

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 224**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/027701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14152758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14721102 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020** **EP 2972359**

54 Título: **Enriquecimiento de células tumorales circulantes agotando glóbulos blancos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361787611 P

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

28.07.2021

73 Titular/es:

MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via G. di Vittorio, 21 B/3
40013 Castel Maggiore (BO), IT

72 Inventor/es:

RAO, GALLA CHANDRA;
FOULK, BRAD;
SMIRNOV, DENIS y
NIELSEN, KARL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 846 224 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

Enriquecimiento de células tumorales circulantes agotando glóbulos blancos

5 Antecedentes

Las células tumorales circulantes (CTC) de origen epitelial están presentes en la sangre de pacientes con carcinoma a una frecuencia muy baja (<10/ml de sangre). La detección de células tumorales en circulación puede tener importancia para la gestión de enfermedades cancerosas. La detección de células de baja frecuencia requiere un gran volumen de sangre para su procesamiento. Para enumerar y caracterizar las CTC de grandes volúmenes de sangre, es necesario el enriquecimiento de las CTC.

Hay varios métodos disponibles para enriquecer las CTC en base al tamaño, la densidad y el antígeno. El producto comercial bien establecido para el enriquecimiento de células raras es el ensayo Veridex CellSearch CTC. El ensayo CellSearch CTC utiliza partículas magnéticas conjugadas con una molécula de adhesión celular antiepitelial (EpCAM) para capturar CTC de 7,5 ml de sangre. Las muestras enriquecidas se tiñen con DAPI, un colorante de ácido nucleico, para identificar células nucleadas, anticuerpos anti-citoqueratina conjugados con ficoeritrina para identificar células de origen epitelial, y anticuerpos anti-leucocitos conjugados con alifocianina para identificar todos los leucocitos. Las muestras se analizan en un CellTracks Analyzer II para la enumeración de CTC.

La muestra final después del enriquecimiento contiene CTC y una pequeña cantidad de glóbulos blancos (1000-5000 células). El método de enriquecimiento elimina más del 99% de los glóbulos blancos (WBC). La presencia de glóbulos blancos durante el recuento de células raras no es un problema y no afecta negativamente al proceso. Los WBC pueden marcarse con un marcador de leucocitos (CD45) para diferenciar los WBC de las CTC. Sin embargo, si se desea caracterizar molecularmente las CTC enumeradas para definir su genotipo mediante la amplificación de los ácidos nucleicos presentes en tales CTC, la presencia de glóbulos blancos afecta negativamente a esta caracterización. Dado que la proporción de glóbulos blancos en una fracción enumerada es alta en comparación con el número de CTC y los ácidos nucleicos de tales glóbulos blancos se amplifican con las CTC, es difícil determinar la fuente de los ácidos nucleicos, concretamente las CTC o glóbulos blancos. Como resultado, una purificación adicional de las muestras enriquecidas para eliminar los glóbulos blancos (disminuir la proporción de glóbulos blancos a CTC) sería un hito importante para el desarrollo de herramientas de caracterización molecular fiables. Esta necesidad se satisface mediante la siguiente invención.

Yang et al. (Biotechnology Bioengineering 1 de febrero de 2009;102(2):521-34) analiza la optimización de un proceso de enriquecimiento para hacer circular células tumorales de la sangre de pacientes con cáncer de cabeza y cuello mediante el agotamiento de células normales. Chen et al. (Lab Chip. 7 de febrero de 2011 7;11(3):474-83) analiza la separación y detección de células raras en un disco microfluídico mediante selección negativa. Peeters et al. (British Journal of Cancer. 2 de abril de 2013;108(6):1358-67) analiza el aislamiento semiautomatizado y la caracterización molecular de células tumorales individuales o altamente purificadas a partir de muestras de sangre enriquecidas con CellSearch usando clasificación celular dielectroforética.

No hay métodos disponibles para eliminar los glóbulos blancos después del enriquecimiento de CTC. Requiere un método único ya que no se usará el mismo principio usado para el enriquecimiento de CTC. Por ejemplo, si el método de enriquecimiento en el primer paso usa el método inmunomagnético, debe usarse otro método además del método inmunomagnético.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para eliminar glóbulos blancos de una muestra que comprende células raras enriquecidas y glóbulos blancos, dicho método comprendiendo: (a) tratar dicha muestra enriquecida mediante métodos inmunomagnéticos y que comprende células raras enriquecidas marcadas con un marcador inmunomagnético y glóbulos blancos con un marcador de leucocitos que se conjuga con un hapteno en condiciones que marcan dichos glóbulos blancos con dicho marcador de leucocitos conjugado con el hapteno, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45; y (b) tratar la composición del paso (a) con un segundo medio que se adhiere a dichos glóbulos blancos marcados, y separar el segundo medio y sus glóbulos blancos marcados adheridos de la composición del paso (b), en donde las células raras enriquecidas se seleccionan del grupo que consiste de CTC, CEC, CMMC y CMC; y en donde el método para eliminar glóbulos blancos de una muestra enriquecida no comprende métodos inmunomagnéticos.

Además, la invención proporciona el uso de un kit para eliminar glóbulos blancos de una muestra que comprende células raras enriquecidas y glóbulos blancos, en donde dicho kit comprende un marcador de leucocitos que se conjuga con un hapteno y un segundo marcador, distinto del marcador de leucocitos, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45, y en donde el segundo marcador comprende anticuerpos contra el hapteno.

Además, la invención proporciona el uso de un kit para eliminar glóbulos blancos de una muestra que comprende células raras enriquecidas y glóbulos blancos, en donde dicho kit comprende reactivos para marcar inmunomagnéticamente las células raras y los glóbulos blancos, un marcador de leucocitos que se conjuga con un hapteno, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45, y un segundo marcador, distinto del marcador de leucocitos, en donde el segundo marcador comprende anticuerpos contra dichos haptenos.

Descripción detallada de los dibujos

- 10 Figura 1 Representación de la eliminación de glóbulos blancos basada en haptenos
- Figura 2 Análisis de los glóbulos blancos antes y después de la incubación con anti-FITC
- Figura 3 Porcentaje de eliminación de glóbulos blancos
- Figura 4 Medición molecular de muestras agotadas y no agotadas
- Figura 5 Detección después del agotamiento de CD45
- 15 Figura 6 Correlación entre las células Vcap enriquecidas con el agotamiento de glóbulos blancos y células Vcap cultivadas
- Figura 7 Efecto del agotamiento de las perlas.

Descripción detallada

20 Como se usa en la presente, "marcadores de leucocitos" se refieren a sustancias que marcan glóbulos blancos y no células raras. Ejemplos de marcadores de leucocitos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra CD 45, CD 19 CD15, glicoforina A, CD2, CD14, CD16, CE38 y CD66b. El marcador de leucocitos preferido es el anti CD45. Los haptenos incluyen, pero no se limitan a, colorante de fluoresceína ("FITC"), ficoeritrina ("PE"), alofocianina ("APC") y biotina. El hapteno preferido es FITC. Como se usa en la presente, el término anticuerpos incluye anticuerpos completos tanto monoclonales como policlonales, fragmentos de anticuerpos que se unen con ciertos haptenos, anticuerpos biespecíficos que se unen a ciertos haptenos. Los anticuerpos preferidos son los anticuerpos monoclonales.

30 Como se usa en la presente, "segundo medio" significa cualquier superficie que comprenda un segundo marcador, distinto de un marcador de leucocitos. Dicho segundo marcador se une al hapteno que está conjugado con el marcador de leucocitos. Los ejemplos de segundos marcadores incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra FITC, PE, APC. Los segundos marcadores preferidos son anticuerpos contra FITC. Ejemplos de superficies que pueden usarse son placas de microtitulación

35 Como se usa en la presente, "células raras" son células que tienen una frecuencia baja en sangre. Los ejemplos de células raras incluyen, pero no se limitan a, células tumorales circulantes (CTC), células endoteliales circulantes (CEC), células de mieloma múltiple circulantes (CMMC) y células de melanoma circulantes (CMC). Las células raras preferidas son las CTC y las CEC, las células raras particularmente preferidas son las CTC. Pueden producirse fracciones enriquecidas de estas células raras a partir de sangre completa mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los métodos y reactivos divulgados en las siguientes patentes y solicitudes de patente: Patentes de Estados Unidos N° 7.901.950; 6.365.362, Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° US 2009/0136946; US 2013/0189675; US 2014/0011685. El método preferido para obtener CTC enriquecidas es mediante los métodos inmunomagnéticos divulgados en referencias como la Patente de Estados Unidos N° 6.365.362 y mediante los métodos de la línea de productos CELL SEARCH.

50 En la Figura 1 se muestra el principio de agotamiento de los glóbulos blancos de una fracción enriquecida de CTC. Las CTC y los glóbulos blancos están marcados con un ferrofluido anti-EpCAM y el glóbulo blanco está marcado con un hapteno conjugado con leucocitos, como se ilustra en la Figura 1.

55 Además, se describe en la presente un kit para eliminar los glóbulos blancos de una muestra que comprende células raras enriquecidas y glóbulos blancos en donde dicho kit comprende un marcador de leucocitos que está conjugado con un hapteno y un segundo marcador, distinto del marcador de leucocitos, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45, y en donde el segundo marcador comprende anticuerpos contra tales haptenos.

Todos los términos definidos tienen las mismas definiciones y ejemplos preferidos que se han descrito anteriormente.

60 Además, se describe en la presente un kit para eliminar glóbulos blancos de una muestra que comprende células raras enriquecidas y glóbulos blancos en donde dicho kit comprende reactivos para marcar inmunomagnéticamente las células raras y los glóbulos blancos, un marcador de leucocitos que está conjugado con un hapteno, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45, y un segundo marcador, distinto del marcador de leucocitos, en donde el segundo marcador comprende anticuerpos contra dichos haptenos.

Todos los términos definidos tienen las mismas definiciones y ejemplos preferidos que se han descrito anteriormente.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Agotamiento de glóbulos blancos usando anti CD45 recubierto en una placa de microtitulación

Este ejemplo muestra el agotamiento de los glóbulos blancos usando anti-CD45. El CD45 es un marcador de leucocitos común presente en los glóbulos blancos y se espera que todos los glóbulos blancos se una al anti-CD45. Usamos anti-CD45 para unir glóbulos blancos y eliminarlos específicamente de una mezcla de glóbulos blancos y CTC usando una fase sólida recubierta con anti-CD45. Se recubrió anti-CD45 a una fase sólida de la siguiente manera:

Se diluyó anti-CD45 (Veridex) a 50 µg/ml en tampón de bicarbonato de sodio 50 mM, pH 8,5. Luego, se añadieron 0,8 ml de solución de anticuerpo anti-CD45 a una placa de microtitulación de 6 pocillos, se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente (RT) seguido de una noche a 2-8° C. Después de la incubación durante la noche, se aspiró el anticuerpo anti-CD45 y los pocillos se bloquearon con 1 ml de PBS/BSA al 1% a RT durante 4 horas. Se aspiró el tampón y se enjuagaron los pocillos con 2 ml de PBS 2 veces. Después del enjuague, se aspiró todo el tampón y se secó la placa durante 1 hora. La placa se almacenó seca en una bolsa de plástico sellada a 2-8° C hasta su uso.

En este ejemplo, se realizaron dos experimentos para probar el principio de separar los glóbulos blancos de los no glóbulos blancos. En un estudio, se prepararon glóbulos blancos puros a partir de sangre completa después de lisar glóbulos rojos usando reactivo de lisis BD. Esta muestra se usó como control positivo. En otro estudio, se procesaron 7,5 ml de sangre en el sistema CellTracks AutoPrep usando el kit CellSearch CTC Profile. El kit CTC Profile contiene una molécula de adhesión celular antiepitelial (EpCAM) conjugada con partículas magnéticas de ferrofluido para la captura de células tumorales circulantes. Después del enriquecimiento de las células objetivo, las muestras se volvieron a suspender en 900 µl de tampón PBS/BSA al 1%. Las muestras enriquecidas contendrán células objetivo y también glóbulos blancos. Antes de que se añadiesen las muestras a los pocillos de la placa de microtitulación, la placa se llevó a temperatura ambiente (mínimo de 30 minutos), los pocillos se lavaron dos veces con 2 ml de PBS/BSA al 5%. Luego se aspiró el tampón de los pocillos antes de añadir la muestra. La muestra de ensayo de CTC de 900 µl y los glóbulos blancos puros de sangre completa se añadieron a dos pocillos separados de la placa. Después de una incubación de 1 hora con un mezclado suave cada 15 minutos, se retiraron 300 µl de sobrenadante para determinar el número de glóbulos blancos. El número de glóbulos blancos presentes en la muestra se determinó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson) usando la dispersión directa como umbral. Si los glóbulos blancos se unen al anti-CD45 en los pocillos, entonces el número de glóbulos blancos en el sobrenadante debe disminuirse en comparación con la muestra antes del paso de incubación. Las células no unidas deben estar en el sobrenadante. Los resultados se muestran en la Tabla 1a.

Tabla 1a: Números de glóbulos blancos antes y después de la incubación con anti CD45 recubierto en una placa de microtitulación

Muestra	WBC #		% de eliminación de WBC
	Antes de incubación con placa recubierta con anti-CD45	Después de incubación con placa recubierta con anti-CD45	
Glóbulos blancos sin ensayo de CTC	1000	200	80
Muestra de ensayo de CTC	1200	1300	0

Los resultados anteriores muestran que los glóbulos blancos puros pueden eliminarse añadiéndolos a la placa de microtitulación recubierta con anti-CD45. Sin embargo, se encontraron glóbulos blancos en el sobrenadante de la muestra de ensayo de CTC. Esto sugiere que los glóbulos blancos de la muestra de ensayo de CTC no se unieron al anti-CD45 recubierto en los pocillos. La diferencia entre las dos muestras es que los glóbulos blancos en la muestra del ensayo de CTC están marcados con partículas magnéticas de ferrofluido. Es posible que las partículas magnéticas de ferrofluido presentes en los glóbulos blancos impidan la unión al anti-CD45 en la placa debido al impedimento estérico. Para superar este problema, las muestras del ensayo de CTC se marcaron primero con anti-CD45 conjugado con un hapteno mediante un conector (ver los ejemplos). Las muestras que contenían glóbulos blancos premarcados con la etiqueta anti-CD45 se añadieron luego a una placa de microtitulación recubierta con anti-hapteno.

EJEMPLO 2: Recubrimiento de un isotiocianato anti-fluoresceína (FITC) a la placa de microtitulación

Se adquirió Anti-FITC de BD Biosciences y se diluyó a 50 µg/ml en bicarbonato de sodio 50 mM, pH 8,5. Se añadieron 800 µl de anti-FITC a placas de microtitulación de 6 pocillos, se incubó a RT durante 3 horas seguido a la

noche a 2-8° C. Después de incubación durante la noche, la placa se llevó a RT. Se aspiró el sobrenadante y luego se enjuagó la placa dos veces con PBS. Luego se bloquearon los pocillos con 1 ml de PBS/BSA al 1% durante 4 horas a RT. Se aspiró el tampón y se enjuagaron los pocillos con 2 ml de PBS 2 veces. Después del enjuague, se aspiró todo el tampón y se secó la placa durante 1 hora. La placa se almacenó seca en una bolsa de plástico sellada a 2-8° C hasta su uso. La placa se llevó a RT (mínimo 30 minutos) el día de su uso. Se añadieron 2 ml de PBS/BSA al 1% a los pocillos y se incubó durante 15 minutos. Después de la aspiración, la placa se enjuagó de nuevo con 2 ml de PBS/BSA al 1%. Se aspiró el tampón antes de añadir la muestra al pocillo.

EJEMPLO 3: Eliminación de glóbulos blancos de la muestra de ensayo de CTC donde los glóbulos blancos se marcan con anti-CD45 conjugado con FITC y una placa de microtitulación recubierta con anti-FITC

Se procesaron 7,5 ml de sangre con EDTA enriquecida con células SKBR3 en el AutoPrep usando el kit CellSearch CTC. Esta muestra enriquecida del ensayo de CTC se tiñó con anti-CD45-FITC a una concentración final de 2 ug/ml. El exceso de CD45-FITC se eliminó lavando la muestra 2 veces con 2 ml de PBS/BSA al 1% mediante separación magnética durante 15 minutos. La muestra final se volvió a suspender en 900 ul de PBS/BSA al 5% y luego se aplicó a los pocillos recubiertos con anti-FITC. Las muestras se incubaron durante 1 hora mezclando suavemente cada 15 minutos. Después de una hora, se retiraron 300 µl de sobrenadante de los pocillos y se determinó el número de glóbulos blancos y células SKBR3 mediante citómetro de flujo. Para detectar células SKBR3 mediante citometría de flujo, las células se marcaron con anti-Her2/neu conjugado con colorante de alofococianina (APC). Los glóbulos blancos se detectaron en el canal FITC ya que estaban marcados con anti-CD45-FITC. Las células detectadas antes y después de los agotamientos se muestran en la Figura 2.

La Figura 2 muestra el número de tumores y glóbulos blancos antes y después del agotamiento de los glóbulos blancos. El número de glóbulos blancos antes y después del agotamiento es 3594 y 354, respectivamente, lo que indica que aproximadamente el 90% de los glóbulos blancos se agotan de la muestra. Por otro lado, el número de células tumorales antes y después del agotamiento es 2094 y 1924, respectivamente, lo que indica que todas las células tumorales (>90%) están presentes en el sobrenadante. Este ejemplo muestra que los glóbulos blancos presentes en la muestra de ensayo de CTC después del enriquecimiento de las células tumorales pueden eliminarse usando la invención.

Esto se probó en 6 muestras y los resultados se muestran en la Figura 3. Los resultados muestran que pueden eliminarse más del 90% de los WBC con una pérdida mínima (<15%) de células tumorales (SKBR3).

EJEMPLO 4: Agotamiento de glóbulos blancos en ensayo de células endoteliales circulantes (CEC)

Este ejemplo muestra que el principio de agotamiento de WBC puede aplicarse a otros ensayos de células raras. El ensayo CellSearch CEC enriquece las CEC de la sangre usando el kit CellSearch CEC. El kit contiene anti-CD146 conjugado con partículas magnéticas de ferrofluido para la captura de CEC. El ensayo usa el sistema CellTracks AutoPrep para la preparación de muestras de manera muy similar al ensayo CTC. Aunque las CEC están presentes con una frecuencia baja en muestras de sangre normal sana, se elevan por varias afecciones, como cáncer, problemas cardiovasculares e infecciones.

El ensayo se usó para probar el efecto del principio de agotamiento en las CEC presentes a una frecuencia baja (1-20 células por prueba) además de la eficiencia de agotamiento de WBC.

Se procesaron 4 ml de sangre con EDTA en el sistema CellTracks AutoPrep usando el ensayo CellSearch CEC. Las células enriquecidas se tiñeron con colorante de ácido nucleico (DAPI) y anti-CD105 conjugado con colorante de ficoeritrina (PE) para identificar todas las células y CEC, respectivamente. En este ejemplo, se usó anti-CD45-FITC para marcar glóbulos blancos. Después del paso de tinción, la muestra se volvió a suspender en 320ul de tampón y se transfirió a un cartucho de análisis CellSearch para su análisis en el CellTracks Analyzer II. El CellTracks Analyzer II es un microscopio fluorescente de 4 colores que escanea en 4 colores diferentes, analiza imágenes y presenta imágenes que son positivas en DAPI y CD105-PE. Las células que son positivas para DAPI y CD105 y negativas para CD45 se cuentan como CEC. El número total de WBC presentes en la muestra se contó en base a la positividad de DAPI.

Para el paso de agotamiento, después del enriquecimiento y la tinción, las muestras se volvieron a suspender en 900 ul de PBS/BSA al 1%. Luego, las muestras se añadieron a la placa de microtitulación recubierta con anti-FITC como se describe en el ejemplo 4. Después de una hora, la muestra se aspiró y se concentró a 320 ul usando un separador magnético. La muestra (320ul) se transfirió luego a un cartucho para su análisis en CellTracks Analyzer II. El número de CEC y WBC se determinó como se ha descrito anteriormente. Se comparó el número de CEC y WBC antes y después del agotamiento de WBC. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 4a.

Tabla 4a: Número de CEC y WBC antes y después del agotamiento de WBC

Nº de Muestra	Nº de CEC		WBC#		Agotamiento de WBC (%)
	Antes del agotamiento de WBC	Después del agotamiento de WBC	Antes del Agotamiento	Después del Agotamiento	
D587	3	3	11,877	1,499	87.4
D598	2	6	12,116	3,663	69.8
D599	4	4	3,463	menos de 300	NA
D611-1	17	15	12,835	2,694	79.0
D611-2	17	12	12,427	3,307	73.4
Media	8.6	8	10544	2791	77.4

Los resultados muestran claramente que los WBC también pueden eliminarse (>75%) de las CEC después del enriquecimiento en el ensayo de CEC. Además, no hubo diferencia en los números de CEC (8,6 frente a 8) antes y después del agotamiento. Los datos indican que las células objetivo no se eliminan incluso cuando están presentes a una frecuencia muy baja (<20 células).

EJEMPLO 5: Mediciones moleculares de agotamiento de WBC en kit CellSearch Profile enriquecido

Muestras

Se procesó un duplicado de 7,5 ml de sangre con EDTA de 6 donantes sanos en AutoPrep usando un kit CellSearch CTC Profile modificado. El reactivo de PBS/Biotina en el kit Profile se complementó con anti-CD45-FITC a una concentración de reactivo final de 2 ug/ml para que el marcado de WBC tuviese lugar en el AutoPrep. Después del enriquecimiento de AutoPrep, un tubo de cada donante se sometió o al protocolo "Agotado" que eliminó los WBC de la muestra o al protocolo "No agotado" que sirve como control para medir la contaminación de WBC en la muestra sin el proceso de agotamiento.

Protocolo no agotado

Las muestras se retiran del AutoPrep y se colocan en un imán durante 15 minutos. El tampón se aspira y las células se lisan en tampón RLT (Qiagen).

Protocolo agotado

Después del enriquecimiento con AutoPre, se eliminó el exceso de CD45-FITC lavando la muestra 2 veces con 2 ml de PBS/BSA al 1% mediante separación magnética durante 15 minutos. La muestra final se volvió a suspender en 900 ul de PBS/BSA al 5% y luego se aplicó a los pocillos recubiertos con anti-FITC. Las muestras se incubaron durante 1 hora mezclando suavemente cada 15 minutos. Después de una hora, se retiraron 300 ul de sobrenadante de los pocillos y las células se colocaron en un imán durante 15 minutos. Se eliminó el tampón y las células se lisaron en tampón RLT (Qiagen).

Tanto para las muestras agotadas como para las no agotadas, el ARN se purificó usando el kit Qiagen AllPrep y se sometieron a transcripción inversa usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life Technologies). El ADN complementario se amplificó usando el kit TaqMan® PreAmp Master Mix (Life Technologies) y conjuntos de cebadores para los genes de la lista de la Tabla 5a. Se llevó a cabo PCR cuantitativa en las muestras amplificadas para dos genes que se sabe que se expresan en glóbulos blancos (CD45 (también conocido como PTPRC) y BST1) así como un gen constitutivo expresado (B-Actina). La eficacia del agotamiento de WBC se midió mediante la pérdida de WBC y señales de genes específicos constitutivos en la muestra agotada con respecto a la muestra no agotada.

En la Figura 4, los círculos y cuadrados representan mediciones individuales para las muestras no agotadas y agotadas respectivamente. Las líneas representan la medición media para cada tipo de muestra. El valor P representa los resultados de las pruebas T de Student realizadas entre las muestras agotadas y no agotadas para cada gen medido. Las pruebas T entre las muestras agotadas y no agotadas mostraron una pérdida significativa de genes constitutivos y específicos de WBC como resultado del agotamiento de CD45. Las mediciones de delta Ct medias de >2 ciclos indican una reducción >75% de las señales de WBC en las muestras agotadas de CD45.

Tabla 5a....Genes probados con el método de agotamiento de CD45:

ID de conjunto de Sondas Affymetrix	Símbolo del gen	Título del gen
205648_at	WNT2	miembro de la familia del sitio de integración de MMTV de tipo sin alas 2
208711_s_at	CCND1	ciclina D1
266_s_at	CD24	molécula CD24
201596_x_at	KRT18	queratina 18
202589_at	TYMS	timidilato sintasa
226553_at	TMPRSS2	proteasa transmembrana, serina 2
225330_at	IGF1R	receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1
214352_s_at	KRAS	homólogo del oncogén viral de sarcoma de rata v-Ki-ras2 Kirsten
201689_s_at	TPD52	proteína tumoral D52
201005_at	CD9	molécula CD9
224559_at	MALAT1	tránsito de adenocarcinoma de pulmón asociado a la metástasis 1 (codificante de no proteína)
218638_s_at	SPON2	espondina 2, proteína de la matriz extracelular
217776_at	RDH11	retinol deshidrogenasa 11 (all-trans/9-cis/11-cis)
201656_at	ITGA6	integrina, alfa 6
209605_at	TST	tiosulfato sulfurtransferasa (rhodanasa)
204623_at	TFF3	factor trefoil 3 (intestinal)
202598_at	S100A13	proteína A13 de unión a calcio S100
221024_s_at	SLC2A10	familia de portador de solutos 2 (transportador de glucosa facilitado), miembro 10
226192_at	AR	receptor de andrógenos
212587_s_at	PTPRC	proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo, C
205715_at	BST1	antígeno 1 de células estromales de médula ósea
	TMPRSS2 ERG	gen de fusión T1E4
	AKR1C3	familia de aldo-ceto reductasa 1, miembro C3 (3-alf hidroxisteroide deshidrogenasa, tipo II)

EJEMPLO 6: Mejora de la detección de CTC después del agotamiento de glóbulos blancos

Una ventaja potencial del método de reducción de CD45 es una capacidad mejorada para detectar CTC o caracterizar la expresión génica de CTC cuando hay algún nivel de expresión génica de fondo contribuido por los glóbulos blancos. La reducción del número de glóbulos blancos debería reducir la expresión génica de fondo y mejorar la capacidad de detectar transcripciones en un número menor de CTC.

Para demostrar este principio, se prepararon cuatro muestras para cada uno de los seis donantes. Se enriquecieron dos muestras con 10 células VCaP y dos muestras no se enriquecieron. Se preparó una muestra enriquecida y no enriquecida tanto con el protocolo "Agotado" como con el "No agotado" como se describe en el Ejemplo 5. La extracción de ARN, la transcripción inversa y el kit de preamplificación se llevaron a cabo como en el ejemplo 5. Se extrajeron bases de datos públicas para identificar un panel de potenciales marcadores de CTC que podrían ser útiles para medir la utilidad del método de agotamiento de WBC. Se seleccionaron genes que tenían una expresión de moderada a alta en células VCaP y un intervalo de expresión en WBC. La RT-PCR da como resultado potenciales marcadores de CTC S100A13 y AKR1C3. Sin el agotamiento de WBC (muestras no agotadas), ambos genes no muestran diferencias significativas en la expresión entre los conjuntos de muestras no enriquecidos y enriquecidos de 10 células. En el conjunto agotado, el fondo aportado por WBC se reduce y hay una diferencia significativa entre los conjuntos de muestras no enriquecidos y enriquecidos con 10 células.

EJEMPLO 7: Aplicación del agotamiento de WBC para la caracterización molecular de CTC después del agotamiento de glóbulos blancos

La principal ventaja del método de agotamiento de CD45 es que permite una caracterización molecular mejorada de CTC y minimiza la expresión génica de fondo aportada por los glóbulos blancos.

Para demostrar esta aplicación, se prepararon ocho muestras de ocho donantes y se enriquecieron dos muestras cada una con 100, 50, 25 y 10 células VCaP. Además, se usaron como controles positivos cuatro muestras que contenían sólo células VCap, por ejemplo, 100, 50, 25 y 10 células. La extracción de ARN, la transcripción inversa y el kit de preamplificación se llevaron a cabo como en el ejemplo 6. Se seleccionaron el gen del receptor de andrógenos (AR), dos variantes de corte y empalme AR (ARV1 y ARV3/7), y las variantes de corte y empalme TMPRSS2 y TMPRSS2:ERG como los genes de prueba para las células VCaP. Hubo una buena correlación en la detección de estas expresiones de genes candidatos en células VCap entre las células de VCaP de cultivo puro y la sangre enriquecida con células VCap después del agotamiento de WBC con un coeficiente de correlación (r^2) de $>0,9$. Los resultados se muestran en la Figura 6.

EJEMPLO 8: Agotamiento de glóbulos blancos usando filtración basada en perlas

Este ejemplo describe un método alternativo para reducir el número de glóbulos blancos contaminantes presentes en las muestras que se han enriquecido con el kit CellSearch Profile. Después del enriquecimiento inmunomagnético basado en EpCAM, los WBC CD45+ contaminantes se marcaron con perlas de plástico. Los WBC se separan de CTC pasando la mezcla a través de un filtro que retiene las células CD45+ unidas a las perlas y pasa la CTC no unida. Las CTC están entonces disponibles para análisis molecular o celular con un número reducido de WBC contaminantes.

Para demostrar el método, se enriquecieron 10.000 células VCAP en seis tubos de sangre de donante sano y se enriquecieron usando el kit Cell Search Profile. Tres muestras se lisaron inmediatamente en tampón Qiagen RLT (muestras no agotadas) y las tres muestras restantes se agotaron usando el método basado en perlas que se describe a continuación. La fracción enriquecida que contiene CTC y glóbulos blancos contaminantes se mezcló con perlas de plástico de 30 micras que habían sido recubiertas con un anticuerpo específico para la molécula CD45 (pluriBead, pluriSelect). La mezcla de perlas/células se agitó a 8-10 RPM durante 1 hora a temperatura ambiente. La muestra se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 27 micras (pluriStrainer, pluriSelect). El filtro se lavó 2 veces y las células recogidas en el flujo se analizaron mediante RT-PCR en busca de un marcador específico de glóbulos blancos PTPRC (también conocido como CD45) y un receptor de andrógenos (AR) marcador específico de células tumorales. Los valores de Delta Ct se crearon restando el nivel de expresión (valor 40-Ct) de la muestra agotada del nivel de expresión de la muestra no agotada. Un delta Ct de 3,1 ciclos para la PTPRC del marcador de glóbulos blancos indica que el nivel de glóbulos blancos se ha reducido significativamente con el protocolo de agotamiento de perlas con respecto a una muestra no agotada. Un delta CT de solo 0,4 ciclos para el AR del marcador específico de células tumorales indica que el protocolo de agotamiento de perlas tiene poco impacto sobre el nivel de marcadores específicos del tumor. Los resultados se muestran en la Figura 7, que muestra los resultados de RT-PCR para marcadores de glóbulos blancos y células tumorales presentes en muestras que se han sometido y no se han sometido al procedimiento de agotamiento de las perlas. AR = Receptor de andrógenos PTPRC: proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, C.

REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar los glóbulos blancos de una muestra que comprende células raras enriquecidas y glóbulos blancos, dicho método comprendiendo:
5
 (a) tratar dicha muestra enriquecida por método inmunomagnéticos y que comprende células raras enriquecidas marcadas con un marcador inmunomagnético y glóbulos blancos con un marcador de leucocitos que está conjugado con un hapteno en condiciones que marcan dichos glóbulos blancos con dicho marcador de leucocitos conjugado con el hapteno, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45; y
10
 (b) tratar la composición del paso (a) con un segundo medio que se adhiere a tales glóbulos blancos marcados, y separar el segundo medio y sus glóbulos blancos marcados adheridos de la composición del paso (a) en donde las células raras enriquecidas se seleccionan del grupo que consiste de CTC, CEC, CMMC, y CMC; y
15
 en donde el método de eliminar los glóbulos blancos de una muestra enriquecida no comprende métodos inmunomagnéticos.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las células raras enriquecidas se seleccionan del grupo que consiste de CTC y CEC.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que las células raras enriquecidas son CTC.
4. El método de la reivindicación 1, en el que las células raras enriquecidas son CEC.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que el marcador de leucocitos es un fragmento de anticuerpo que se une a CD45.
6. El método de la reivindicación 1, en el que el hapteno se selecciona del grupo que consiste de colorante de fluoresceína ("FITC"), ficoeritrina ("PE"), aloficocianina ("APC") y biotina.
- 30 7. El método de la reivindicación 1, en el que el hapteno es FITC.
8. El método de la reivindicación 1, en el que las células raras enriquecidas son CTC, y el hapteno es biotina.
- 35 9. El uso de un kit en el método de la reivindicación 1, en donde dicho kit comprende un marcador de leucocitos que se conjuga con un hapteno y un segundo marcador, distinto del marcador de leucocitos, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45, y en donde el segundo marcador comprende anticuerpos contra el hapteno.
- 40 10. El uso de un kit en el método de la reivindicación 1, en donde dicho kit comprende reactivos para marcar inmunomagnéticamente las células raras y los glóbulos blancos, un marcador de leucocitos que se conjuga con un hapteno, en donde el marcador de leucocitos es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a CD45, y un segundo marcador, distinto del marcador de leucocitos en donde el segundo marcador comprende anticuerpos contra tales haptenos.

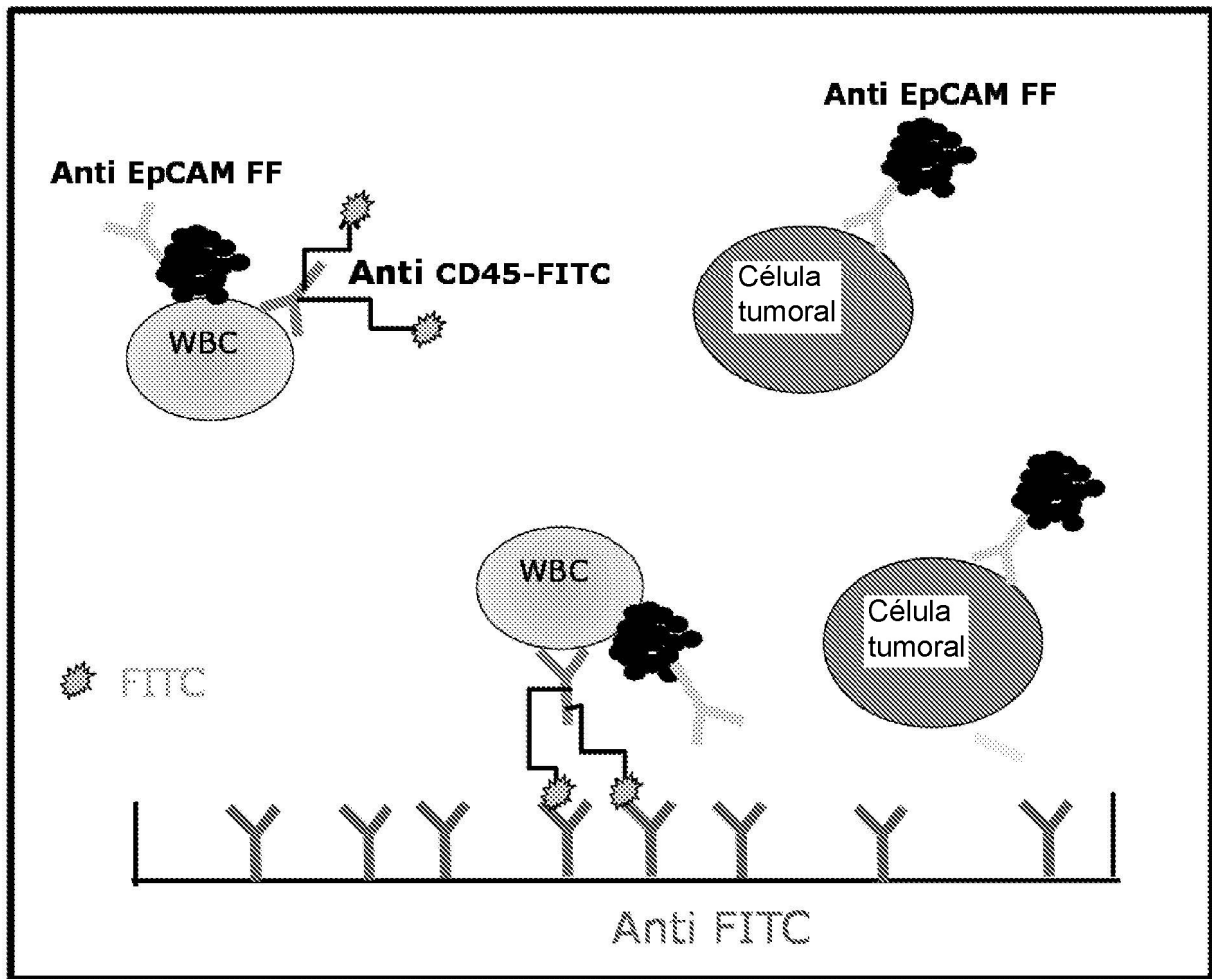


Figura 1 Representación de eliminación de glóbulos blancos basada en haptenos

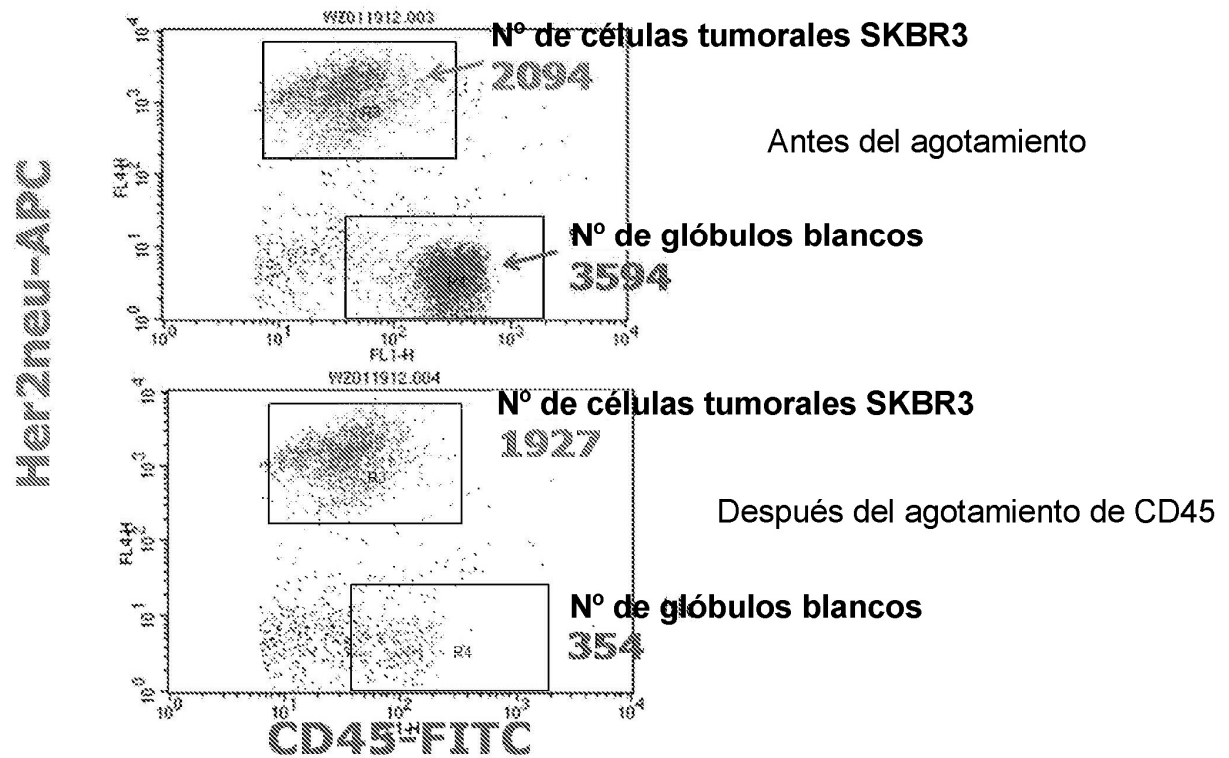


Figura 2 Análisis de glóbulos blancos y células tumorales SKBR3 antes y después de la incubación con placa anti-FITC por citometría de flujo

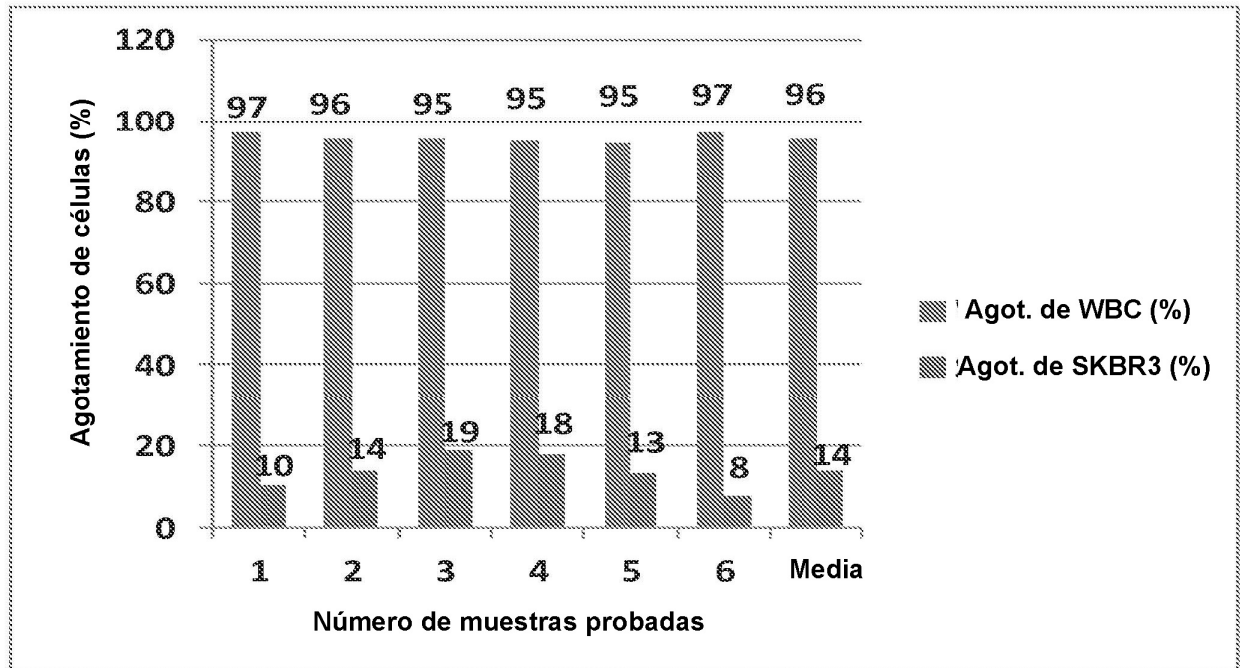


Figura 3 Porcentaje de eliminación de glóbulos blancos y células tumorales por placa recubierta con anti-FITC

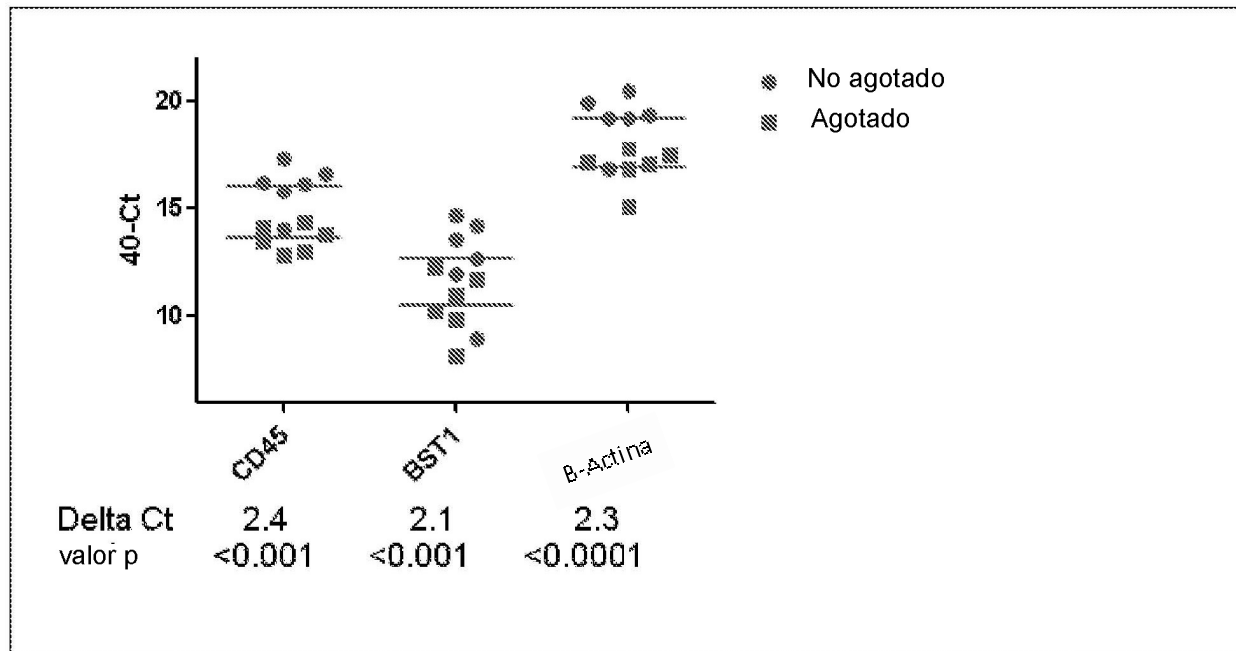


Figura 4 Medición molecular de eliminación de WBC

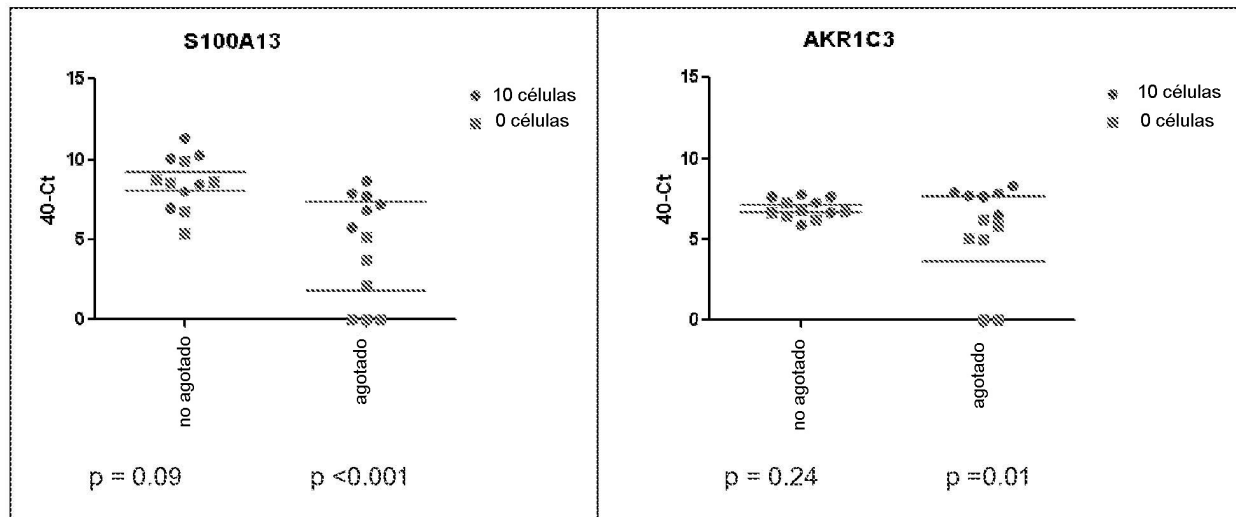


Figura 5. Detección mejorada de marcadores de CTC después de agotamiento de CD45

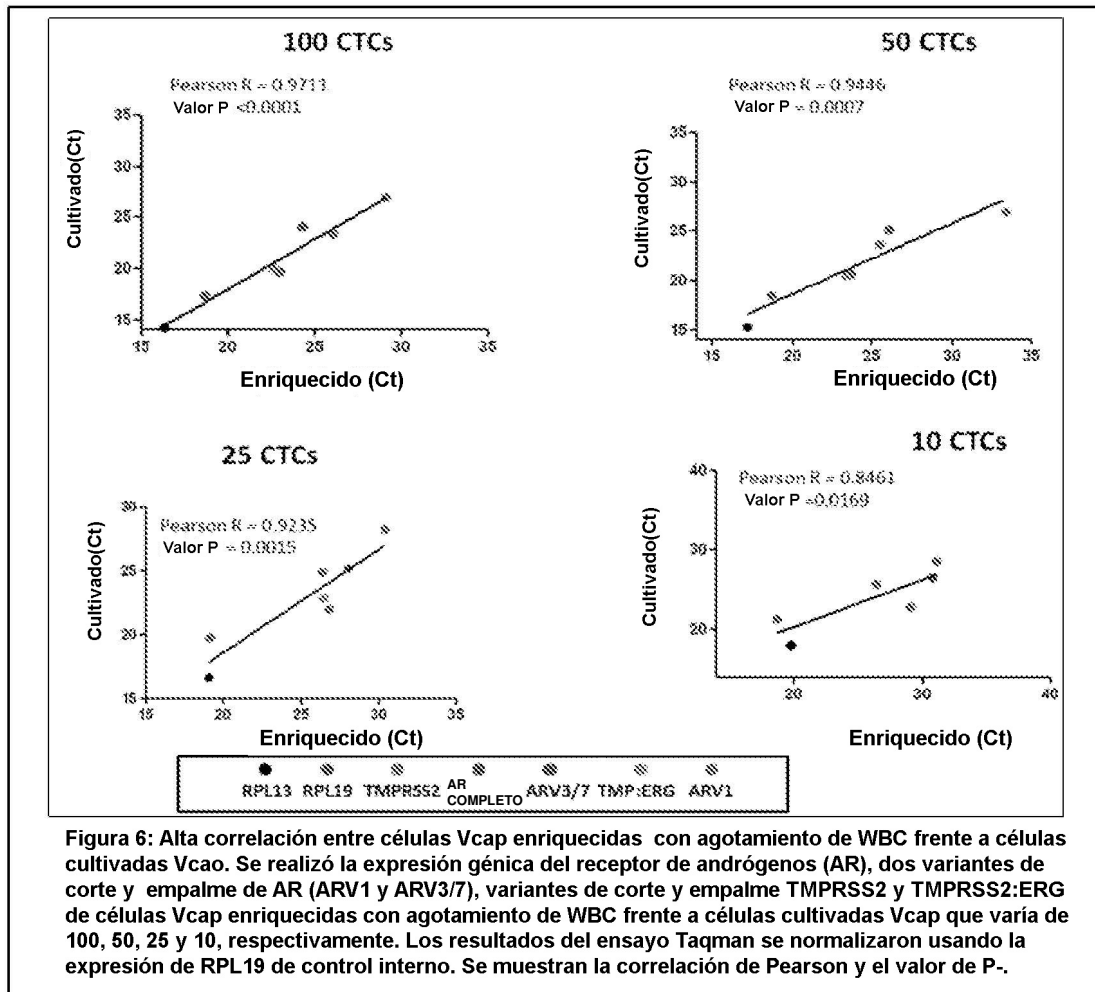


Figura 6

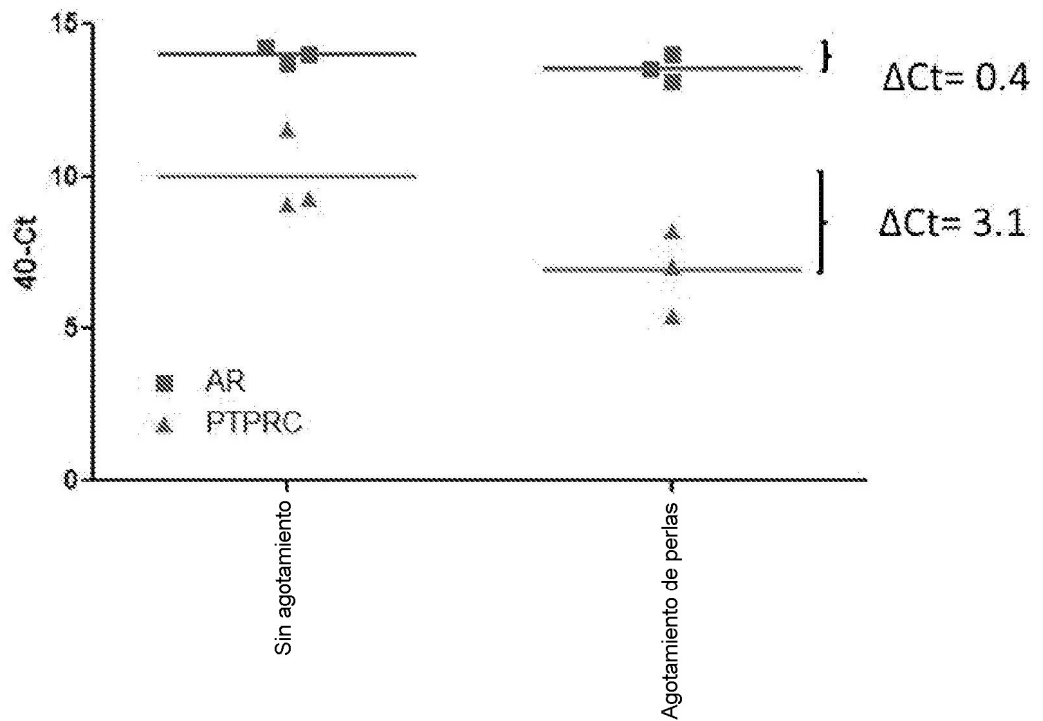


Figura 7 Efecto del agotamiento de perlas sobre marcadores de eglóbulos blancos y células tumorales