágenes. En cualquier situación, las células se alinearán en la ranura, lo que permite la consiguiente formación de imágenes.

A fin de que se produzca un movimiento suficiente a lo largo de la superficie inclinada de la ranura, la superficie debe ser plana e impedir a las células que se peguen a las paredes. Para conseguir un diseño preciso suave, se utilizan tecnologías de grabado de obleas. Sin embargo, debido a los gastos y a los requisitos ópticos, las obleas de silicio no son adecuadas, en su lugar, el moldeado con réplica de polidimetilsiloxano (PDMS) proporciona una composición que cumplirá estos requisitos. Las composiciones que cumplan este criterio también se consideran en la presente invención. Las estructuras, grabadas en una oblea de silicio, son el inverso del eventual diseño y proporcionan el molde de PDMS con la forma correcta cuando se vierten sobre el molde de silicio. Después del curado, esta forma se corta en dimensiones que permitirán el reemplazo de la superficie de vidrio de la cámara de formación de imágenes.

El grabado se puede realizar en cualquier material ópticamente transparente que se puede utilizar en la fabricación de la cámara. Por ejemplo, las obleas de silicio se pueden utilizar en el grabado debido a la facilidad de precisión, los detalles finos y que son fácilmente reproducibles. Cualquier material con características similares y conocido en la técnica se considera en la presente invención. El grabado de la estructura utiliza dos técnicas de grabado habituales. En primer lugar, se crea una máscara de grabado necesaria para grabar las ranuras. Esta máscara se crea utilizando grabado BHF (ácido fluorhídrico tamponado). Una vez completado el grabado BHF, se dejan capas finas de SiO<sub>2</sub> sobre la oblea de silicio en lugares en los que no se debe grabar la ranura. También se usa grabado anisotrópico para grabar las ranuras. En el presente documento se usa KOH como agente de grabado. Cuando este proceso se aplica a una oblea orientada correctamente, se graban las ranuras en V, limitada por el plano de cristal de la oblea de silicio. En consecuencia, se produce un ángulo de grabado altamente reproducible y constante. El ángulo depende de la orientación de la oblea con una realización, como se muestra en la Figura 1 en 70,5 grados. Otra técnica es el grabado iónico reactivo profundo (DRIE). Mediante el uso de esta técnica, es posible grabar estructuras con una relación de aspecto alta (relación entre la longitud y la anchura de la estructura). El DRIE alterna cíclicamente entre las etapas de grabado y de deposición que forman paredes laterales escalonadas.

El moldeo de PDMS se utiliza para obtener una huella positiva en la oblea fabricada. El PDMS o polidimetilsiloxano (Dow Corning (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, EE.UU.) es un polímero que contiene el enlace de siloxano entre Si (silicio) y O (oxígeno). Las moléculas de los polímeros están unidas entre sí para formar polímeros más largos con un número promedio de aproximadamente 50 a 100.

El PDMS final se obtiene con la adición de un agente reticulante. El agente reticulante se conecta con los polímeros para formar largas redes de polímeros, lo que da lugar a un material transparente, elástico, químicamente inerte y estable térmicamente. Después de la polimerización, el PDMS forma una sustancia flexible transparente que se adhiere a muy pocos materiales y no es higroscópica, lo que impide cualquier adherencia de las células a los lados debido al hecho de que el PDMS se adhiere a muy pocos materiales. Además, es térmicamente estable y transparente de aproximadamente 300 a 900 nm. Estas características son todas ellas importantes para su uso en un sistema de obtención de imágenes fluorescentes y la transmisión de luz visible. Después de la formación, las ranuras se cortan en las dimensiones de la cara de visualización de la cámara.

Con el fin de eliminar la mayor parte del exceso de la partícula magnética con una pérdida de células mínima, se desarrolló la estructura de alineación de las células mostrada en la figura 1 para la superficie de visualización. La figura 1 proporciona una visión general de la estructura de alineación de las células. Se desarrolló una microestructura de PDMS mostrada en la figura 1 para alinear las células en áreas predeterminadas y reducir el tiempo de formación de imágenes. El diseño consiste en un chip de PDMS de 30 x 2,7 mm<sup>2</sup> que contiene 6 canales que tiene 80 µm de anchura y 30 mm de longitud. Estos chip de PDMS se imprimen partir de un molde de la oblea. Los inventores eligieron PDMS debido a sus excelentes propiedades de transmisión, sus capacidades de replicación y su facilidad de uso. Esta configuración reduce el tiempo de formación de imágenes para una muestra de 32 a 12 minutos.

La figura 2 muestra una micrografía electrónica de barrido de una huella de PDMS que tiene la estructura utilizada en la presente invención. La imagen muestra las lisas superficies de alineación y de formación de imagen en la superficie de visualización.

La Figura 3 compara el espectro de transmisión del espesor del PDMS utilizado en la presente invención con un portaobjetos de microscopio de vidrio típico. Con un grosor de 0,5 mm, el PMMA realiza un seguimiento de la transmisión de un portaobjetos de microscopio de vidrio entre 400 nm y 800 nm de longitud de onda.

El exceso de partículas magnéticas conjugadas (EpCAM-ferrofluido) se utiliza para asegurar la máxima recuperación de CTC. Sin embargo, durante la formación de imágenes, el exceso de ferrofluido forma agregados alargados en la superficie de formación de imágenes, lo que influye sobre la obtención de imágenes cuantitativa y cualitativa de las células. La figura 4 espécimen el efecto del exceso de partículas magnéticas no unidas sobre la formación de imágenes. La intensidad nuclear total cae bruscamente para concentraciones de ferrofluido superiores a 2 µg / ml (círculos), mientras que el CV se eleva a 40 % para las concentraciones que se encuentran normalmente en las muestras de pacientes, tales como 40 µg / ml (triángulos).

El efecto del exceso de ferrofluido sobre la formación des imágenes y los resultados del método de eliminación se

muestran en la Figura 5. Las células SKBR 3 produjeron imágenes con concentraciones de ferrofluido de 40  $\mu\text{g}$  / ml y con 0  $\mu\text{g}$  / ml de ferrofluido. La distribución de las intensidades totales es significativamente peor para la muestra con un exceso de ferrofluido.

5 La presente invención evita este problema y proporciona un método que hace girar la muestra dentro de un tubo cónico a 900 rpm. Esto obliga el movimiento hacia fuera de todas las células en el tubo. Las partículas de ferrofluido son mucho más pequeñas (~ 175 nm de diámetro) y permanecerán distribuidas al azar en la muestra. Después de varios minutos, el 60 % de la espécimen se aspira automáticamente de la parte inferior del tubo en rotación. Este proceso se repite 5 veces y las células SKBR-3 se alinean a lo largo de la superficie de visualización utilizando la estructura de PDMS en la presente invención. La Figura 6 muestra la imagen combinada de campo brillante, DAPI y PE de las células SKBR-3 alineadas a lo largo de la superficie de visualización.

Utilizando el método de la presente invención, se puede retirar del 95 % al 97 % del exceso de ferrofluido, disminuyendo la concentración final en una muestra del paciente a menos de 2  $\mu\text{g}$  / ml. Esto elimina el exceso de ferrofluido suficiente para realizar mediciones cuantitativas óptimas y mejoras considerables en la calidad de las imágenes. Asimismo, la recuperación de CTC varió entre 95 % y 99 %. En consecuencia, la eliminación de ferrofluido, utilizando los métodos de la presente invención, proporciona una eliminación suficiente del exceso de ferrofluido para mediciones cuantitativas óptimas. La calidad de las imágenes se ha mejorado y la imagen de campo claro es posible para obtener datos morfológicos adicionales en CTC individuales.

Si bien se han descrito algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención y se ilustran específicamente anteriormente, no se pretende que la invención esté limitada a dichas realizaciones.

# REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar ópticamente células raras suspendidas en un medio fluido utilizando una muestra de sangre de un paciente sospechoso de tener cáncer, en el que el método comprende:

- a. mezclar dicha muestra de sangre con partículas de ferrofluido unidas a un anticuerpo específico para el antígeno EpCAM sobre la superficie de las células epiteliales;
- b. separar el ferrofluido no unido del ferrofluido unido; y
- c. visualizar los componentes magnéticamente sensibles en la muestra de de sangre usando integración de retraso de tiempo en una cámara de visualización, en la que dichos componentes se distribuyen uniformemente dentro de la estructura de alineación preformada a lo largo de la superficie de visualización en la superficie interior de la cara ópticamente transparente de dicha cámara.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha estructura de alineación contiene ranuras que tienen una superficie de visualización de imágenes y una superficie de alineación.

3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha superficie de visualización de imagen es de 80 µm.

4. El método de la reivindicación 1, en el que las estructuras de alineación son ranuras largas en forma de V que están premoldeadas en la parte interior de la superficie de visualización.

5. El métodos de la reivindicación 1, en el que dicha de ferrofluido no unido comprende:

- a. hacer girar la muestra de sangre con partículas de ferrofluido en un tubo cónico a 900 rpm;
- b. aspirar la muestra desde la parte inferior de dicho tubo cónico; y
- c. repetir las etapas (a) y (b) 5 veces.

6. El método de la reivindicación 1, en el que dicha visualización incluye, además, confirmar la célula epitelial unida como una CTC.

7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha confirmación comprende:

- a. primer marcaje positivo del núcleo con DAPI;
- b. segundo marcaje positivo del citoesqueleto con citoqueratina-PE; y
- c. tercer marcaje positivo de leucocitos con CD45-APC.

8. El método de la reivindicación 7, que incluye además el examen de campo claro de las CTC capturadas.

FIGURA 1

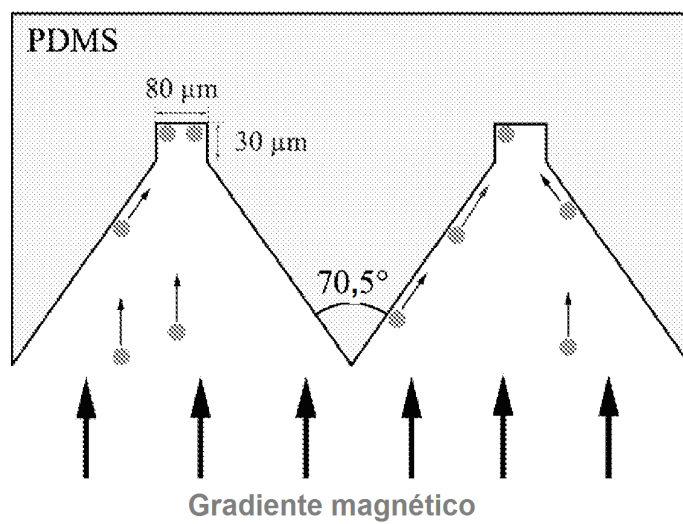


FIGURA 2

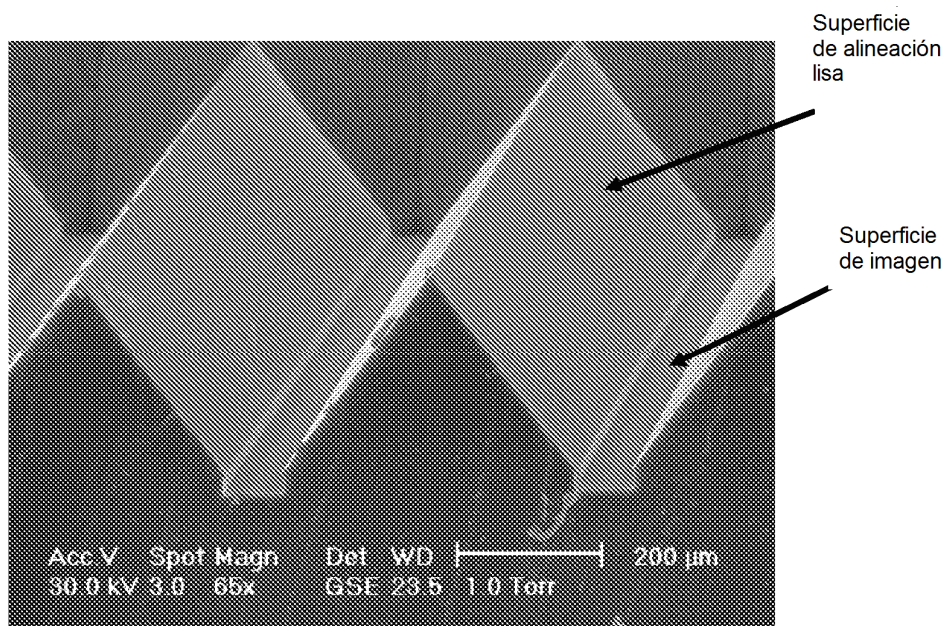


FIGURA 3

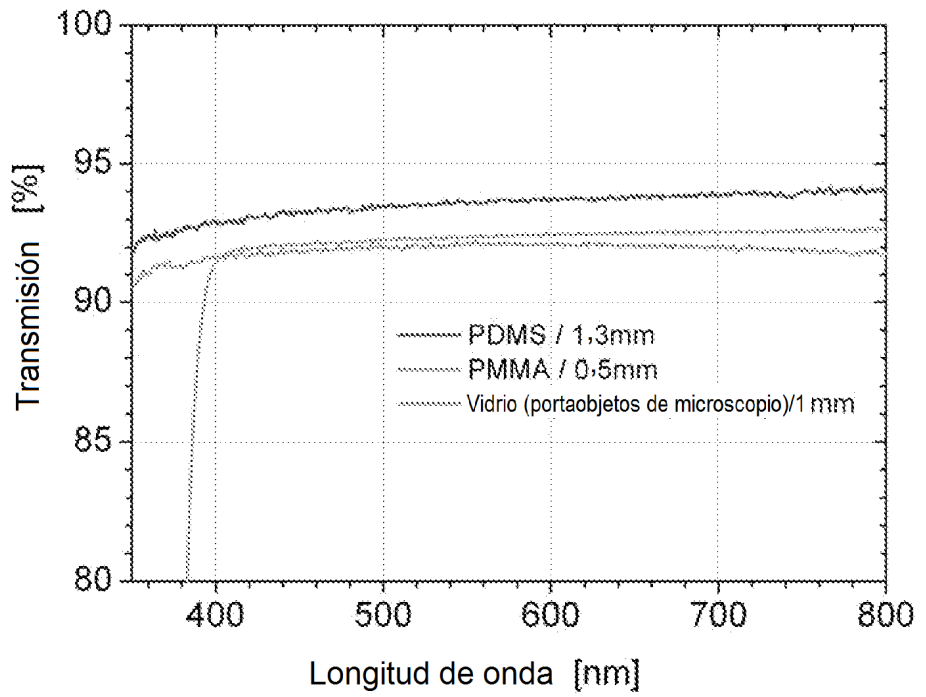


FIGURA 4

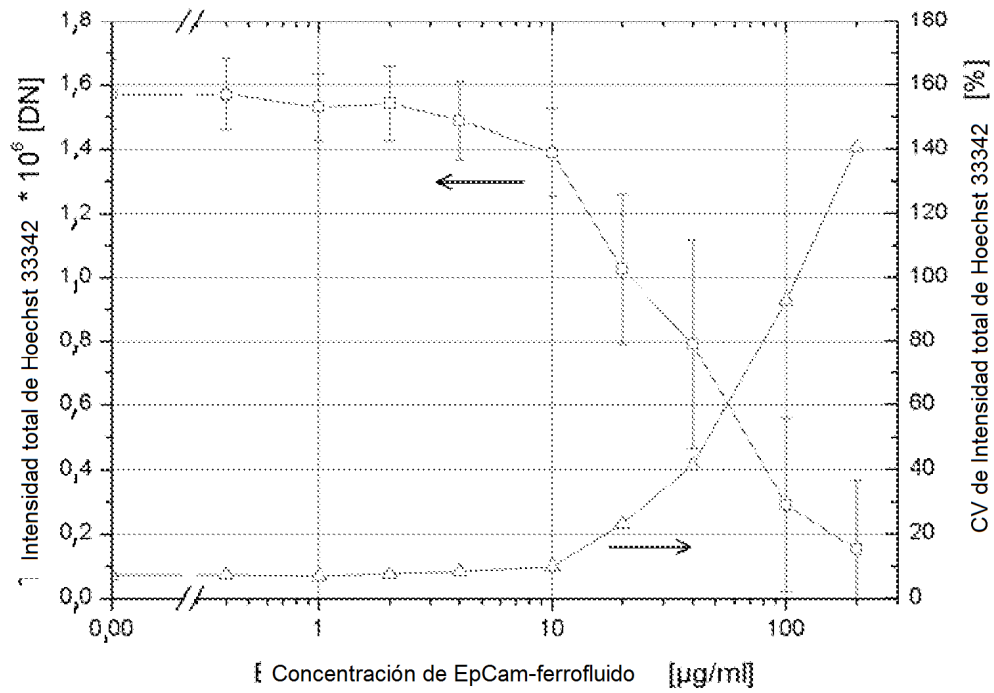


**FIGURA 5**

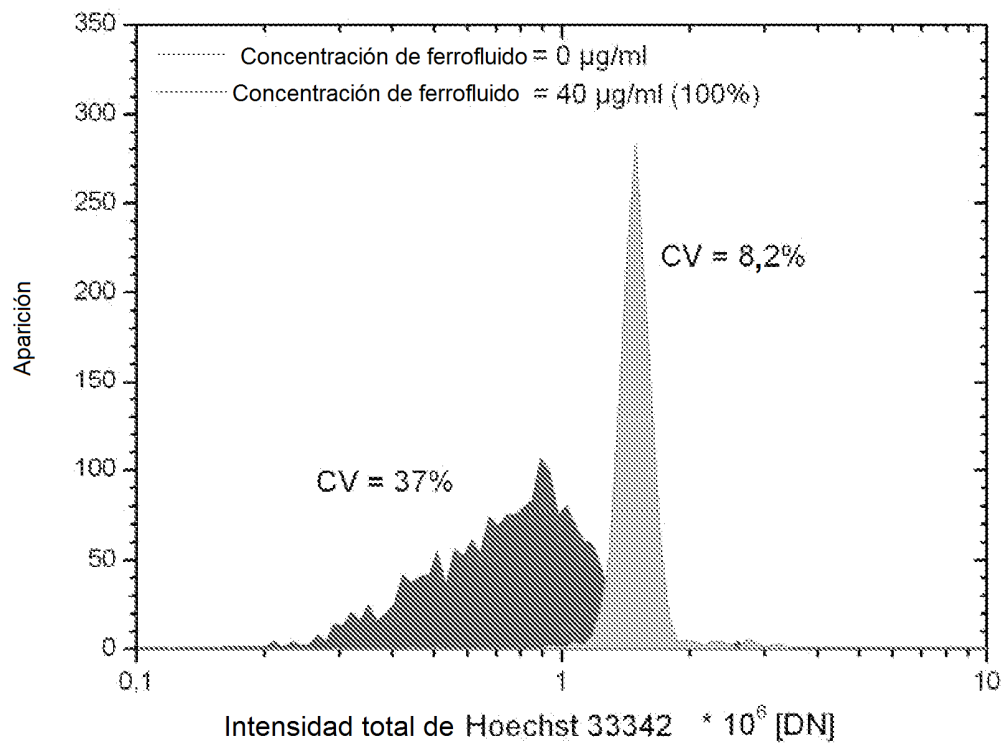


**FIGURA 6**

