

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 089**

51 Int. Cl.:

G01N 1/28 (2006.01)
G01N 15/14 (2014.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 15/10 (2014.01)
G02B 21/14 (2006.01)
G02B 21/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2022** **E 22163930 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 4249889**

54 Título: **Métodos para analizar biopsias y muestras biológicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
01.04.2025

73 Titular/es:

NEBULUM TECHNOLOGIES CO., LTD. (100.00%)
Rm 420, Bldg C. No. 99, Ln. 130, Sec. 1, Academia
Rd., Nangang Dist.,
Taipei City 11571, CN

72 Inventor/es:

HUANG, YUAN-HSIAO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 010 089 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

Métodos para analizar biopsias y muestras biológicas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos asistidos por matriz para analizar especímenes biológicos, en particular biopsias líquidas y otras muestras líquidas, mediante microscopía, incluyendo la microscopía de fluorescencia.

10 ANTECEDENTES

Las biopsias líquidas se obtienen típicamente de fluidos corporales, como sangre periférica, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido seminal u otras fuentes tisulares. Los biomarcadores o componentes en las muestras líquidas pueden evaluarse o medirse para varias aplicaciones diagnósticas, como el cribado, la detección, la estadificación y la vigilancia de enfermedades.

Los biomarcadores en una biopsia líquida pueden incluir componentes celulares y extracelulares, la selección de los cuales puede depender de múltiples factores, como la afección médica subyacente o el estado del tratamiento. Por ejemplo, los biomarcadores pueden corresponder a antígenos u otros atributos que distinguen células circulantes raras, como células tumorales circulantes (CTC) y agrupaciones de CTC derivadas de tumores sólidos o metástasis, así como células endoteliales circulantes (CEC) asociadas con afecciones cardiovasculares y de otro tipo. Véase, por ejemplo, Lim et al. 2019, NPJ Prec. Oncol. 3, 23; Rostami et al. 2019, J. Sci. Adv. Mat. Dev. 4, 1-18; Schmidt et al. 2015, Trends Cardiovasc. Med. 25, 578-587. Tales células pueden procesarse adicionalmente para detectar anomalías genéticas y otras características moleculares. Los biomarcadores también pueden identificar componentes extracelulares, como factores circulantes derivados de tumores, proteínas secretadas, vesículas y exosomas liberados, y ácidos nucleicos libres de células. Los ácidos nucleicos libres de células incluyen el ADN tumoral libre de células (ctADN), que tiene aplicaciones en la monitorización del cáncer, así como el ADN fetal libre de células (cffADN), que se encuentra en la sangre materna y tiene aplicaciones en pruebas prenatales no invasivas. Campos et al. 2018, Cancer J. 24, 93-103; Sifakis et al. 2014, Mol. Med. Rep. 11, 2367-2372. El procesamiento genómico y proteico posterior puede permitir un análisis adicional de los biomarcadores extracelulares.

Los métodos típicos de biopsia pueden abarcar varios enfoques. Véase, por ejemplo, Harouaka et al., 2014, Pharmacol. Ther. 141, 209-221. Un enfoque común se basa en la inmunoafinidad, como métodos microfluídicos y los basados en microchips, que permiten la detección de anticuerpos unidos a dianas celulares y extracelulares. Estos métodos se basan en la unión anticuerpo-antígeno entre las células flotantes y las superficies recubiertas de anticuerpos, y por lo tanto están limitados a los antígenos presentes en la superficie de la célula diana, como las proteínas de membrana. Además, la eficacia de estos métodos depende de que los niveles de antígenos de la superficie celular sean suficientes para permitir un reconocimiento eficaz y específico por parte de los anticuerpos (por ejemplo, una baja expresión de EpCAM en la superficie celular puede dar como resultado una unión deficiente entre la célula y la superficie del chip). Estos métodos generalmente tienen tasas de flujo celular bajas que impiden el análisis eficaz de muestras complejas. Por consiguiente, el alcance, la sensibilidad, la especificidad y el rendimiento de estos métodos, así como de otros métodos de inmunoafinidad (como los basados en perlas magnéticas) son limitados.

Otro enfoque común es la citología: examinar directamente las células bajo un microscopio. Sin embargo, este enfoque se limita a examinar sólo un pequeño número de células a la vez (por ejemplo, como una sola capa en un portaobjetos de vidrio) debido a la naturaleza de dispersión de la luz de las células; por lo tanto, no es práctico, y no es económicamente factible, usar este enfoque para detectar dianas raras en millones de células que pueden estar presentes incluso en 2 c.c. de sangre.

En otro enfoque, la citometría de flujo, miles de células por segundo pasan una a una a través de uno o más haces de láser, donde pueden dar lugar a diferentes patrones de dispersión de la luz (dependiendo, por ejemplo, del tamaño y la granularidad de las células) y de emisión de fluorescencia (dependiendo de qué sondas fluorescentes estén unidas a las células). Véase, por ejemplo, Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation, Cytotechnology, marzo de 2012; 64(2): 109-130. Sin embargo, los métodos de citometría de flujo no proporcionan una alta resolución y confianza cuando las células de interés son raras. Por ejemplo, no ofrecen una inspección visual directa de las células para confirmar sus posibles propiedades morfológicas o funcionales. Además, pueden surgir problemas de regulación basados en la intensidad de la señal de fluorescencia y los píxeles capturados por el detector (que no proporciona, información sobre la calidad del marcado o los detalles morfológicos de la muestra analizada). Por ejemplo, sólo pequeños cambios o perturbaciones en la regulación pueden llevar a la exclusión de células CTC y otras células raras (por ejemplo, CEC) que son de pequeño tamaño o tienen una señal fluorescente débil.

En vista de estas y otras limitaciones, sigue habiendo una necesidad de nuevas mejoras en el análisis de biopsias líquidas. La invención actual aborda estas y otras necesidades de la técnica proporcionando métodos y

composiciones que marcan, dispersan y capturan componentes de biopsia en un gel tridimensional u otra forma no líquida. Cuando se mantienen en esta forma, los biomarcadores discretos y raros pueden detectarse con alta resolución y sensibilidad mediante métodos rápidos de obtención de imágenes, como la microscopía fluorescente de lámina de luz y otros métodos. En términos más generales, estos métodos son aplicables a los componentes de cualquier muestra, biológica o no biológica, cuya resolución puede mejorarse mediante la dispersión en un líquido y la posterior captura y obtención de imágenes en un estado no líquido.

El documento US 2021/0018441 A1 describe "un sistema de diagnóstico de biopsia líquida cuantitativa y métodos para realizar ensayos de diagnóstico. El sistema ofrece un método de biopsia líquida que usa subpoblaciones de células tumorales circulantes (CTC) o de glóbulos blancos (WBC) para el diagnóstico de precisión del cáncer, la detección temprana de la evolución de la enfermedad y la gestión de pacientes con cáncer. El [método] utiliza microscopía de iluminación de planos selectiva (SPIM) para proporcionar una alta sensibilidad y especificidad para la detección y aislamiento de CTC individuales, superando la eficacia de las metodologías existentes para la detección precoz del cáncer. Las CTC aisladas pueden analizarse para determinar su huella molecular, lo que puede llevar a relacionar las anomalías genéticas con tratamientos farmacéuticos específicos".

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un resumen esquemático de un protocolo asistido por matriz, de acuerdo con ciertas realizaciones de la divulgación, para preparar y analizar una muestra biológica líquida. Las etapas del protocolo pueden incluir (1) preparación celular; (2) gelificación y limpieza de la muestra; (3) montaje y obtención de imágenes de la muestra; y (4) visualización y análisis de la muestra.

Las FIGS. 2A-2C representan imágenes obtenidas de la cámara de obtención de imágenes de microscopía de lámina de luz descrita en el Ejemplo 2. Barra de escala en la FIG 2C (20 μ m).

Las FIGS. 3A-3C representan imágenes obtenidas de la cámara de obtención de imágenes de microscopía de lámina de luz descrita en el Ejemplo 3. Barras de escala: FIG 3A (50 μ m); FIG 3B (300 μ m); FIG 3C (50 μ m).

Las FIGS. 4A-4D representan imágenes obtenidas de la cámara de obtención de imágenes de microscopía de lámina de luz descrita en el Ejemplo 4. Barra de escala en la FIG 4B (30 μ m).

Las FIG. 5A y 5B representan los datos de gel 3D del paciente A como se describe en el ejemplo 5. Barra de escala en la FIG. 5A: (150 μ m).

Las FIG. 6A y 6B representan los datos de gel 3D del paciente B como se describe en el ejemplo 5. Barras de escala: FIG 6A (200 μ m); FIG 6B (2 μ m).

SUMARIO

La presente invención proporciona un método asistido por matriz, como los basados en la formación de gel, para preparar y analizar componentes en muestras biológicas y no biológicas, incluyendo especímenes biológicos líquidos, como se describe adicionalmente más adelante. El espécimen líquido puede proceder de cualquier fuente, incluyendo seres humanos y animales. En algunas realizaciones, puede derivarse de una biopsia líquida obtenida de sangre periférica, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y otras fuentes tisulares, todas las cuales pueden procesarse adicionalmente. En realizaciones, puede derivarse de una dispersión líquida de materiales obtenidos de otras fuentes, incluyendo fuentes sólidas, como de una biopsia de tejido sólido. El método de la presente invención se define en la reivindicación 1.

El método de la invención comprende la adición de un agente solidificante (por ejemplo, un agente gelificante) a un espécimen biológico que comprende materiales biológicos; la generación de una muestra solidificada (por ejemplo, una muestra gelificada) que comprende materiales biológicos dispersos; y la obtención de imágenes de la muestra solidificada para identificar uno o más componentes en los materiales biológicos. Los materiales biológicos pueden incluir cualquier biomolécula, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y moléculas pequeñas, que en algunas realizaciones pueden servir como biomarcadores de condiciones médicas o estados de enfermedad. Por ejemplo, las biomoléculas pueden servir como biomarcadores de células raras circulantes en la sangre, como células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes y otras células y grupos de células que pueden estar presentes en el espécimen biológico. En algunas realizaciones, los materiales biológicos en el espécimen pueden enriquecerse, por ejemplo, concentrando células de una gran cantidad de sangre u otra fuente de muestra. Ventajosamente, sin embargo, el método actualmente divulgado no requiere ninguna preselección o precribado de las células; en cambio, el presente método permite el análisis sin sesgos de una muestra de células no seleccionadas o no cribadas mediante la detección de marcadores de biomarcadores, como anticuerpos o sondas de ácido nucleico, unidas a materiales biológicos en el espécimen, por ejemplo mediante la detección de anticuerpos marcados que identifican marcadores específicos de la superficie celular en el espécimen.

De acuerdo con la invención, el agente solidificante comprende una mezcla de monómeros químicos y reticulantes para crear un gel químico sintético que tiene una red polimérica químicamente reticulada.

En algunas realizaciones, el paso de añadir de un agente solidificante en cualquiera de los métodos puede comprender añadir precursores de hidrogel, a la muestra; añadir el agente directamente a una muestra en condiciones que permitan la formación de un sólido, como un gel; formar un hidrogel, u otros métodos, como se divulga en la presente. Antes de añadir el agente solidificante, los métodos pueden comprender someter los componentes del espécimen biológico a un procedimiento de fijación, como se describe en la presente, y también pueden comprender marcar una o más biomoléculas, como una proteína o un ácido nucleico, con una sonda molecular. Las sondas moleculares incluyen anticuerpos, colorantes y sondas de ácido nucleico conocidas en la técnica, incluyendo las descritas en la presente. En algunas realizaciones, las sondas pueden usarse para identificar células y grupos tumorales circulantes, así como tumores libres de células o ADN derivado del feto, y cambios genéticos y estructurales en los núcleos celulares, como anomalías, amplificaciones, deleciones y translocaciones cromosómicas y de ADN.

En realizaciones alternativas, el paso de añadir un agente solidificante a un espécimen líquido comprende mezclar una muestra que contiene materiales biológicos (por ejemplo, un sedimento que comprende materiales biológicos) con una mezcla o solución que comprende uno o más precursores de hidrogel, y alterar las condiciones de la mezcla para inducir la solidificación (por ejemplo, gelificación). La formación de un hidrogel es conocida en la técnica, y puede lograrse mediante una variedad de métodos de acuerdo con la divulgación en cuestión. Por ejemplo, puede añadirse un segundo agente (por ejemplo, un ion de Ca^{+} o reticulante) en cantidades suficientes para inducir la gelificación de los precursores de hidrogel de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, el espécimen puede procesarse como se describe en la presente, incluyendo pasos en los que la muestra se centrifuga para obtener un sedimento y volver a suspenderse en una solución precursora de hidrogel de alginato y se mezcla con una cantidad adecuada de solución de CaCl_2 (por ejemplo, 0,2 M) para iniciar la gelificación. En este método ejemplar, el gel se formaría en el plazo de un corto período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 15 minutos) que luego se puede montar para el ajuste del índice de refracción (si es necesario) y la obtención de imágenes.

El paso de generar una muestra solidificada que comprenda materiales biológicos dispersos en cualquiera de los métodos puede comprender transferir de la muestra a un portamuestras después de añadir el agente solidificante y permitir que se produzca la solidificación. En otras realizaciones, la muestra puede prepararse directamente en un portamuestras, al que se añade el agente solidificante, consolidando de este modo los pasos de pregelificación y solidificación en un único tubo. La muestra puede agitarse, sacudirse, hacerse vibrar o agitarse de otro modo en el portamuestras antes de la solidificación para garantizar la dispersión de los materiales. En algunas realizaciones, la muestra solidificada tiene una forma adecuada para la obtención de imágenes, como un bloque, una forma cilíndrica o cualquier otra forma que sea compatible con el sistema de obtención de imágenes deseado. Los métodos asistidos por matriz de acuerdo con la invención comprenden introducir un material de igualación del índice de refracción en la muestra solidificada. En algunas realizaciones, la muestra solidificada que comprende los materiales biológicos dispersos se transfiere a una solución aclarante (o equilibrio) para lograr la coincidencia del índice de refracción. Por ejemplo, si se prepara una muestra de células dispersas en una matriz transparente, las moléculas marcadas en la superficie de (o dentro de) pueden obtenerse adecuadamente imágenes de las células dispersas individualmente sin incubación previa en un material de igualación del índice de refracción (por ejemplo, una solución de igualación del índice de refracción). En ciertas realizaciones, la solidificación incluye mezclar la muestra biológica con un material de igualación del índice de refracción (por ejemplo, una solución de igualación del índice de refracción), evitando de este modo la necesidad de un procesamiento separado con un material de igualación del índice de refracción.

El paso de obtener imágenes de la muestra solidificada puede comprender, en algunas realizaciones, la obtención de imágenes de una muestra sólida con forma adecuada, como un bloque, mediante una variedad de técnicas microscópicas, incluyendo la microscopía de fluorescencia y, más particularmente, la microscopía de fluorescencia en lámina de luz. En algunas realizaciones, la obtención de imágenes permite la identificación de células individuales en la muestra solidificada, y más en particular, por ejemplo, puede incluir la detección de una o más células cancerosas, como células tumorales circulantes, o marcadores de cáncer. El tamaño de la muestra solidificada puede variar dependiendo de la aplicación, la sensibilidad y las biomoléculas que se estén ensayando. En algunas realizaciones, la obtención de imágenes puede usarse para analizar las interacciones célula-célula, así como las características morfológicas y estructurales de las células, como el tamaño, la forma y la relación entre el núcleo y el citoplasma, y las características de los orgánulos.

Los métodos son útiles en numerosas aplicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, evaluar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad, por ejemplo, analizando microscópicamente una biopsia líquida y/o de tejido; cribando agentes terapéuticos candidatos por su efecto en una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre o tejido) en un estado de enfermedad; y evaluando la expresión de un panel de biomarcadores en la muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La divulgación proporciona métodos y composiciones asistidos por matriz para analizar una muestra líquida, como una biopsia líquida, para detectar la presencia de uno o más biomarcadores. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones se usan para solidificar materiales dispersos en la muestra para capturarlos e inmovilizarlos en un estado tridimensional. Posteriormente, los biomarcadores de interés, como los marcadores de enfermedades raras, que puedan estar presentes en los materiales pueden detectarse y resolverse con alta sensibilidad y especificidad. Los métodos asistidos por matriz incluyen el uso de un agente solidificante, como precursores de hidrogel, para transformar la muestra líquida en una muestra sólida con componentes dispersos.

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un enfoque de obtención de imágenes tridimensional para detectar biomarcadores, incluyendo moléculas raras, como marcadores de células cancerosas, usando métodos y composiciones asistidos por matriz para analizar biopsias líquidas y otras muestras líquidas por microscopía, incluyendo microscopía de fluorescencia.

En algunas realizaciones, los biomarcadores son indicativos de componentes celulares, como componentes de células circulantes raras, como células tumorales circulantes y células endoteliales circulantes. Por ejemplo, los biomarcadores pueden incluir una proteína de superficie celular, un marcador morfológico o una secuencia de ácido nucleico que pueda identificar dichas células tumorales. En algunas realizaciones, los biomarcadores son indicativos de componentes extracelulares, como ADN extracelular, proteínas o vesículas, que indican enfermedades o estados de salud particulares.

Los biomarcadores pueden marcarse mediante técnicas conocidas, como se describe en la presente, y pueden detectarse, incluso en muestras complejas, mediante una amplia gama de métodos de obtención de imágenes y, más particularmente, mediante microscopía de fluorescencia, incluyendo la microscopía de fluorescencia de lámina de luz y otros métodos de microscopía.

Términos y definiciones

A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por una persona con conocimientos ordinarios en la técnica. En la puesta en práctica de esta invención puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en la presente. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados frecuentemente en la presente y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

Como se usa en la presente, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa un intervalo de valores que incluye el valor especificado, que experto en la técnica consideraría razonablemente similar al valor especificado. En algunas realizaciones, "aproximadamente" significa dentro de una desviación estándar usando mediciones generalmente aceptables en la técnica. En algunas realizaciones, "aproximadamente" significa un intervalo que se extiende hasta el +/- 10% del valor especificado. En algunas realizaciones, "aproximadamente" significa el valor especificado.

Se entiende que, tanto si el término "aproximadamente" se usa explícitamente como si no, se pretende que cada cantidad dada en la presente se refiera tanto al valor real dado como a la aproximación de dicho valor dado que podría inferirse razonablemente basándose en la capacidad ordinaria en la técnica, incluyendo equivalentes y aproximaciones debidas a las condiciones experimentales y/o de medición para dicho valor dado. Por consiguiente, para cualquier realización de la divulgación en la que un valor numérico va precedido por "alrededor de" o "aproximadamente", la divulgación incluye una realización en la que se enumera el valor exacto. A la inversa, para cualquier realización de la divulgación en la que un valor numérico no está precedido por "alrededor de" o "aproximadamente", la divulgación incluye una realización en la que el valor está precedido por "alrededor de" o "aproximadamente".

A menos que se indique lo contrario, las concentraciones proporcionadas como porcentajes o porcentaje en peso (p) se refieren a concentraciones peso/volumen (p/v). Por ejemplo, el 2% o 2% en peso de un componente en una solución de 100 ml corresponde a 2 gramos de dicho componente.

Como se usan en la presente, los términos "un", "uno" y "el" deben entenderse tanto en singular como en plural, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Por lo tanto, "un", "uno" y "el" (y las variaciones gramaticales de los mismos cuando proceda) se refieren a uno o más.

Además, aunque los artículos, elementos o componentes de las realizaciones puedan describirse o reivindicarse en singular, se contempla que el plural esté dentro del alcance de las mismas, a menos que se indique explícitamente la limitación al singular.

Los términos "que comprende" y "que incluye" se usan en la presente en su sentido abierto y no limitativo. Otros términos y frases usados en este documento, y variaciones de los mismos, a menos que se indique

expresamente lo contrario, deben interpretarse como abiertos, en contraposición a limitativos. Como ejemplos de lo anterior: el término "ejemplo" se usa para proporcionar casos ejemplares del elemento en análisis, no una lista exhaustiva o limitativa de los mismos. Adjetivos como "convencional", "normal", "conocido" y términos de significado similar no deben interpretarse como una limitación del elemento descrito a un período de tiempo dado o a un elemento disponible en un momento dado, sino que debe entenderse que abarcan tecnologías convencionales o normales que pueden estar disponibles o ser conocidas ahora o en cualquier momento en el futuro. De manera similar, cuando en este documento se hace referencia a tecnologías que serían evidentes o conocidas para un experto en la técnica, dichas tecnologías abarcan las que son evidentes o conocidas por los expertos en la técnica ahora o en cualquier momento en el futuro.

Como se usa en la presente, el término "muestra solidificada" se refiere a una muestra en una forma no líquida, por ejemplo, una forma sólida o de gel, en la que el material sólido o de gel proporciona una matriz de soporte para capturar, es decir, inmovilizar los materiales biológicos en un estado disperso en una muestra tridimensional. Posteriormente, los materiales dispersos en la muestra pueden identificarse y visualizarse eficazmente en 3 dimensiones. Como se usa en la presente, el término "agente solidificante" incluye agentes gelificantes capaces de formar un gel, así como epóxidos y otros agentes que, por ejemplo, pueden ser deseables cuando se soportan materiales biológicos dispersos a altas densidades.

Como se usan en la presente, los términos "muestra biológica" y "especimen biológico" (y dependiendo del contexto, "muestra" o "especimen") se refieren a cualquier material biológico que comprende o se cree que comprende una biomolécula, como un ácido nucleico o una proteína. Las muestras que pueden manipularse con las composiciones y los métodos proporcionados en la presente pueden obtenerse de fuentes in vivo o in vitro y, por lo tanto, incluyen especímenes, como células, tejidos, virus y órganos, diseccionados de un sujeto, como un modelo de roedor, así como especímenes, como células, tejidos y mini-órganos, cultivados in vitro. Las muestras biológicas ejemplares incluyen tejidos y órganos sólidos, como hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, timo, colon, amígdala, testículos, piel, cerebro, corazón, músculo y páncreas. En algunas realizaciones, las muestras son órganos enteros obtenidos de un animal, incluyendo ratones, ratas y otros animales. En algunas realizaciones, el espécimen biológico es un tejido cerebral o un cerebro entero, por ejemplo, de un roedor, y más particularmente, de un ratón. Otras muestras biológicas incluyen células, virus y otros microbios. En algunas realizaciones, la muestra biológica procede de un humano, un animal o una planta. En algunas realizaciones, las muestras proceden de humanos, animales de compañía como perros o gatos, animales de granja como vacas, ovejas y cerdos, roedores como ratas o ratones, animales de zoológico, primates como monos y similares.

Las muestras biológicas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, materiales derivados de biopsias, muestras de médula ósea, muestras de órganos, fragmentos de piel, organismos y materiales obtenidos de entornos clínicos o forenses. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tejido, preferiblemente una muestra de órgano. La muestra puede obtenerse de un sujeto animal o humano afectado por una enfermedad u otra patología o sospechoso de la misma (normal o enfermo), o considerado normal o sano. Los especímenes, como las muestras de órganos y tejidos, pueden recogerse y procesarse usando los métodos descritos en la presente y someterlos a análisis microscópico inmediatamente después del procesamiento, o pueden conservarse y someterse a análisis microscópico en un momento futuro, por ejemplo, después de almacenamiento durante un período de tiempo prolongado. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden usarse para analizar células vivas, y en otras realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden usarse para analizar células fijadas.

En realizaciones particulares, la muestra biológica es una biopsia líquida obtenida de un fluido corporal, como sangre periférica, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido seminal u otras fuentes tisulares.

Como se usa en la presente, el término "biomolécula" es intercambiable con "molécula" y se refiere a una molécula presente en una muestra o espécimen biológico. En un aspecto, la biomolécula es una biomolécula endógena. En otro aspecto, la biomolécula es una biomolécula exógena. Ejemplos no limitativos de una biomolécula exógena incluyen una biomolécula implantada artificialmente, por ejemplo, una transferida o expresada por un virus o un plásmido. Las biomoléculas incluyen, entre otras, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, esteroides, metabolitos y otras estructuras o componentes subcelulares dentro de una célula, tejido u órgano. Ejemplos no limitativos de proteínas incluyen enzimas, proteínas de membrana, factores de transcripción, proteínas sinápticas y marcadores neuronales. En algunas realizaciones no limitativas, la biomolécula se selecciona entre una subunidad de una macromolécula, un receptor, una subunidad de receptor, una proteína de membrana, una proteína de filamento intermedio, una bomba de membrana, un factor de transcripción y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones no limitativas, la biomolécula es Olig2 (Factor de transcripción de oligodendrocitos), NeuN (Antígeno nuclear neuronal), NKCC2 (Cotransportador 2 de Na⁺K⁺Cl⁻). En otras realizaciones no limitativas, la biomolécula comprende un ARN. En otras realizaciones no limitativas más, la biomolécula comprende una molécula de ADN. En algunas realizaciones, la biomolécula está localizada en una estructura, ejemplos de la cual incluyen flagelos, cilios, sinapsis, espinas sinápticas, matriz extracelular (ECM), pared celular, envoltura celular, membrana, citoplasma, Red de Golgi, mitocondria, retículo endoplásmico (ER) (por ejemplo, ER rugoso o ER liso), núcleo, centriolos, ribosomas, polirribosomas, lisosomas, liposomas, componente del citoesqueleto, vesículas, gránulos, peroxisoma, vacuolas,

protoplasto, tonoplasto, plasmodesmo plasmático, cloroplasto, pseudópodos, una estructura asociada a la vasculatura del cerebro, una red astrocítica densa del cerebro, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la biomolécula es un marcador celular, como una proteína expresada en la superficie de una célula cancerosa.

5 En algunas realizaciones, una "biomolécula" se encuentra en una muestra de biopsia líquida y se evalúa o mide para aplicaciones diagnósticas, como el cribado, la detección, la estadificación o la vigilancia (monitorización) de una condición de enfermedad, como el cáncer, o una afección médica, como un trastorno metabólico. En algunas realizaciones, una biomolécula se evalúa o mide en una prueba de cribado o diagnóstico prenatal no invasiva.

10 Como se usa en la presente, el término "marcado" se refiere a cualquier técnica y reactivo conocido en la actualidad o que se descubra en el futuro que pueda proporcionar una indicación basada en señales de la presencia o ausencia de una fracción diana particular dentro de una muestra de la divulgación. Ejemplos no limitativos de un agente de marcado incluyen una molécula pequeña, un colorante, un anticuerpo, una enzima, una nanopartícula, una sonda de ácido nucleico, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones no limitativas, el agente de marcado comprende un marcador, por ejemplo, un marcador cromogénico, un marcador fluorescente, un marcador conjugado con radionúclido, o una combinación de los mismos.

15 Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método para analizar una muestra líquida que incluye materiales biológicos para uno o más componentes diana. En una realización ejemplar, el método incluye añadir un agente solidificante a un espécimen obtenido de la muestra líquida que incluye los materiales biológicos, generando una muestra solidificada que comprende materiales biológicos dispersos, y obtener imágenes de la muestra solidificada para identificar uno o más componentes diana en los materiales biológicos dispersos.

20 En algunas realizaciones, el método para analizar una muestra líquida de acuerdo con la presente divulgación incluye además marcar el espécimen obtenido de la muestra líquida con una o más sondas para los uno o más componentes diana antes de añadir el agente solidificante; y/o marcar la muestra solidificada con una o más sondas para los uno o más componentes diana. En una realización ejemplar, el método incluye marcar el espécimen obtenido de la muestra líquida con una o más sondas para los uno o más componentes diana antes de añadir el agente solidificante. De acuerdo con la invención, el método incluye además introducir un material de igualación del índice de refracción en la muestra solidificada.

25 En algunas realizaciones, la muestra líquida es una muestra líquida de sangre. Por ejemplo, el espécimen obtenido de la muestra líquida de sangre puede procesarse para eliminar los glóbulos rojos y las plaquetas de la muestra líquida de sangre, y/o puede ser un espécimen que incluya células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la muestra líquida de sangre. Alternativamente, en otras aplicaciones, pueden aislarse los glóbulos rojos u otros componentes de la muestra líquida. Alternativamente, el espécimen puede obtenerse de otros líquidos y fluidos biológicos obtenidos de un mamífero (por ejemplo, un humano o una rata) además de la sangre.

30 En ciertas realizaciones, los uno o más componentes diana incluyen un ácido nucleico, una proteína, un virus o una vesícula. En ciertas realizaciones, los uno o más componentes diana incluyen una diana extracelular. En ciertas realizaciones, los uno o más componentes diana incluyen una diana celular o intracelular.

35 En algunas realizaciones, el marcado, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, incluye el contacto del espécimen obtenido de la muestra líquida con una sonda molecular; y/o el contacto de la muestra solidificada del paso (b) con una sonda molecular. Las sondas moleculares pueden ser individualmente, por ejemplo, un anticuerpo, un colorante fluorescente o una sonda de ácido nucleico.

40 En algunas realizaciones, el método para analizar una muestra líquida de acuerdo con la presente divulgación incluye además la transferencia del espécimen a un portamuestras. El método puede incluir, además, en realizaciones ejemplares, agitar o hacer vibrar la muestra en el portamuestras. En realizaciones ejemplares, la muestra solidificada es un bloque sólido o de gel adecuado para la obtención de imágenes.

45 En algunas realizaciones, el método para analizar una muestra líquida de acuerdo con la presente divulgación incluye además realizar un procedimiento de fijación en el espécimen, como por ejemplo incubando la muestra (si se realiza antes de la solidificación), o la muestra solidificada en una solución fijadora. En realizaciones ejemplares, la solución fijadora comprende glutaraldehído, formaldehído, un epoxi, o una mezcla de dos o más de los anteriores.

50 La obtención de imágenes, como se describe en cualquiera de las realizaciones anteriores, puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando tecnología de microscopía y cámaras conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la obtención de imágenes se lleva a cabo mediante microscopía de fluorescencia, como la microscopía de fluorescencia de lámina de luz. En realizaciones ejemplares, la obtención de imágenes identifica la presencia o ausencia de un tipo específico de célula en la muestra solidificada.

55 Una realización ejemplar de la presente divulgación proporciona un método de analizar una muestra líquida de sangre para la presencia de células circulantes raras como, pero no limitadas a, una célula tumoral circulante. En

una realización, el método incluye marcar un espécimen que comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas obtenidas de la muestra líquida de sangre con una o más sondas para las células circulantes raras; añadir un agente solidificante al espécimen marcado que comprende células mononucleares de sangre periférica (PBMC); generar una muestra solidificada que comprende células mononucleares de sangre periférica dispersas (PBMC); introducir un material de igualación del índice de refracción en la muestra solidificada para proporcionar una muestra solidificada ópticamente aclarada que tenga un índice de refracción adecuado para la obtención de imágenes; y obtener imágenes de la muestra solidificada o de la muestra solidificada ópticamente aclarada para determinar la presencia de una o más sondas, determinando de este modo la presencia de células circulantes raras en la muestra líquida de sangre. El marcado puede incluir además la adición de una sonda para glóbulos blancos, que puede servir, por ejemplo, como control.

En algunas realizaciones, las una o más sondas reconocen un antígeno específico del cáncer o una secuencia de ADN o ARN específica del tumor. Por ejemplo, las una o más sondas pueden seleccionarse entre un anticuerpo o una sonda de ácido nucleico. En una realización, las una o más sondas confieren detección de uno o más de los antígenos EpCAM, HER2, CDX2, CK20, CK19, PD/PDL-1 y EGFR o la secuencia de ácido nucleico correspondiente.

En algunas realizaciones, el método para analizar una muestra líquida de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores incluye además la introducción de un material de igualación del índice de refracción en la muestra solidificada. En ciertas realizaciones, la muestra gelificada ópticamente aclarada se introduce en un portamuestras que se sumerge en una solución que incluye un material de igualación del índice de refracción.

En una realización, el agente solidificante incluye un precursor de hidrogel. En otras realizaciones, el paso de generar la muestra solidificada comprende añadir un agente a un precursor de hidrogel para inducir la gelificación.

La muestra solidificada puede incluir además una sonda para uno o más componentes diana en la biopsia líquida. Los materiales biológicos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células circulantes raras, como células tumorales circulantes, células epiteliales circulantes y células endoteliales circulantes.

En algunas realizaciones, el agente de marcado comprende una molécula pequeña capaz de unirse a una fracción diana particular dentro del tejido. Ejemplos de colorantes de molécula pequeña incluyen DAPI, yoduro de propidio, lectina, faloidina y cualquier otra molécula pequeña que pueda unirse a una fracción diana dentro del tejido. En algunas realizaciones, la molécula pequeña produce inherentemente una señal, como una señal de fluorescencia producida por DAPI, yoduro de propidio o naranja de acridina. En algunas realizaciones, la molécula pequeña se conjuga con un indicador para producir una señal, como un indicador que produce una señal de fluorescencia, por ejemplo, en el caso de un colorante de lectina, o un indicador que produce una señal no fluorescente, por ejemplo, un indicador colorimétrico (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina (DAB)). En realizaciones, el agente de tinción comprende un anticuerpo, como se describe adicionalmente más adelante. En otras realizaciones, la tinción comprende actividades de detección dirigidas a cadenas de ácido nucleico modificadas. En otras realizaciones, la tinción comprende hibridación in situ de tal manera que la tinción comprende una sonda basada en nucleótidos capaz de hibridar con una secuencia predeterminada de ácidos nucleicos dentro del tejido. En algunas realizaciones, la sonda basada en nucleótidos comprende un marcador (por ejemplo, uno o más de los marcadores proporcionados anteriormente) para permitir la producción de señales y la detección de la sonda basada en nucleótidos. En realizaciones adicionales, la sonda de nucleótidos comprende un marcador fluorescente, como en la hibridación fluorescente in situ (FISH).

En algunas realizaciones, la muestra biológica, como una célula, tejido, órgano, organismo o subestructura de órgano, proporciona una señal endógena, por ejemplo, una molécula endógenamente fluorescente. Ejemplos de la molécula endógenamente fluorescente incluyen una reportera de proteína fluorescente (por ejemplo, proteína verde fluorescente [GFP] o proteína roja fluorescente [RFP]). En otras realizaciones, la muestra procede de un modelo transgénico, y las moléculas fluorescentes se expresan mediante un promotor constitutivo o inducible. En otros aspectos más, el organismo está infectado con un virus recombinante o transfectado con un plásmido que codifica la proteína fluorescente. Los ejemplos de proteínas fluorescentes reporteras incluyen: proteína verde fluorescente (GFP), EGFP (GFP mejorada), BFP (proteína azul fluorescente), CFP (cian), proteína roja fluorescente (RFP), wtGFP (GFP blanca), YFP (proteína amarilla fluorescente), dsRed, mCherry, mVenus, mCitrine, tdTomato, Luciferase, mTurquoise2, etc.

Como se ha indicado, el espécimen líquido puede marcarse con una sonda molecular, como un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo primario que comprende un marcador que produce directa o indirectamente una señal, como un marcador de biotina, un marcador fluorescente (fluoróforo), un marcador enzimático (por ejemplo, HRP o DAB), un marcador coenzimático, un marcador quimioluminiscente o un marcador de isótopo radiactivo. En otros aspectos, el anticuerpo primario se aplica como tinción única (por ejemplo, con o sin reactivos adicionales, como una estreptavidina marcada o un sustrato enzimático/coenzimático para proporcionar una señal). En algunas realizaciones, el anticuerpo primario no comprende un marcador y en su lugar se detecta mediante un anticuerpo secundario conjugado con un marcador.

Los ejemplos de fluoróforos que pueden unirse al anticuerpo primario o secundario incluyen: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 750. Otros fluoróforos ejemplares incluyen BODIPY FL, Cumarina, Cy3, Cy5, Fluoresceína (FITC), Verde Oregón, Azul Pacífico, Verde Pacífico, Naranja Pacífico, Tetrametilrhodamina (TRITC), Rojo Texas, APC-eFluor 780, eFluor 450, eFluor 506, eFluor 660, PE-eFluor 610, PerCPeFluor 710, Super Bright 436, Super Bright 645, Super Bright 702, Super Bright 780, Super Bright 600, Qdot 525, Qdot 565, Qdot 605, Qdot 655, Qdot 705, Qdot 800, R-ficoeritrina (R-PE) y alofococianina (APC).

Pueden obtenerse imágenes de la muestra solidificada mediante cualquier aplicación basada en microscopía, y la materia divulgada no se limita, por tanto, en ciertas realizaciones, a la técnica de obtención de imágenes particular empleada. Ejemplos de aplicaciones basadas en microscopía incluyen, pero no se limitan a, inmunofluorescencia, microscopía confocal, microscopía de dos fotones, microscopía de superresolución, microscopía de lámina de luz, así como microscopía de rayos X, etc. El término "agente detectable" o "marcador detectable" se refiere a una molécula que puede usarse para la detección directa o indirecta de un biomarcador. En la técnica se conocen una amplia variedad de agentes detectables que pueden ser fácilmente identificados y usados por un experto en la técnica. Los agentes detectables adecuados incluyen, entre otros, colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregón Green™, rodamina, rojo de Texas, isotiocianato de tetrahodamina (TRITC), Cy3, Cy5, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 488), marcadores de proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), ficoeritrina, etc.), enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina, metales y similares.

El término "marcador inmunofluorescente" se refiere a un agente detectable que es un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que dirige un colorante fluorescente a una molécula específica dentro o sobre una célula. Un marcador inmunofluorescente puede usarse en métodos que emplean un microscopio de luz fluorescente para producir inmunotinción para una muestra deseada. Un marcador inmunofluorescente también puede emplearse en métodos de inmunocitoquímica (ICC) o inmunohistoquímica (IHC) descritos en la presente. Por ejemplo, en el contexto de la presente divulgación, un marcador inmunofluorescente puede usarse para detectar una célula circulante rara (por ejemplo, CTC o imitación de CTC) como se describe en la presente.

El término "anticuerpo" se refiere a cualquier inmunoglobulina o derivado de la misma, ya sea natural o producido total o parcialmente de manera sintética. En los métodos divulgados también pueden usarse todos los derivados de anticuerpos que mantienen la capacidad de unión específica. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden unirse específicamente a un biomarcador. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse específicamente a un único biomarcador (por ejemplo, proteoglicano de condroitín sulfato 4 (CSPG4)). Además, los anticuerpos pueden ser panespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos panespecíficos de la presente divulgación pueden unirse específicamente a uno o más miembros de una familia de biomarcadores (por ejemplo, uno o más miembros de la familia de proteoglicanos de condroitín sulfato, incluyendo los proteoglicanos de condroitín sulfato 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8). El anticuerpo puede tener un dominio de unión que sea homólogo o en gran medida homólogo a un dominio de unión de inmunoglobulina y puede derivarse de fuentes naturales, o producirse parcial o totalmente de manera sintética. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo incluyendo, pero no limitado a, Fab, Fab, F(ab)2, scFv, Fv, dsFv diacuerpo, y fragmentos Fd. Debido a su menor tamaño, en ciertas aplicaciones los fragmentos de anticuerpo pueden ofrecer ventajas sobre los anticuerpos intactos. Alternativa o adicionalmente, el anticuerpo puede comprender múltiples cadenas enlazadas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro, y cualquier fragmento funcional obtenido a partir de dichas moléculas, en donde dichos fragmentos conservan propiedades de unión específica de la molécula de anticuerpo original. Los expertos en la técnica apreciarán que el anticuerpo puede proporcionarse en cualquiera de una variedad de formas que incluyen, por ejemplo, humanizado, parcialmente humanizado, quimérico, quimérico humanizado, etc. El anticuerpo puede prepararse usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede producirse enzimática o químicamente por fragmentación de un anticuerpo intacto o puede producirse recombinantemente a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo.

El término "biomarcador" se refiere a una molécula biológica, o un fragmento de una molécula biológica, el cambio y/o detección de la cual puede correlacionarse con una condición física o estado particular de una célula circulante rara (por ejemplo, CTC, imitación de CTC o CEC) u otro componente diana. Los términos "marcador" y "biomarcador" se usan indistintamente a lo largo de la divulgación. Tales biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, moléculas biológicas que comprenden nucleótidos, ácidos nucleicos, nucleósidos, aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, esteroides, metabolitos, péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, hormonas, anticuerpos, regiones de interés que sirven como sustitutos de macromoléculas biológicas y combinaciones de las mismas (por ejemplo, glicoproteínas, ribonucleoproteínas, lipoproteínas). El término también abarca porciones o fragmentos de una molécula biológica, por ejemplo, fragmento peptídico de una proteína o polipéptido. En el contexto de la presente divulgación, por ejemplo, los biomarcadores ejemplares para CTC como células de melanoma circulantes (CMC) incluyen proteoglicano de condroitín sulfato 4 (CSPG4), proteína premelanosa (Pmel17) y proteína A1 de unión a

calcio S100 (S100A1).

Métodos

En algunas realizaciones, la divulgación permite analizar materiales en una muestra líquida, que puede comprender componentes biológicos o no biológicos. Por tanto, los métodos pueden usarse para analizar biopsias líquidas, así como otras muestras con componentes biológicos. Los componentes biológicos pueden incluir materiales celulares, así como materiales extracelulares, como vesículas y ADN libre de células, proteínas secretadas y otras biomoléculas libres de células.

En algunas realizaciones, los métodos incluyen el paso de solidificar la muestra líquida, capturando (inmovilizando) de este modo los materiales dispersos en una forma de la que pueden obtenerse imágenes posteriormente mediante una aplicación microscópica (u otro método de obtención de imágenes). La imagen escaneada resultante permite la detección de componentes inmovilizados y separados espacialmente en 3 dimensiones en la muestra sólida, lo que permite una alta resolución y sensibilidad. Los componentes marcados selectivamente, como los marcados con un anticuerpo fluorescente, pueden identificarse luego de manera sensible y rápida, por ejemplo, mediante microscopía fluorescente para detectar objetivos de interés marcados.

Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos proporcionan, en efecto, un escáner 3D, o imagen, de una biopsia líquida. Los biomarcadores raros como, pero no limitados a, células circulantes raras como células tumorales circulantes (e incluso grupos de células tumorales circulantes intactas), o ácidos nucleicos libres de células, pueden aparecer como señales discretas en la muestra escaneada resultante. Esto contrasta con otros métodos, como las aplicaciones basadas en microfluidos en las que tales biomarcadores se detectan indirectamente, o los métodos de citología convencionales basados en el examen de una pequeña muestra de células superpuestas en un portaobjetos estándar.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los presentes métodos ofrecen la ventaja adicional de no imponer ningún límite morfológico o de tamaño celular a los componentes que se están analizando. Por ejemplo, las tecnologías de detección de CTC existentes basadas en métodos de enriquecimiento específicos pueden pasar por alto inadvertidamente biomarcadores raros. Además, los múltiples pasos de procesamiento subyacentes a los métodos de detección de CTC existentes pueden inducir cambios en los biomarcadores celulares que pueden reducir aún más la sensibilidad y precisión de los métodos de detección. Por el contrario, las realizaciones de los métodos descritos en la presente divulgación no requieren ningún criterio de selección específico con respecto a los materiales biológicos que se están analizando. En su lugar, permiten la captura de un conjunto complejo de materiales celulares y extracelulares, independientemente de su forma y morfología, para ser capturados, preservados y separados espacialmente en una muestra solidificada tridimensional.

En realizaciones ejemplares, los métodos divulgados actualmente permiten la resolución discreta y la identificación de células individuales en la muestra solidificada, debido a su dispersión espacial (separación) en la matriz de la muestra solidificada. Además, los métodos actualmente divulgados permiten el análisis de detalles específicos de la propia célula identificada (por ejemplo, detalles morfológicos de la célula) y la relación espacial de las células identificadas con otras células de la muestra. Por ejemplo, en realizaciones ejemplares, los métodos actualmente divulgados permiten el análisis de un grupo de células, en el que una de las células dentro del grupo es la célula particular de interés. La morfología de la célula de interés particular también puede compararse en su estado no unido frente a la morfología de las células en un grupo para determinar, por ejemplo, una progresión clínica del estado de la enfermedad en el sujeto. En otras realizaciones ejemplares, pueden analizarse fragmentos de células (por ejemplo, fragmentos celulares en glóbulos blancos), o biomoléculas secretadas por células de acuerdo con los métodos actualmente divulgados.

Métodos asistidos por matriz

La divulgación proporciona, en parte, métodos asistidos por matriz para procesar y analizar una muestra líquida, como una muestra de biopsia que puede contener biomarcadores raros, como células tumorales circulantes o ADN tumoral libre de células.

En realizaciones ejemplares, los pasos de los métodos se usan para generar una imagen de los componentes dispersos de la muestra en una configuración espacial 3D. En algunas realizaciones, los métodos incluyen solidificar una muestra líquida que comprende materiales biológicos dispersos en una forma que permite la obtención rápida de imágenes, como por microscopía de lámina de luz u otras técnicas microscópicas. En algunas realizaciones, los métodos comprenden: (a) añadir un agente solidificante a un espécimen líquido que comprende materiales biológicos; (b) generar una muestra solidificada que comprende los materiales biológicos; y (c) obtener imágenes de la muestra solidificada para identificar uno o más componentes en los materiales biológicos dispersos.

En algunas realizaciones, una muestra líquida comprende materiales biológicos y se somete a múltiples pasos de procesamiento, que pueden incluir, pero no se limitan a, los ilustrados en las etapas representadas en la

FIG. 1, que se describen con detalle a continuación.

Etapas 1 - Preparación de las células

En algunas realizaciones, los métodos comprenden la preparación o la obtención de una muestra líquida con materiales biológicos, que pueden dispersarse y posteriormente capturarse en forma sólida, permitiendo de este modo una detección de alta resolución.

Aunque en la FIG. 1 se representa como una muestra de sangre, las muestras líquidas pueden proceder de múltiples fuentes, por ejemplo, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido seminal u otras fuentes líquidas. Se observa además que, aunque la divulgación ejemplar se refiere a células CTC, puede aplicarse de igual manera a otros biomarcadores que pueden estar presentes en muestras de biopsia líquida.

En algunas realizaciones, los materiales de la muestra líquida se obtienen a partir de una muestra de sangre procesada, como la obtenida en una biopsia líquida. El procesamiento puede implicar uno o más pasos. Por ejemplo, el procesamiento puede incluir la eliminación de glóbulos rojos y el aislamiento (recogida) de células PBMC. Más concretamente, la muestra de sangre puede someterse a centrifugación para eliminar los eritrocitos (glóbulos rojos) y las plaquetas. El procesamiento también puede implicar el fraccionamiento de la muestra de sangre en diferentes componentes mediante técnicas de separación bien conocidas, como la centrifugación en gradiente de densidad. Por ejemplo, dichas técnicas de separación pueden incluir la extracción de glóbulos rojos (RBC) y la recogida o aislamiento de mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Como se muestra en la FIG. 1, en realizaciones ejemplares, las muestras de sangre pueden proporcionarse en un tubo o recipiente que incluya anticoagulantes, como un tubo de recogida de sangre evacuado con EDTA o heparina. La muestra de sangre puede tratarse con un medio de separación celular, como Lymphoprep™ o Ficoll-Paque™, centrifugarse y eliminarse el sobrenadante. Alternativamente, pueden emplearse tubos de aislamiento de PBMC (por ejemplo, los tubos SepMate™ disponibles de Stemcell™ Technologies). La muestra de sangre también puede someterse a lisis de RBC, si se desea, de acuerdo con técnicas conocidas, como la aplicación de una solución de cloruro de amonio comercialmente disponible o sintetizada (por ejemplo, soluciones de cloruro de amonio disponibles de Stemcell™ Technologies) basada en protocolos conocidos por los expertos en la técnica, que puede realizarse antes o después de la centrifugación. En otras realizaciones, no se emplea una lisis de RBC, ya que las trazas de RBC no afectan a la obtención de imágenes ni al análisis de la muestra.

En realizaciones ejemplares, se obtiene un sedimento (por ejemplo, un sedimento que contiene PBMC aisladas), por ejemplo, por centrifugación, y se procesa como se describe a continuación. En ciertas realizaciones ejemplares, el volumen del sedimento puede ser de por lo menos 5 µl, o por lo menos 10 µl, o por lo menos 15 µl. En otras realizaciones ejemplares, se procesan volúmenes inferiores de sedimentos. En cualquier caso, todo el sedimento está encapsulado en un gel, y tiene un tamaño de órdenes de magnitud mayores que los volúmenes de trabajo típicos encontrados en los procesos microfluídicos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los materiales dispersos en la muestra líquida pueden proceder de otras fuentes tisulares. Por ejemplo, pueden proceder de una biopsia obtenida de fluidos corporales distintos de la sangre, como médula ósea, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido seminal u otras fuentes de fluidos. Alternativamente, los materiales dispersos en la muestra líquida pueden reflejar la dispersión líquida de materiales de una biopsia sólida, como una muestra de tejido obtenida de un tumor u otras muestras sólidas derivadas de una estructura u órgano de interés. En algunas realizaciones, los materiales dispersos pueden proceder de fuentes no tisulares. En algunas realizaciones, los materiales biológicos en el espécimen pueden enriquecerse concentrando una gran cantidad de muestra, por ejemplo, a partir de la recogida y sedimentación de células de un volumen mayor de sangre, por ejemplo, 2 ml, 4 ml, 8 ml, o más, u otra fuente de muestra.

En algunas realizaciones, los materiales biológicos en el espécimen pueden enriquecerse concentrándolos a partir de una cantidad relativamente grande de muestra, por ejemplo, centrifugando y recogiendo un sedimento celular de un gran volumen de sangre (por ejemplo, 0,5 cc o 1 cc o más) o de otra fuente tisular.

Antes de su dispersión en la muestra líquida, los materiales pueden someterse a pasos de procesamiento adicionales. En algunas realizaciones, los materiales biológicos pueden someterse a un paso de fijación antes de su dispersión en una muestra líquida, como se analiza adicionalmente en la presente. Alternativamente, la fijación puede producirse después de que los materiales biológicos hayan sido recogidos en la muestra líquida. La fijación también puede producirse después de haber marcado las células. Los fijadores particulares que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación no están limitados e incluyen los conocidos por los expertos en la técnica. En realizaciones ejemplares, el fijador es una solución que incluye uno o más de un glutaraldehído, un formaldehído, un epoxi, o un producto reticulado de uno o más de los anteriores.

En el caso de dianas raras, como las CTC, puede recogerse en serie una gran cantidad de muestra de biopsia líquida y reunirla en un único tubo. Por ejemplo, pueden recogerse y procesarse 2 o más ml de sangre y los sedimentos

celulares se agrupan y vuelven a suspender en un tampón de muestra líquido, por ejemplo, PBS.

En algunas realizaciones, los materiales biológicos incluyen células tumorales circulantes (CTC), fragmentos de células tumorales circulantes, imitaciones de células tumorales circulantes, células epiteliales circulantes (CEC) y células circulantes raras similares.

En algunas realizaciones, los presentes métodos comprenden además el marcado de una o más dianas de interés y la adición de un agente solidificante que permitirá que los materiales marcados dispersos sean capturados en una forma sólida que incluye una red tridimensional reticulada. En otras palabras, el agente solidificante proporciona una matriz sólida que permite la visualización 3D de los componentes de la muestra.

El marcado puede implicar cualquier método conocido en la técnica para identificar una biomolécula, incluyendo medios inmunológicos y moleculares. Por ejemplo, las proteínas diana de interés, ya sea en una superficie celular, intracelular o extracelular, pueden marcarse con anticuerpos (o reactivos inmunológicos relacionados) que se detectan directamente, por ejemplo, con un anticuerpo fluorescente conjugado, o indirectamente, por ejemplo, con inmunohistoquímica o anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios conjugados. El marcado (por ejemplo, químico e inmunomarcado) puede realizarse en un solo paso o, en otras realizaciones, el marcado es un proceso de múltiples pasos.

Por ejemplo, pueden introducirse múltiples anticuerpos de diferentes especies huésped al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo, o en momentos diferentes. En una realización ejemplar, los anticuerpos primarios pueden conjugarse (o premarcarse) con una etiqueta, como un colorante fluorescente o una enzima, por ejemplo, un fluoróforo o los anticuerpos secundarios correspondientes pueden introducirse en la mezcla en un paso. En ciertas realizaciones, se prefiere el marcado en un solo paso al marcado en múltiples pasos, ya que los pasos de marcado generalmente requieren un lavado posterior y, por tanto, los pasos adicionales de centrifugación y eliminación del sobrenadante podrían provocar la pérdida o el daño celular y disminuir potencialmente la sensibilidad de la señal.

De igual manera, las dianas biomoleculares, como el ADN o el ARN, pueden marcarse con sondas de ácido nucleico que se detectan directa o indirectamente, como en el caso de la hibridación fluorescente in situ (FISH). Si se desea, la señal puede amplificarse aún más mediante las tecnologías disponibles, como los sistemas basados en la unión biotina-estreptavidina y la reacción en cadena de la polimerasa. En algunas realizaciones, las sondas pueden identificar otros biomarcadores de enfermedades, como el ADN fetal o tumoral libre de células, o pueden visualizar cambios genéticos y estructurales en los núcleos celulares, como anomalías, amplificaciones, deleciones y translocaciones cromosómicas y del ADN.

Las muestras también pueden marcarse mediante otros métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, con varios colorantes dirigidos a componentes celulares, incluyendo colorantes fluorescentes como DAPI y PI (que se unen a componentes nucleares) y DiD o DiL (que se unen a componentes de membrana).

El marcado también puede implicar otros pasos, como la permeabilización o fijación celular, según sea apropiado y se conozca en la técnica, para permitir la unión eficaz y específica de los reactivos inmunológicos o moleculares a la diana (biomolécula) de interés. En ciertas realizaciones, el marcado se aplica antes de la gelificación y limpieza de la muestra. En ciertas realizaciones, el marcado se aplica preferiblemente antes de obtener un sedimento, o de separar de otro modo los componentes de la muestra, por ejemplo, mientras los materiales biológicos están dispersos en una muestra líquida (por ejemplo, sangre).

El marcado también puede realizarse después de que las células se hayan fijado en estado de gel. Por ejemplo, las células recogidas de la muestra líquida (por ejemplo, PBMC obtenidas de sangre) pueden introducirse en una solución de PFA y puede formarse directamente un gel, antes del marcado. A continuación, la muestra en gel puede marcarse con sondas o de manera pasiva o mediante otros métodos de inmunomarcado activo, como los métodos que implican electroforesis o métodos basados en la presión. Así, en algunas realizaciones, después de ser solidificada, una muestra de gel procesada puede inmunomarcarse (es decir, marcarse por primera vez o para aplicar un marcado posterior). Aunque este enfoque de marcado después de la gelificación puede requerir un tiempo de procesamiento más largo, también puede mejorar la preservación del número de células diana. En algunas realizaciones en las que el marcado se produce después de la solidificación, puede realizarse un procedimiento de fijación en la muestra solidificada después de la formación del gel y posteriormente al marcado.

En otras realizaciones, puede realizarse deslipidación en una muestra celular solidificada (por ejemplo, gelificada), cuando exista la necesidad o el deseo de mejorar la transparencia de la muestra para la obtención de imágenes. En algunas realizaciones, las muestras solidificadas pueden además reticularse con un precursor de hidrogel o epoxi y deslipidarse siguiendo el enfoque CLARITY. Véase, por ejemplo, "Advances in CLARITY-based tissue clearing and imaging", Exp Ther. Med. 2008; 16(3): 1567-1576. Cabe señalar, sin embargo, que debido a la pequeña pila de células en la muestra que se dispersa en la muestra solidificada, de acuerdo con la mayoría de las

realizaciones generalmente no se requieren los pasos de deslipidación.

Etapas 2 - Solidificación y aclarado de las muestras

En ciertas realizaciones, la solidificación de una muestra incluye introducir un agente solidificante (por ejemplo, un agente gelificante) que permitirá que los materiales biológicos sean capturados en una forma sólida, como una forma de gel, que es compatible con la posterior obtención de imágenes y detección de biomoléculas de interés marcadas. Los agentes solidificantes pueden incluir, entre otros, precursores de poli(acrilamida). En algunas realizaciones, tales agentes se basan en polisacáridos o proteínas. Véase, por ejemplo, Kar et al. 2019, Current developments in excipient science: in Fundamentals of Drug Delivery, 29-83. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el agente solidificante puede consistir, o consistir esencialmente, en una solución de igualación del índice de refracción en sí, modificada según sea necesario para proporcionar la viscosidad adecuada, para proporcionar un gel físico rígido.

De acuerdo con la presente invención, el agente solidificante comprende una mezcla de monómeros químicos y reticulantes para crear un gel químico sintético, es decir, que tenga una red polimérica químicamente reticulada.

La solidificación (por ejemplo, gelificación) puede comprender, en realizaciones ejemplares, la dispersión o resuspensión de los materiales biológicos en un material gelificante que está en forma líquida.

Durante la fase de pregelificación, de acuerdo con esta realización ejemplar, la muestra permanece en un estado fluido o fundido y los materiales pueden mantenerse en un estado disperso antes de transferirlos a un soporte para obtención de imágenes en la Etapa 3. Por ejemplo, el agente solidificante puede introducirse en una muestra marcada (por ejemplo, un sedimento de PBMC marcado como se muestra en la FIG. 1) y la mezcla se mezcla, como con una pipeta o mediante un mezclador de vórtice. Por consiguiente, el agente gelificante en ciertas realizaciones es un agente gelificante reversible, en el sentido de que el agente gelificante (y la muestra) pueden calentarse para alcanzar el estado fluido o fundido, si se desea.

En algunas realizaciones, la dispersión o resuspensión de la muestra biológica en una mezcla y la formación de un gel permiten generalmente que los componentes de la muestra se establezcan en una distribución espacial con propiedades suficientes, como la transparencia, para permitir la posterior obtención de imágenes. En ciertas realizaciones, pueden introducirse en una mezcla gelificada o pregelificada materiales de igualación de índice de refracción que tienen un índice de refracción (por ejemplo, que tienen un índice de refracción entre 1,3-1,6 o 1,33-1,5, o un RI aproximadamente equivalente al agua), aunque en otras realizaciones pueden usarse materiales de igualación de RI que tienen otros índices de refracción. Como es conocido en la técnica, los materiales de igualación de índice de refracción (también denominados igualación de RI o RIM) son capaces de penetrar en el tejido/célula para lograr la transparencia del tejido/célula e incluyen, entre otros, CUBIC-R+, RapidClear, RIMS o ScaleView. Véase Neuropathol Appl Neurobiol, 2016 oct;42(6):573-87.

En ciertas realizaciones, no se requiere un material que iguale el índice de refracción. Por ejemplo, para muestras pequeñas, la luz láser puede penetrar a través de la muestra solidificada y excitar células marcadas u otros componentes diana. Es decir, las diferencias en el índice de refracción en la muestra solidificada no son perceptibles cuando un láser no tiene que desplazarse demasiado profundo para provocar la refracción de la luz. Con, por ejemplo, un láser de dos fotones, que tiene más potencia, el láser puede penetrar aún más profundamente sin curvarse. Tales sistemas sólo están limitados por el posible foto-daño de los fluoróforos, y este problema no siempre requiere la adición de material de igualación del índice de refracción, como una solución de igualación del índice de refracción, para evitar dicho daño.

En algunas realizaciones, la pregelificación incluye dispersar o volver a suspender los materiales biológicos en un material gelificante que comprende uno o más precursores de hidrogel, como materiales polimerizables, monómeros u oligómeros, incluyendo monómeros seleccionados del grupo que consiste en grupos solubles en agua que contienen un grupo etilénicamente insaturado polimerizable. Los monómeros u oligómeros pueden comprender uno o más metacrilatos sustituidos o no sustituidos, acrilatos, acrilamidas, metacrilamidas, vinilalcoholes, vinilaminas, alilaminas, alilalcoholes. Los precursores también pueden incluir iniciadores de polimerización, reticulantes y otros componentes, como se conoce en la técnica, descritos, por ejemplo, en los documentos WO2019023214 y WO/2020/013833.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden transferir la mezcla de pregelificación, mientras se encuentra en estado líquido o fundido, a pocillos de muestra en un soporte. En algunas realizaciones, los pocillos del soporte permiten la formación de una muestra sólida que es adecuada para la obtención de imágenes. Por ejemplo, las muestras sólidas pueden tener la forma de un bloque u otra forma que está personalizada para la obtención de imágenes mediante microscopía fluorescente. Alternativamente, en ciertas realizaciones, el paso de pregelificación puede llevarse a cabo en una combinación de tubo y portamuestras, permitiendo de este modo que la solidificación (por ejemplo, la gelificación) se produzca en el mismo tubo y eliminando la necesidad de transferir posteriormente la solución líquida a un portamuestras separado.

Después de la solidificación, la muestra puede procesarse mediante pasos adicionales antes de la obtención de imágenes. Por ejemplo, la muestra puede equilibrarse en un material de índice de refracción para que se iguale adecuadamente (por ejemplo, se clarifique) para la obtención de imágenes en el paso 3 (igualación de RI). Alternativamente, en ciertas realizaciones, el material de igualación de RI se añade al mismo tiempo que el agente solidificante. En otras realizaciones, el material de igualación de RI se añade con el agente solidificante y, a continuación, se añade una segunda ronda de material de igualación de RI a la muestra solidificada para proporcionar la transparencia final deseada de la muestra.

En la técnica se conocen los materiales de igualación de RI y pueden emplearse en una cantidad adecuada que proporcione la transparencia deseada a la muestra de geles solidificados. En ciertas realizaciones, el material de igualación de RI tiene un RI de aproximadamente 1,39 a aproximadamente 1,65, o de aproximadamente 1,49 a aproximadamente 1,55 (por ejemplo, aproximadamente 1,52). Por ejemplo, y sin limitación, el material de igualación de RI puede ser los obtenidos de la Tabla 3, Neuropathology and Applied Neurobiology, noviembre de 2015, "Bringing CLARITY to the human brain: Visualization of Lewy pathology in three dimensions", Liu y otros, disponible en <https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-different-refractive-index-matching-solutions-Abbreviations-BABB_tbl3_283493188>.

Paso 3 - Montaje y obtención de imágenes de muestras

Este paso implica, en realizaciones ejemplares, el montaje de la muestra en un soporte de imágenes y la obtención de imágenes de la muestra sólida mediante un medio de obtención de imágenes apropiado, como la microscopía fluorescente.

En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir, antes de la obtención de imágenes, el montaje de la muestra en un soporte de imágenes, como un portamuestras impreso en 3D como se muestra en la FIG. 1, y la obtención de imágenes de la muestra, por ejemplo, en una cámara de agua o en una solución de igualación de RI. El portamuestras puede personalizarse de acuerdo con la preparación particular de la muestra. En algunas realizaciones, puede comprender una base y dos paredes laterales. En algunas realizaciones, como el uso para una muestra preparada en un medio viscoso, el soporte puede tener cuatro paredes que rodean y preservan la configuración espacial de los componentes dispersos en la muestra. En algunas realizaciones, la obtención de imágenes puede llevarse a cabo en una cubeta de muestras con un microscopio de epifluorescencia estándar. La muestra de gel 3D puede montarse en el portamuestras con la ayuda de un gel de montaje (por ejemplo, agarosa, poli-L-lisina, superglue). Véase, por ejemplo, Asano et al., Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissue, Current Protocols in cell biology (2018), en particular las páginas 34-36 - "Sample mounting".

Los enfoques de microscopía de fluorescencia incluyen, pero no se limitan a, microscopía confocal convencional, microscopía confocal de barrido por resonancia, microscopía de disco giratorio y microscopía de lámina de luz, como se representa en la FIG. 1. En realizaciones específicas, se obtienen imágenes rápidamente de una muestra de gel mediante microscopía de lámina de luz, como la microscopía de fluorescencia de lámina de luz (LSFM), usando una lente de detección y una lente de iluminación, como se muestra en la FIG. 1. En ciertas realizaciones, pueden usarse haces gaussianos o, alternativamente, perfiles de haz especializados, como el haz de Bessel no difractante, como se muestra en la FIG. 1. Tal obtención de imágenes permite que los materiales en el bloque de muestra 3D sean escaneados y evaluados para determinar la presencia discreta de un biomarcador marcado. Como es conocido en la técnica, un procesador puede estar en comunicación con el microscopio para recibir la salida del mismo y combinar las áreas de objetos adyacentes de las que se han obtenido imágenes secuencialmente (es decir, "ensamblaje"). Véanse, por ejemplo, las técnicas y los aparatos divulgados en las Patentes de Estados Unidos N° 10.746.981, 10.876.870 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N° 2016/0041099 y la Solicitud de Patente Internacional Publicada N° WO 2017/031249, que pueden encontrar uso de acuerdo con la materia divulgada actualmente.

También pueden usarse otras fuentes de luz de detección y las correspondientes aplicaciones de microscopía. Por ejemplo, puede usarse microscopía óptica para examinar células teñidas con colorantes visibles, como las teñidas con H&E (hematoxilina y eosina) o mediante inmunohistoquímica (IHC). Además, puede usarse microscopía de rayos X para detectar componentes líquidos que hayan sido marcados con etiquetas metálicas apropiadas.

Pueden usarse otras técnicas de obtención de imágenes, incluyendo las imágenes adquiridas mediante cámaras de alta resolución incluidas en teléfonos inteligentes disponibles comercialmente (por ejemplo, teléfonos inteligentes iPhone® o basados en Android®) o sistemas de detección de luz relacionados.

Paso 4 - Visualización y análisis

Los presentes métodos también pueden usarse para evaluar, diagnosticar o monitorizar una enfermedad. Por ejemplo, una biopsia líquida (por ejemplo, sangre completa, procesada como se ha descrito anteriormente) puede

analizarse microscópicamente para detectar la existencia de una célula rara en la misma. Por ejemplo, con los métodos divulgados instantáneamente pueden detectarse, por ejemplo, células de adenocarcinoma colorrectal, células de leucemia, el tipo de cáncer, el grado de desarrollo del cáncer, si el cáncer responderá a una intervención terapéutica, etc.

En algunas realizaciones, los métodos divulgados pueden usarse para detectar biomarcadores celulares asociados con otras enfermedades y trastornos, como enfermedades y trastornos inflamatorios, metabólicos, gastrointestinales, endocrinos, inmunológicos, musculoesqueléticos, cardiovasculares, cardiopulmonares, genitourinarios, hepatológicos, respiratorios, víricos y neurológicos, de acuerdo con las realizaciones de la divulgación.

Además de detectar la presencia de biomarcadores, como ciertas células o componentes extracelulares (por ejemplo, factores circulantes derivados de tumores, proteínas secretadas, vesículas y exosomas liberados, y ácidos nucleicos libres de células y otros biomarcadores), los métodos divulgados instantáneamente pueden usarse para determinar las interacciones célula-célula, los volúmenes celulares, las relaciones núcleo-citoplasma y otros fenómenos. En algunas realizaciones, la obtención de imágenes puede usarse para analizar la morfología y estructura celular, incluyendo el análisis del cambio en la morfología y estructura celular en comparación con su estado nativo o sano. Por ejemplo, los métodos de obtención de imágenes pueden usarse para analizar la apariencia externa de las células, como su tamaño, forma u otras características externas. Además, los métodos de obtención de imágenes pueden usarse para analizar la forma y estructura de los componentes internos de la célula, como el núcleo, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, las mitocondrias u otros orgánulos.

Como otro ejemplo, puede prepararse una biopsia mediante dispersión líquida de una muestra de un tejido enfermo, como de riñón, corazón, estómago, hígado, páncreas, intestinos, cerebro, etc., para determinar el estado del tejido, el grado de desarrollo de la enfermedad, la probabilidad de que el tejido tenga éxito, etc. Los métodos de la presente, mediante el uso de colorantes dirigidos a componentes de membrana o celulares, por ejemplo, pueden usarse aquí para evaluar cambios morfológicos en la población celular que pueden ser indicativos del estado de una enfermedad.

Los métodos también pueden usarse en otras aplicaciones. En una aplicación, puede usarse una muestra biológica líquida para examinar agentes terapéuticos candidatos en cuanto a su efecto sobre un tejido o enfermedad. Por ejemplo, puede prepararse una muestra líquida obtenida de un sujeto, como un ratón, una rata, un perro, un primate, un ser humano, etc., que ha entrado en contacto con un agente candidato mediante los métodos divulgados en la presente y analizarse microscópicamente para uno o más parámetros celulares o tisulares, es decir, atributos o características de componentes subcelulares que pueden medirse.

En otra aplicación, los métodos también pueden usarse para visualizar la distribución de marcadores genéticamente codificados en una muestra líquida preparada mediante la dispersión de materiales de un tejido. Tales marcadores pueden incluir, por ejemplo, anomalías cromosómicas (inversiones, duplicaciones, translocaciones), pérdida de heterocigosidad genética, la presencia de marcadores genéticos que indican una predisposición hacia un estado de enfermedad o un estado sano. Dicha detección puede ser útil, por ejemplo, en el diagnóstico y monitorización de enfermedades, como en la medicina personalizada, el estudio de la paternidad u otras aplicaciones.

Detección de CTC

En ciertas realizaciones ejemplares, los métodos divulgados en la presente se usan para detectar CTC por medios inmunológicos o moleculares con propósitos de diagnóstico y para abordar su importancia clínica. Las CTC son células raras que circulan en la sangre u otros fluidos junto con millones de otras células circulantes. Los presentes métodos capturan estas células raras en una forma tridimensional solidificada de una muestra líquida compleja o biopsia líquida. Cuando posteriormente se obtienen imágenes de la muestra, por ejemplo, mediante microscopía fluorescente de lámina de luz, cualquier CTC puede detectarse como señales discretas en el bloque de muestra. Ventajosamente, los métodos permiten dicha detección de CTC sin reducir su heterogeneidad biológica. También pueden incluir menos intervenciones que las necesarias para el procesamiento mediante microfluidos o citología tradicional, que pueden alterar la morfología o impedir la sensibilidad.

EJEMPLOS

La presente divulgación se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitativos. Se entiende que estos Ejemplos son meramente ejemplificativos, y no debe interpretarse que limitan el alcance de una o más realizaciones, tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1 - Detección asistida por matriz de CTC en una muestra de sangre de paciente

Antecedentes

Las CTC son células raras que circulan en la sangre u otros fluidos junto con millones de otras células

circulantes que pertenecen, por ejemplo, al compartimento hematopoyético, y no se adhieren espontáneamente. Estas pobres propiedades adhesivas dificultan los métodos existentes en la técnica para detectar las CTC, como el uso de un soporte sólido para aislar e inmovilizar las CTC. Los métodos divulgados actualmente permiten detectar estas células raras, si las hay, en una representación tridimensional compleja de una muestra líquida, sin limitar su heterogeneidad biológica y reduciendo las intervenciones que podrían alterar la morfología. Además, los métodos basados en soportes modificados y matrices recubiertas con moléculas antiadhesión (u otras proteínas de unión) pueden provocar respuestas biológicas que alteren la morfología de las CTC, llevando a análisis inexactos. La inmunoinmovilización se basa en una fuerte afinidad entre los anticuerpos recubiertos y las proteínas de la membrana celular. Una baja expresión de la proteína de superficie diana o una baja afinidad de los anticuerpos puede llevar a una baja tasa de captura de las células diana. De manera similar, la citocentrifugación de las células en un soporte como un portaobjetos de microscopio, seguido de su fijación y posterior marcado, puede romper las células o alterar su morfología, dificultando la evaluación diagnóstica. Por el contrario, un portaobjetos de microscopio requiere que las células se recubran en una sola capa para permitir la obtención de imágenes, lo que reduce en gran medida el rendimiento, o el número de células, de las que se obtienen imágenes y se analizan.

Los métodos de detección que se basan en microfluidos, nanoestructuras y canales pueden sufrir limitaciones similares. Véanse, por ejemplo, los documentos WO2012016136; WO2013049636. Tales métodos pueden inducir tensión de flujo en los componentes celulares de la muestra líquida, comprometiendo su morfología y otras características. De manera más general, tales métodos típicamente seleccionan una población homogénea de células basándose en el tamaño o la expresión de proteínas de membrana superficiales, limitando la heterogeneidad biológica que de otro modo es susceptible de análisis diagnóstico de una muestra clínica o biológica.

Por lo tanto, es deseable identificar métodos de biopsia que puedan minimizar manipulaciones prolongadas, la interacción de estímulos externos y los tratamientos prolongados. Tales mejoras pueden contribuir a mejorar tanto el estado natural como la heterogeneidad de las células, y otros componentes, en una biopsia líquida, proporcionando de este modo herramientas más precisas para aplicaciones diagnósticas, como el diagnóstico precoz de posibles procesos metastásicos.

Las CTC en sangre periférica pueden considerarse una extensión de un tumor. Un tumor es típicamente heterogéneo, lo que significa que, a través de mutaciones, un tumor puede desarrollar varios tipos de células diferentes en su interior. Cada tipo celular puede tener sus propias características, que pueden ir de leves a agresivas. Las CTC son células cancerosas raras liberadas por los tumores al torrente sanguíneo que se piensa que desempeñan un papel clave en la metástasis del cáncer. Véase, por ejemplo, Harouaka et al., 2014, Pharmacol. Ther. 141, 209-221.

En la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2019/0113423, incorporada por la presente por referencia, se describe cómo las características moleculares, como la proteína de membrana o la información de ADN/ARN, en un tumor pueden ser indicadores del resultado de la terapia. Esta referencia implica fijar o incrustar una muestra, tal como un tejido sólido o un sedimento celular sólido, en una solución de monómeros de hidrogel, reticular los monómeros, aclarar la muestra reticulada, teñir la muestra aclarada con uno o más marcadores detectables, y obtener imágenes de la muestra teñida usando COLM o un proceso de obtención de imágenes similar.

Por el contrario, la presente divulgación proporciona, en ciertas realizaciones, un método de análisis de células individuales (por ejemplo, de una muestra biológica líquida) que han sido dispersadas y capturadas en una muestra solidificada tridimensional. No se requiere el enriquecimiento o selección de las células, y todas las células pueden marcarse y examinarse visualmente mediante obtención de imágenes de la muestra.

Tampoco hay, en ciertas realizaciones, ninguna necesidad general de deslipidación (por ejemplo, deslipidación basada en SDS) u otros métodos de aclaramiento de la muestra, y ciertas realizaciones del método actualmente divulgado se definen por no incluir tal deslipidación u otro paso de aclaramiento de la muestra. Véase, por ejemplo, Jensen y Berg, 2017, J. Chem. Neuroanat. 86, 19-34. Por tanto, se conserva más información celular, en comparación con, por ejemplo, la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2019/0113423 y los métodos que implican el protocolo CLARITY u otros protocolos de aclaramiento. De acuerdo con la presente divulgación, cada célula individual o grupo de células puede visualizarse y analizarse por separado en una matriz tridimensional, lo que a su vez puede proporcionar información celular completa, como el tamaño celular, la morfología, la distribución de biomarcadores, la relación núcleo-citoplasma y más.

Pueden identificarse múltiples tipos de tumores de acuerdo con la presente divulgación, como cánceres de pulmón, hígado y colon, así como otros cánceres que pueden detectarse como CTC en una biopsia líquida. Por ejemplo, tras la detección de CTC de una biopsia líquida (por ejemplo, de una muestra de sangre) con un marcador EpCAM, la información obtenida puede indicar si el paciente tiene cáncer o no (u otros atributos referentes al riesgo, pronóstico y respuesta terapéutica) proporcionando información, como el número (o tipo) de células cancerosas en, por ejemplo, 1 cc, 2 cc, 3 cc, 4 cc o más de sangre. El EpCAM es un marcador epitelial indicativo de células cancerosas invasivas que pasaron por la transición epitelial mesenquimal (EMT), que es una de las causas principales de la invasión del cáncer. La invasión del cáncer suele comenzar con la EMT de una pequeña población de células tumorales que estimularán el crecimiento de los vasos sanguíneos, proporcionando el paso para que las células

invadan el torrente sanguíneo como CTC.

En el torrente sanguíneo puede haber varias células cancerosas de distintos tejidos presentes, y pueden usar diferentes biomarcadores para identificarlas. Por ejemplo, pueden identificarse CTC con múltiples marcadores de cáncer juntos, como, entre otros, HER2 (mama), CDX2 (colon), CK20 (colorrectal, carcinomas de células transicionales y carcinoma de células de Merkel), CK19 (mama), PD/PDL-1 (varios tipos de cáncer, incluyendo NSCLC, melanoma y células renales) y EGFR (pulmón) de acuerdo con la presente divulgación. La identificación de los diferentes subtipos de células CTC dentro de la muestra de sangre puede proporcionar información sobre el origen del cáncer. A su vez, esta información puede guiar estudios de seguimiento más detallados, como el análisis de alta resolución mediante MRI para identificar la localización de las lesiones y la biopsia de tejido para el examen patológico.

La heterogeneidad celular en sangre también puede aplicarse a células sanas como los leucocitos. De acuerdo con la presente divulgación, puede diferenciarse entre CTC y leucocitos aplicando parámetros como la morfología celular (por ejemplo, los núcleos de las CTC pueden ser mayores que los de los leucocitos) y marcadores moleculares (por ejemplo, EpCAM- CTC+/WBC- y CD45 CTC-/WBC+).

Además, como las CTC han escapado de un tumor primario al torrente sanguíneo, generalmente son muy invasivas. Estas células invasivas pueden dificultar el tratamiento y la curación del cáncer debido a su capacidad de metástasis, así como a su mayor probabilidad de mutaciones, que pueden aumentar la posibilidad de resistencia a la quimioterapia y otras intervenciones terapéuticas. Esto subraya la importancia y el valor de identificar las características moleculares de tales células invasoras para determinar el plan de tratamiento adecuado. Por ejemplo, si la CTC presente en la sangre muestra niveles elevados de PDL-1, la inmunoterapia será probablemente un enfoque más eficaz. Los niveles de PDL-1 pueden determinarse, por ejemplo, con una sonda de anticuerpos de PDL-1 para cuantificar el número de CTC PDL-1+ sobre todas las CTC de una muestra. Como el desarrollo tumoral es casi siempre heterogéneo, lo que significa que un sitio de tumor no representa a todas las poblaciones tumorales, y como las CTC pueden originarse en todos los sitios tumorales, esta medición puede ayudar a predecir la eficacia de, por ejemplo, un tratamiento inhibidor de PD-1/PDL-1. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6627043/>) Como las CTC son raras en la sangre, tales mediciones predictivas serán más precisas si las CTC se capturan y analizan de manera eficiente, como se proporciona en los métodos instantáneamente divulgados.

Otro ejemplo de acuerdo con la presente divulgación implica la determinación del número de CTC y los tipos de células y la administración de la terapia sobre la base de esta determinación (por ejemplo, decidir si continuar un curso actual de tratamiento o instituir un curso diferente o adicional de tratamiento). En el caso de pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia o terapia celular, el número de CTC puede indicar la eficacia del tratamiento. En pacientes con cáncer de colon en estadio III, el número de CTC en 1 cc de sangre puede variar de decenas a miles en casos avanzados y varios cientos en casos menos avanzados. Después de 3 meses de quimioterapia u otra intervención terapéutica en algunos casos avanzados de estadio III, el número de CTC puede descender a 5.000 o incluso acercarse a cero después de 12 meses. Sin embargo, en algunos casos, el número de CTC sólo puede disminuir a aproximadamente dos mil después de 6 meses de quimioterapia y volver a subir a decenas de miles 6 meses más tarde. Esto indica una resistencia a fármacos de las células cancerosas a la intervención terapéutica. La quimioterapia, por ejemplo, puede haber eliminado todas las CTC sensibles a los fármacos, pero otros subtipos que eran resistentes no se verán afectados.

Mediante la realización de un análisis de sangre para la detección e identificación de CTC, de acuerdo con la presente divulgación, de forma regular (por ejemplo, semanal o mensualmente) los médicos y los profesionales de la medicina pueden verificar rápidamente la resistencia del tumor a la quimioterapia y modificar el plan de tratamiento en consecuencia. Por consiguiente, las investigaciones aquí realizadas abordan las limitaciones descritas anteriormente mediante la descripción de formulaciones y métodos para visualizar una muestra de biopsia en tres dimensiones mediante la captura de los componentes dispersos en la muestra en un estado solidificado. Este enfoque tiene numerosas ventajas, como el aumento de la sensibilidad del análisis mediante la separación de los componentes individuales, el aumento de la velocidad del análisis al permitir el uso de técnicas rápidas de obtención de imágenes, como la microscopía fluorescente de lámina de luz, y la mejora de la especificidad del análisis al reducir el número de pasos de procesamiento que de otro modo podrían alterar la morfología y la integridad de los componentes de la muestra, como los marcadores celulares.

Materiales y métodos

Recogida y fijación de muestras:

Se recoge una muestra de sangre (por ejemplo, 2 cc, 8 cc o 10 cc) de un sujeto y se extraen los glóbulos rojos mediante centrifugación en gradiente de densidad usando métodos estándar, como, por ejemplo, centrifugación a 1000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. Véase, por ejemplo, Farahinia et al. 2020, Circulating Tumor Cell Separation of Blood Cells and Sorting in novel Microfluidic approaches: a review. 10.20944/preprints202010.0622.v1; y Lowes et al. 2014, Circulating tumor cells as a real-time liquid biopsy: isolation and detection systems, molecular characterization, and clinical applications; en Pathobiology of human disease: a

dynamic encyclopedia of disease mechanisms (eds, McManus y Mitchell).

Se elimina el sobrenadante, se transfiere a un tubo separado y se vuelve a centrifugar para recoger las células restantes, incluyendo las CTC, y otros componentes biológicos. Opcionalmente, el sedimento se vuelve a suspender en una solución fijadora, como una solución de paraformaldehído al 4%, se agita durante varios minutos, se centrifuga, se lava en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se vuelve a centrifugar. El sedimento se vuelve a suspender en un tampón de bloqueo, se agita durante un par de minutos y se centrifuga de nuevo.

Marcado de biomarcadores:

El sedimento fijado y lavado se vuelve a suspender en tampón de bloqueo y permeabilización, se coloca en un agitador durante varios minutos, se centrifuga y se vuelve a suspender en solución de marcado premezclada durante de 30 a 60 minutos. Dependiendo de la afinidad de unión de los anticuerpos, que puede afectar directamente a la calidad final de la obtención de imágenes, el sedimento puede volver a suspenderse e incubarse en la mezcla de marcado durante más tiempo según sea necesario (por ejemplo, hasta 10 o 20 horas).

Los biomarcadores proteicos de interés pueden marcarse con anticuerpos (o fragmentos o derivados relacionados) que se detectan directamente, por ejemplo, con un anticuerpo fluorescente conjugado, o indirectamente, por ejemplo, con inmunohistoquímica o anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios conjugados. De igual manera, los ácidos nucleicos de interés pueden marcarse con sondas moleculares que se detectan directa o indirectamente. Si se desea, la señal puede amplificarse aún más mediante las tecnologías disponibles, como los sistemas basados en la unión biotina-estreptavidina y la reacción en cadena de la polimerasa. Opcionalmente, la muestra puede centrifugarse y el precipitado lavarse una o más veces.

En este ejemplo, se mezcla una solución de marcado de 200 µl de un tampón de bloqueo PBST con yoduro de propidio (PI) (1:2000) para la tinción nuclear, anticuerpo EpCAM (1:250 para una concentración de anticuerpo superior a 0,1 mg/ml) para la detección de células cancerosas, anticuerpo CD45 (concentración de anticuerpo 1:250) para la detección de células inmunitarias, y anticuerpos secundarios que coincidan con los huéspedes del anticuerpo primario (2 veces el peso del primario), usando Fab de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (<https://www.jacksonimmuno.com/catalog/31>).

Alternativamente, puede realizarse un marcado secuencial, comenzando con la incubación del anticuerpo primario durante 60 minutos o más y un lavado, después el anticuerpo secundario y el lavado, y después la tinción con PI en solución PBS durante 5 minutos, seguido de un lavado. Para otras dianas, puede marcarse la proteína de superficie con anticuerpo o puede marcarse la diana de ADN/ARN con una sonda. También puede emplearse el marcado secuencial con un anticuerpo secundario o un conjugado directo de una molécula fluorescente. También puede usarse un anticuerpo biotinilado con una señal reforzada basada en la afinidad de unión a, por ejemplo, estreptavidina, como se conoce en la técnica. Después de la adición del anticuerpo de marcado o de cualquier sonda o colorante químico, el sedimento puede volver a suspenderse opcionalmente en PFA al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente para fijar todos los materiales de marcado en las células de modo que no se eliminen durante la etapa de solidificación.

Solidificación:

Después de la reacción de marcado, la muestra se lava opcionalmente una o más veces, y luego se vuelve a suspender en una solución que contenga un precursor de hidrogel que pueda polimerizarse tras la adición de cantidades suficientes de un reticulante y un componente que contenga iones (por ejemplo, un componente que contenga iones de Ca^{2+}) para inducir la gelificación. Por ejemplo, la cantidad de reticulante que se introduce puede ajustarse dependiendo de si se desea un sólido de tipo gel, o aumentarse para proporcionar una muestra solidificada de mayor densidad.

En este Ejemplo, la solución de gel que contiene los materiales dispersos se transfiere a un soporte de obtención de imágenes deseado a 25-37°C, como un soporte que comprende pocillos de muestra que tienen forma de bloque (u otra forma deseada), y el soporte puede agitarse o hacerse vibrar para asegurar la dispersión de los materiales en cada pocillo. El soporte que contiene las soluciones de muestra se transfiere a una temperatura menor que permita que se produzca la gelificación en los pocillos, por ejemplo, incubando una muestra dispersa en agarosa LMP a 4°C durante aproximadamente 15-30 minutos.

Cabe señalar que la muestra líquida de sangre original tendrá millones de células no cancerosas que ocultarán las CTC, que son raras y están presentes en niveles extremadamente bajos. La gelificación permite dispersar y separar las células en el espacio tridimensional para la obtención de imágenes (descrito más adelante). Un punto crucial es que se condensan millones de células a partir de un gran volumen (por ejemplo, 10 cc de sangre) en 20µl de bloque de gel (2,71 mm³), del que luego pueden obtenerse imágenes en un tiempo de obtención de imágenes aceptable. En realizaciones alternativas, el volumen puede reducirse aún más para permitir la obtención rápida de imágenes de alta resolución (por ejemplo, hasta 20x o 40x). En ciertas realizaciones, el sedimento de células se reduce

para obtener el menor volumen posible. En tales circunstancias en las que se emplea un volumen relativamente pequeño, la estrecha distancia entre las células puede requerir prestar atención al aclarado del gel debido a la alta densidad de las bicapas lipídicas (membrana celular), pero puede resolverse, por ejemplo, con una solución de igualación de RI optimizada o un láser de mayor potencia, como un microscopio de dos fotones.

Obtención de imágenes:

Una vez se ha formado el bloque de gel (con el contenido disperso), se aclara sumergiéndolo en una solución de igualación del índice de refracción (RI) durante aproximadamente 30 minutos para hacerlo transparente para la obtención de imágenes. A continuación, pueden obtenerse imágenes de la muestra de gel con RI igualado para detectar la presencia de más biomarcadores, que no están segregados de forma discreta en el bloque de gel.

Tal obtención de imágenes puede producirse mediante microscopía, incluyendo métodos eficaces de obtención de imágenes fluorescentes, como la microscopía de lámina de luz. En el caso de biomarcadores marcados con fluorescencia, por ejemplo, pueden obtenerse imágenes rápidamente de la muestra mediante microscopía de fluorescencia en lámina de luz (LSFM) usando un haz de Bessel no difractante. Por ejemplo, el uso de la microscopía de lámina de luz permite obtener imágenes de cientos o miles de células desde un único campo de visión (FOV). Por ejemplo, estableciendo el paso z de obtención de imagen en 1 micra, se obtendrían imágenes de cada célula con un diámetro medio de 15 micras entre 10 y 15 veces de arriba abajo. A diferencia de la regulación indirecta en un gráfico de resumen por citometría de flujo, los datos LFSM adquiridos de la muestra de la que se han obtenido imágenes revelan células individuales que pueden inspeccionarse visualmente para comprobar la validez, intensidad, distribución, etc. del marcado de anticuerpos.

La aplicación de los métodos aquí descritos puede permitir que se detecten rápidamente en una matriz sólida biomarcadores raros, como las CTC, permitiendo la discriminación espacial de biomarcadores marcados. Al reducir la necesidad de pasos de procesamiento que pueden reducir la heterogeneidad de la muestra o alterar sus propiedades, los métodos también proporcionan un enfoque de diagnóstico más sensible y preciso.

Además, los métodos descritos en la presente permiten fijar inmediatamente las PBMC después de la extracción de los RBC, permitiendo capturar su distribución y asociación en su estado original. Ventajosamente, esto permite la visualización directa de las características de la muestra, como las interacciones célula-célula, grupos de células (por ejemplo, microembolias tumorales circulantes) y otras propiedades que pueden indicar el estado de la enfermedad o proporcionar otras aplicaciones de pronóstico o diagnóstico.

Ejemplo 2 - Obtención de imágenes basada en matriz tridimensional de muestras de sangre

Preparación celular

La sangre anticoagulada extraída de un ser humano en un tubo recubierto de EDTA se transfirió a un tubo de 15 ml, se añadió medio de separación celular (por ejemplo, Ficoll®) y la mezcla se sometió a centrifugación en gradiente de densidad (1200 RPM) durante cinco minutos. Después de la centrifugación, la capa leucocitaria (fracción que contiene glóbulos blancos y plaquetas) se transfirió a un tubo de ensayo de 2 ml sin recoger ningún medio de separación. La mezcla resultante se centrifugó de nuevo a 500 g durante 5 minutos para permitir que se formase el sedimento celular en el fondo del tubo. El sobrenadante se retiró cuidadosamente sin alterar el sedimento celular.

Marcado

A continuación, el precipitado se volvió a suspender en 200 µl de solución de marcado (1:1000 PI en PFA al 4% en PBS) para marcar el núcleo celular. La solución de marcado se añadió a 4°C durante 20 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 500 g durante 5 minutos, se recogió cuidadosamente el sobrenadante y se desechó. A continuación, se añadió 1 ml de PFA al 4% en PBS para fijar el colorante químico a 4°C durante 20 minutos, y la mezcla se centrifugó de nuevo a 500 g durante 5 min, desechándose de nuevo el sobrenadante.

Solidificación

Por otro lado, se preparó una mezcla de solución solidificante que incluye aproximadamente un 0,5% en peso de LM agarosa. La solución solidificante se calentó por encima de su punto de gelificación en un microondas hasta la fusión y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, donde se proporciona en estado líquido hasta que alcanza de nuevo su punto de gelificación. Con una pipeta, se añaden lentamente 20 µl de solución solidificante enfriada al sedimento para volver a suspender el sedimento, añadiendo la solución solidificante lentamente para evitar la formación de burbujas. La mezcla se lleva a 4°C y se mantiene durante un periodo de tiempo para permitir la formación del gel (menos de aproximadamente 30 minutos).

Montaje e igualación del RI

Una vez se ha gelificado la muestra, se extrajo cuidadosamente el gel del tubo con una pipeta pinchando el lateral del gel, para obtener un gel de 20 µl de volumen. A continuación, el gel se montó en un portamuestras a temperatura ambiente, en este caso una varilla de gel 3D de 2 mm de diámetro (de la misma composición que la solución solidificante preelaborada en forma de soporte montada en una superficie de plástico impresa en 3D), y se enfrió a 4° C durante 10 minutos para permitir que gelificase. El gel de la muestra en el soporte se sumergió en la solución de igualación del RI durante 5-30 minutos para prepararlo para la obtención de imágenes.

Obtención de imágenes

La muestra se transfirió a una cámara de obtención de imágenes de lámina de luz y se obtuvieron las imágenes (objetivo 10X). Para una muestra de gel de 20 µl, se necesitaron aproximadamente 3 minutos para obtener una imagen de un único canal a una resolución de 10X con un paso z de 4 µm, tiempo de obtención de imágenes que puede reducirse disminuyendo el volumen del gel (aumentando la densidad celular), reduciendo la resolución de la obtención de la imagen (objetivo de menor aumento o paso z más alto) u optimizando los ajustes del microscopio, como los pasos z, y otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

Las FIGS. 2A-2C representan imágenes obtenidas de la cámara de obtención de imágenes de lámina de luz.

Los núcleos de los leucocitos teñidos se muestran en verde azulado. En la FIG. 2A, la imagen representa la totalidad de la muestra de gel de 20 µl desde arriba hacia abajo. La FIG. 2A es una imagen apilada y reducida de 100 µm de imágenes de 25 x 4 µm. En la FIG. 2B, la imagen representa la totalidad de la muestra de gel de 20 µl desde la vista lateral. En la FIG. 2C, la imagen se amplía para captar los leucocitos individuales con mayor detalle, en la que la pequeña línea horizontal de la esquina inferior izquierda equivale a 20 µm en escala.

Ejemplo 3 - Compatibilidad celular

Se recogieron y procesaron células de una línea celular CACO2 obtenida de la ATCC; y células de una línea celular HL60 también obtenida de la ATCC como se describe brevemente a continuación. Las células CACO2 se cultivaron y recogieron mediante tripsinización. HL60 es una línea celular flotante que no requiere tripsinización. Se recogieron las células CACO2 y HL60, se lavaron con PBS y se centrifugaron para recoger el sedimento celular.

Inmunomarcado - Línea celular de cáncer CACO2

Las células CACO2 se tiñeron con azul de tripano y se contaron con un contador celular. Se volvió a suspender un número adecuado de células en 100 µl de PBS. Se añadió el anticuerpo EpCAM(Dako) a la solución celular a una proporción de 1:100 y el anticuerpo secundario se añadió a una proporción molar de 1:2 de anticuerpo primario a secundario.

La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó a 500 g durante 5 min, y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. El sedimento celular se lavó por resuspensión en PBS, y se centrifugó de nuevo a 500 g durante 5 min, y se desechó el sobrenadante. A continuación, se volvieron a suspender las células y se incubaron a 4°C durante 20 minutos en 1 ml de solución de PI en PFA al 4% (1:1000) para fijar el anticuerpo unido y marcar el núcleo celular; la mezcla se centrifugó de nuevo a 500 g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante.

Inmunomarcado - Línea celular de leucocitos HL60

Las células HL60 se tiñeron con azul de tripano y se contaron usando un contador celular. Se recogió un número adecuado de células en 100 µl de PBS. Se añadió el anticuerpo CD45 (Dako) a la solución celular a una proporción de 1:100 y el anticuerpo secundario a una proporción molar de 1:2 de anticuerpo primario a secundario.

La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se centrifugó a 500 g durante 5 min, el sobrenadante se retiró cuidadosamente, y se añadió 1 ml de PBS para lavar, y la mezcla se centrifugó de nuevo a 500 g durante 5 min, y el sobrenadante se recogió de nuevo cuidadosamente y se desechó. A continuación, se volvieron a suspender las células y se incubaron a 4°C durante 20 minutos en 1 ml de solución de PI en PFA al 4% (1:1000) para fijar el anticuerpo unido y marcar el núcleo celular a 4°C durante 20 minutos, y la mezcla se centrifugó de nuevo a 500 g durante 5 minutos, y el sobrenadante se recogió de nuevo cuidadosamente y se desechó.

(Referencia) Solidificación

Por otro lado, se preparó una solución solidificante que contenía aproximadamente un 1% en peso de LM agarosa. La solución solidificante se calentó en un microondas hasta la fusión y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, donde finalmente se proporcionará en estado de gel. Con una pipeta, se añadieron lentamente al precipitado 20 µl de solución solidificante enfriada para volver a suspenderlo, añadiendo la solución solidificante lentamente para evitar la formación de burbujas. La mezcla se lleva a 4°C y se mantiene durante un tiempo para permitir la formación

del gel (menos de aproximadamente 20 minutos).

Obtención de imágenes

- 5 Se obtuvieron imágenes de ambos geles con células CACO2 y HL60 inmunomarcadas con un microscopio de lámina de luz con un objetivo de 10X, tal como se ha descrito anteriormente.

10 La FIG. 3A muestra células HL60 teñidas con CD45/PI, captadas mediante microscopía de lámina de luz. La FIG. 3A se ha ampliado digitalmente como indica la barra de escala de la esquina inferior izquierda, en la que la barra blanca corresponde a 50 μm . El amarillo es indicativo de la tinción PI que marca el núcleo y el verde es indicativo del inmunomarcado de CD45. Las FIGS. 3B-3C representan células CACO2 teñidas con EpCAM/PI, captadas mediante microscopía de lámina de luz. Las imágenes se tomaron con un objetivo de 10 aumentos. La FIG. 3B es la presentación de todo el volumen de gel. La FIG. 3C está ampliada digitalmente como indica la barra de escala. Es decir, en la FIG. 3B la barra de escala representa 300 μm y en la FIG. 3C la barra de escala representa 50 μm .

15 Ejemplo 4 - Marcado multiplex de células CACO2 en muestra de sangre

Enriquecimiento de células cancerosas en muestra de sangre

20 Recuento de células cancerosas

Se realizó un estudio para simular la detección de CTC en pacientes con cáncer. El estudio está diseñado para evaluar la eficiencia de detección de células raras del método de biopsia líquida 3D y el porcentaje de pérdida de células del proceso de preparación celular.

25 Preparación de las células

Se tripsinizó una muestra de células CACO2, se contaron y se sembraron al volumen apropiado en una muestra de sangre periférica recién recogida para elaborar una muestra de sangre enriquecida con células cancerosas. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron mediante lisis de glóbulos rojos. La sangre anticoagulada recogida de un humano en un tubo recubierto de EDTA se transfirió a un tubo de 15 ml. Por cada 1 c.c. de sangre, se añadieron 8 c.c. de solución de cloruro amónico para lisar los glóbulos rojos. El proceso de lisis se llevó a cabo en hielo durante 15 minutos, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular de PBMC recogido, incluyendo las células cancerosas enriquecidas, se volvió a suspender en 100 μl de PBS a la espera del proceso adicional.

Se añadieron anticuerpos EpCAM(Dako) y CD45(Dako) a la solución celular en una proporción de 1:100 y el anticuerpo secundario correspondiente se añadió en una proporción molar de 1:2 entre anticuerpos primarios y secundarios para lograr un proceso de marcado en un solo paso. La muestra celular se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la unión del anticuerpo. A continuación, la muestra se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para recoger el sedimento. El sedimento se lavó con 1 ml de PBS, se centrifugó de nuevo y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se añadió PFA al 4% con PI 1:1000 al sedimento para fijar el anticuerpo marcado y teñir el núcleo durante 30 minutos. A continuación, las células se centrifugaron de nuevo para recoger el sedimento.

45 El sedimento celular se mezcló en solución solidificante como se ha descrito anteriormente. A continuación, se identificaron en la muestra las PBMC mezcladas y las células CACO2, para confirmar la capacidad de detectar múltiples tipos celulares con marcado múltiple de dianas de anticuerpos en una muestra. La FIG. 4A representa los datos completos del gel 3D del marcado multiplex de CACO2 en PBMC, en el que el marcador EpCAM se muestra en magenta y el PI en azul. La FIG. 4B representa una imagen ampliada y apilada de CACO2-EpCAM (magenta), leucocitos-CD45 (verde) y PI (azul). Las FIGS. 4C y 4D representan imágenes de CTC identificadas con y sin EpCAM (señal magenta) para su confirmación.

En estas Figuras, apiladas o separadas, se confirma que en la representación 3D, el marcado EpCAM para la detección de células cancerosas es un enfoque viable. CACO2 muestra una alta expresión de EpCAM sin expresión de CD45 y PBMC (leucocitos) muestran una expresión variable de CD45 pero sin expresión de EpCAM.

Recuento celular

60 Las CACO2 tripsinizadas se contaron y sembraron en 2 c.c. de sangre, se tiñeron y se marcaron como se indica en la tabla siguiente para preparar tres conjuntos de geles (a, b y c):

Volumen sanguíneo	Línea celular enriquecida	Número de células	Sondas
2 c.c.	CACO2	2000	PI, EpCAM, CD45

Se formó un gel tridimensional y se obtuvieron imágenes mediante microscopía de lámina de luz como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3. Se eliminó el ruido de cada imagen y se mejoraron las características de todas las señales inmunomarcadas para la detección celular. Las células con señal EpCAM y PI positiva, y CD45 negativa, se contaron como positivas; las células con señal EpCAM negativa y señal PI positiva se contaron como negativas; y las células con señal PI negativa se contaron como nulas. Otros parámetros como la circularidad de la célula o del núcleo, el volumen de la célula/núcleo y la relación núcleo-citoplasma (relación N:C) pueden cuantificarse para células cancerosas positivas con el uso del algoritmo de detección de células basado en MATLAB o basado en Python.

La FIG. 4A muestra el resultado de las imágenes tridimensionales de los tres conjuntos repetidos de muestra de gel con 2000 células CACO2 inyectadas.

Para visualizar mejor los resultados detectados, los datos de las imágenes 3D se mostraron en proyección máxima, de manera que todas las imágenes 2D se apilaron unas sobre otras para generar un único plano de datos de obtención de imágenes. Las células CACO2 marcadas con EpCAM(color) pueden detectarse visualmente con facilidad ampliando digitalmente el conjunto de datos. Las células EpCAM positivas se examinan en busca de señal CD45 negativa y señal PI positiva. El algoritmo de detección celular criba todas las células con esos parámetros y emite imágenes de CTC identificadas con señales separadas y combinadas como se muestra en la FIG. 4B. Estas imágenes se almacenarán en un único archivo por muestra, y todas las imágenes de células detectadas se confirmarán posteriormente por ojo humano o por un algoritmo de detección de señales.

La tabla siguiente muestra el recuento final de células de los tres conjuntos de geles con a, b y c. Los resultados detectados estaban dentro de una aproximación razonable de los recuentos de células sembradas.

ID de Muestra	Número de células enriquecidas	Célula detectada
a	2000	1987
b	2000	2058
c	2000	2011

El número total de células en todo el gel puede cuantificarse con la señal PI positiva total. Dividiendo el número total de células cancerosas positivas entre el número total de señales PI se obtiene una relación. Multiplicando la relación por un millón se obtiene el número de células cancerosas en un millón de PBMC.

Ejemplo 5 - Detección de CTC en pacientes con cáncer

Se realizó un estudio IRB para detectar la presencia de CTC en la sangre de pacientes con cáncer de colon. El estudio está diseñado para evaluar la eficacia de detección de células raras del método de biopsia líquida 3D. Los pacientes inscritos incluían sujetos sanos y enfermos. En el siguiente ejemplo, se muestran los pacientes con cáncer de colon en estadio II a estadio IV que tenían metástasis en hígado o pulmón.

Preparación de la muestra de sangre

La sangre anticoagulada extraída de un humano en un tubo recubierto de EDTA se transfirió a un tubo de 15 ml. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron mediante lisis de glóbulos rojos. Por cada 2 c.c. de sangre, se añadieron 16 c.c. de solución de cloruro amónico para lisar los glóbulos rojos. El proceso de lisis se llevó a cabo en hielo durante 15 minutos, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular de PBMC recogido, incluidas las células cancerosas enriquecidas, se volvió a suspender en 100 µl de PBS a la espera del proceso posterior.

Paciente A

Se añadieron a la solución celular los anticuerpos EpCAM(Dako) y CD45(Dako) en una proporción de 1:100 y el anticuerpo secundario correspondiente se añadió en una proporción molar de 1:2 entre anticuerpos primarios y secundarios para conseguir un proceso de marcado en un solo paso. La muestra celular se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la unión de los anticuerpos. A continuación, la muestra se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para recoger el sedimento. El sedimento se lavó con 1 ml de PBS, se centrifugó de nuevo y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se añadió PFA al 4% con PI 1:1000 al sedimento para fijar el anticuerpo marcado y tefir el núcleo durante 30 minutos. A continuación, las células se centrifugaron de nuevo para recoger el sedimento.

El sedimento celular se mezcló en solución solidificante (agarosa LM al 1%) y se obtuvieron imágenes como se ha descrito anteriormente. La FIG. 5A muestra los datos de un gel 3D (bloque de apilamiento único) con una

resolución de $0,42\ \mu\text{m} \times 0,42\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, en el que el marcador EpCAM se muestra en magenta, el marcador CD45 se muestra en verde y el PI se muestra en azul. La FIG. 5B muestra una imagen ampliada de las dianas celulares positivas para EpCAM, negativas para CD45 y positivas para PI. Usando el parámetro anterior para cribar CTC positivas, pudimos detectar 195 CTC en aproximadamente 160.000 PBMC, lo que equivale a 1.218 CTC por millón de PBMC.

Paciente B

Se añadieron a la solución celular los anticuerpos CK20(Ventana) y EpCAM(Dako) en una proporción de 1:100 y el anticuerpo secundario correspondiente se añadió en una proporción molar de 1:2 entre anticuerpos primarios y secundarios para lograr un proceso de marcado de un solo paso. La recogida de sedimento celular marcado, la gelificación y la obtención de imágenes se realizaron como se ha descrito anteriormente para el paciente A. La FIG. 6A representa 2 pilas continuas de datos de gel 3D (pila de $600\ \mu\text{m}$ de pila de $1200\ \mu\text{m}$) con una resolución de $0,42\ \mu\text{m} \times 0,42\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, en las que el marcador CK20 se muestra en amarillo, el marcador EpCAM se muestra en magenta y el PI se muestra en azul. La FIG. 6B muestra una imagen ampliada de una sola célula de las dianas celulares positivas para CK20, positivas para EpCAM y positivas para PI. Utilizando el parámetro anterior para detectar CTC positivas, pudimos detectar 12 CTC en aproximadamente 46.200 PBMC, lo que equivale a 259 CTC por millón de PBMC.

A diferencia de otros métodos de observación de células en una muestra compleja, como una muestra de tejido, los métodos aquí descritos no requieren pasos de aclarado que eliminen lípidos o alteren otra información celular para lograr la transparencia del tejido para la obtención de imágenes en 3D. En su lugar, estos métodos combinan la gelificación de la muestra celular dispersa en un espacio tridimensional y la igualación del índice de refracción para lograr la clasificación completa de las células y la visualización en 3D de la información celular completa dentro de la muestra líquida.

Además, aunque en la presente divulgación se proporcionan ciertos detalles para transmitir una comprensión exhaustiva de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas, para los expertos en la técnica será evidente que ciertas realizaciones pueden ponerse en práctica sin estos detalles. Además, en ciertos casos, no se han descrito métodos, procedimientos u otros detalles específicos bien conocidos para evitar oscurecer innecesariamente aspectos de la invención definidos por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método asistido por matriz para analizar una muestra líquida que incluye materiales biológicos para uno o más componentes diana, que comprende:

- (a) añadir un agente solidificante a un espécimen obtenido a partir de la muestra líquida que incluye los materiales biológicos;
- (b) generar una muestra solidificada que comprende materiales biológicos dispersos para capturar e inmovilizar los materiales biológicos dispersos en un estado tridimensional;
- (c) introducir un material de igualación del índice de refracción en la muestra solidificada; y
- (d) obtener imágenes de la muestra solidificada para identificar los uno o más componentes diana en los materiales biológicos dispersos;

en donde el agente solidificante comprende una mezcla de monómeros químicos y reticulantes para crear un gel químico sintético que tiene una red polimérica químicamente reticulada.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además (i) marcar el espécimen obtenido de la muestra líquida en el paso (a) con una o más sondas para los uno o más componentes diana antes de añadir el agente solidificante; y/o (ii) marcar la muestra solidificada del paso (b) con una o más sondas para los uno o más componentes diana.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el marcado comprende poner en contacto el espécimen obtenido de la muestra líquida en el paso (a) con una sonda molecular; y/o poner en contacto la muestra solidificada del paso (b) con una sonda molecular en donde la sonda molecular es un anticuerpo, un colorante fluorescente o una sonda de ácido nucleico.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los uno o más componentes diana incluyen una diana celular o una diana intracelular.

5. El método de la reivindicación 1, que comprende además introducir la muestra sólida gelificada aclarada ópticamente del paso (c) en un portamuestras que está sumergido en una solución que incluye un material de igualación del índice de refracción.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra líquida es una muestra líquida de sangre.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el espécimen se obtiene de la muestra líquida de sangre mediante un proceso que incluye la eliminación de glóbulos rojos y plaquetas de la muestra líquida de sangre, y en donde el espécimen incluye células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de la muestra líquida de sangre.

8. El método de la reivindicación 7, que comprende, además:

- (i) marcar el espécimen que comprende las PBMC aisladas obtenidas de la muestra líquida de sangre con una o más sondas para una o más células circulantes raras antes de añadir el agente solidificante; y/o marcar la muestra sostenida por la matriz del paso (b) con una o más sondas para una o más células circulantes raras; y
- (ii) obtener imágenes de la muestra solidificada del paso c) o de la muestra solidificada aclarada ópticamente del paso d) para determinar la presencia de las una o más sondas, determinando de este modo la presencia de células circulantes raras en la muestra líquida de sangre.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el marcado comprende además la adición de una sonda para glóbulos blancos.

10. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde las una o más sondas reconocen un antígeno específico del cáncer o una secuencia de ADN o ARN específica del tumor.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde las una o más sondas se seleccionan entre un anticuerpo o una sonda de ácido nucleico, y más particularmente, en donde las una o más sondas confieren detección de una o más de EpCAM, HER2, CDX2, CK20, CK19, PD/PDL-1 y antígeno EGFR o secuencia de ácido nucleico correspondiente.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde las una o más células circulantes raras incluyen una célula tumoral circulante.

13. El método de la reivindicación 8 o 9, en donde las una o más células circulantes raras incluyen una célula epitelial circulante o una célula endotelial circulante.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde antes del paso (a), el espécimen biológico se somete a un procedimiento de fijación en donde el procedimiento de fijación comprende incubar el espécimen

biológico en una solución fijadora.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la obtención de imágenes se lleva a cabo mediante microscopía de fluorescencia, opcionalmente, mediante microscopía de fluorescencia de lámina de luz.

16. El método de la reivindicación 1, que comprende además realizar deslipidación en la muestra solidificada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

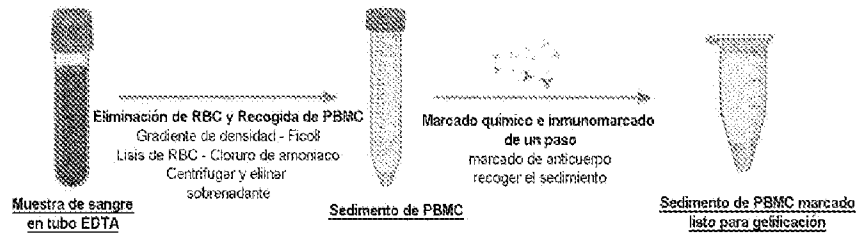
55

60

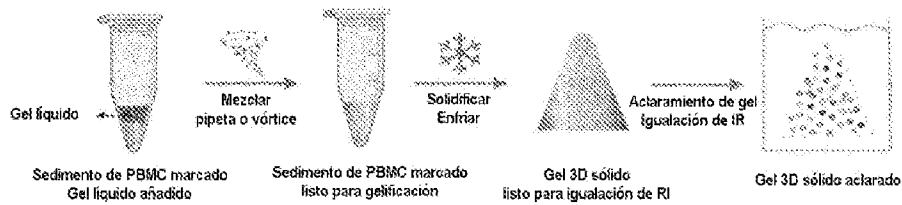
65

FIG. 1

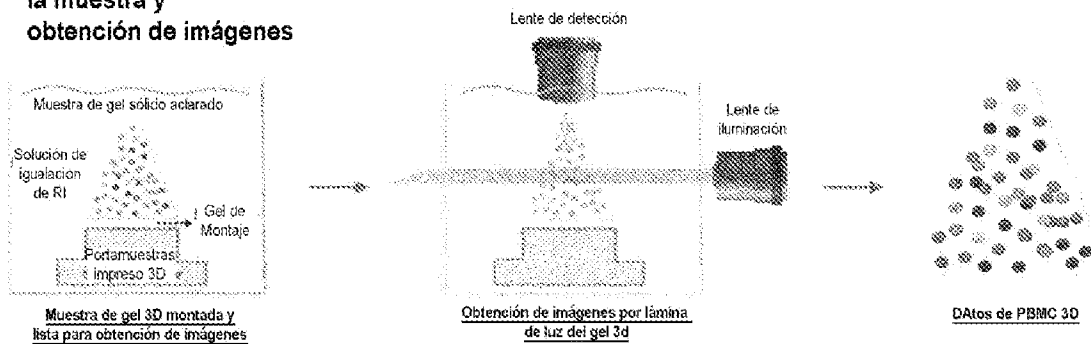
Preparación de células



Gelificación y aclaramiento de la muestra



Montaje de la muestra y obtención de imágenes



Visualización y análisis

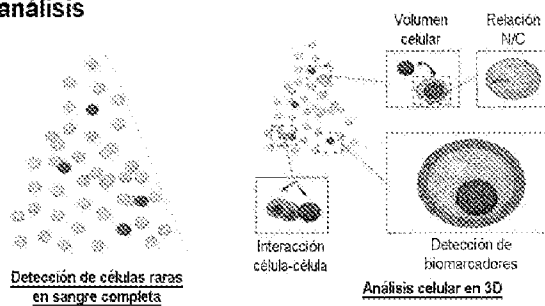


FIG. 2A

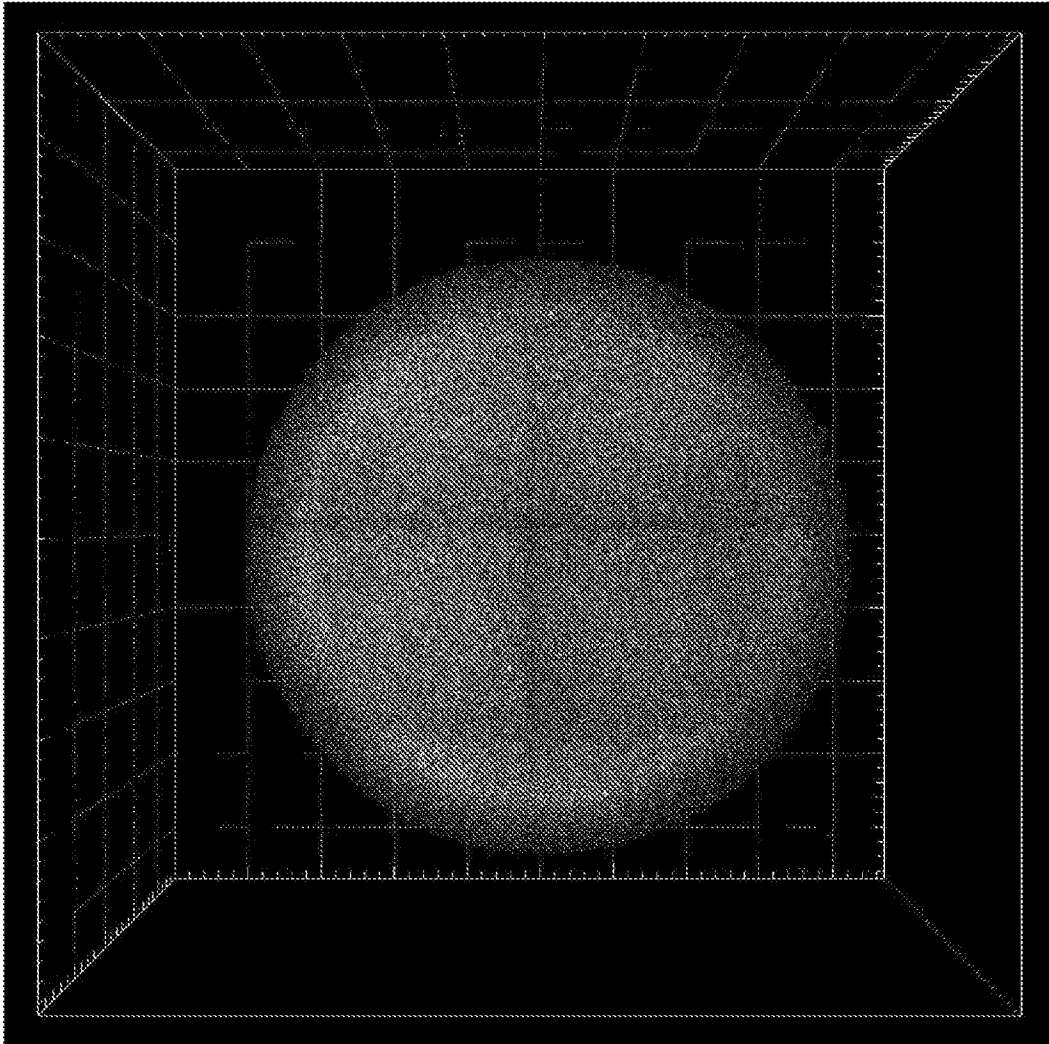


FIG. 2B

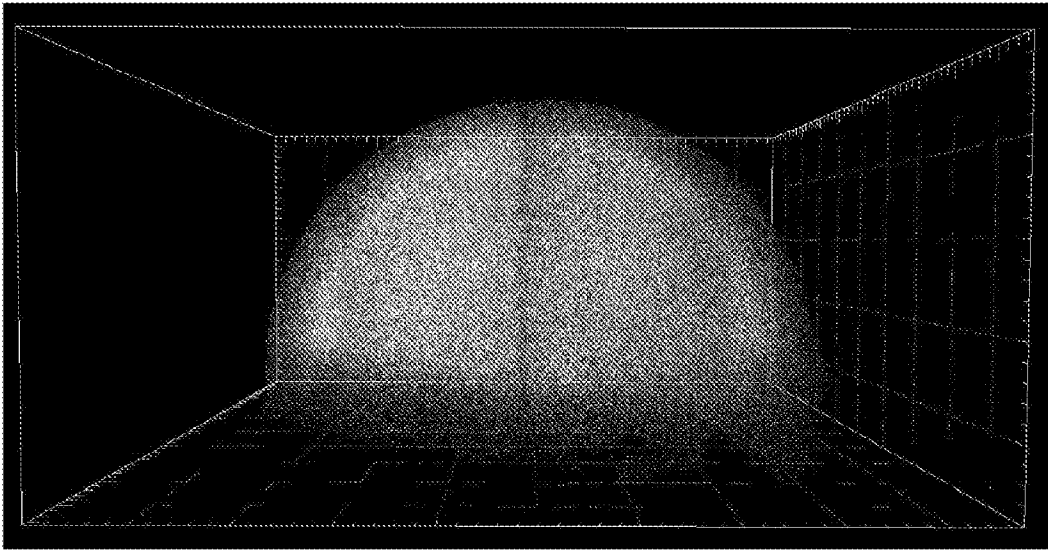


FIG. 2C

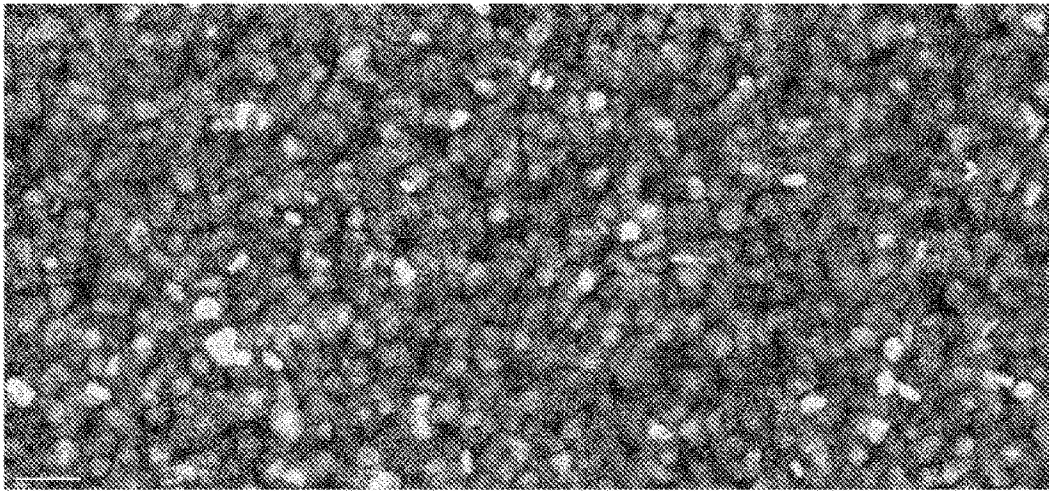


FIG. 3A

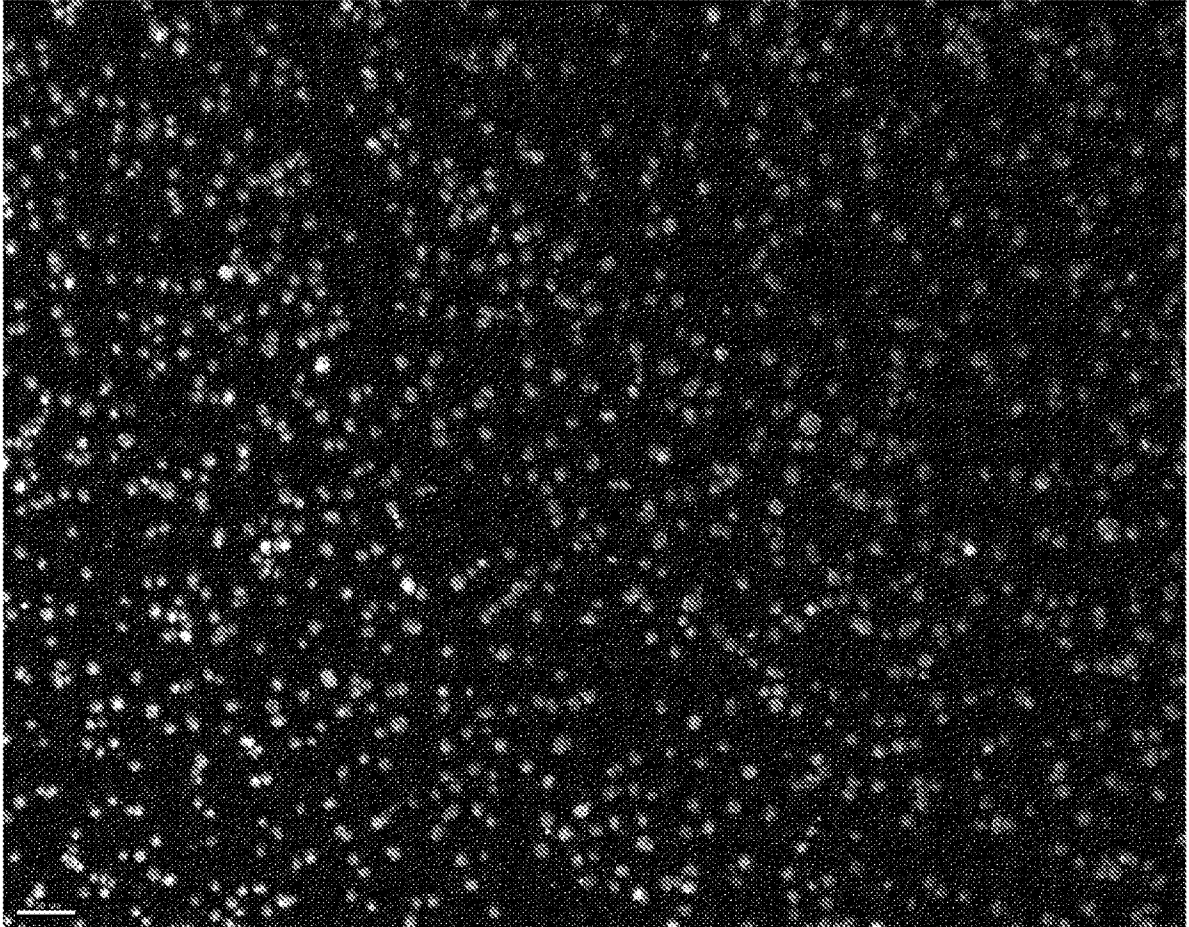


FIG. 3B

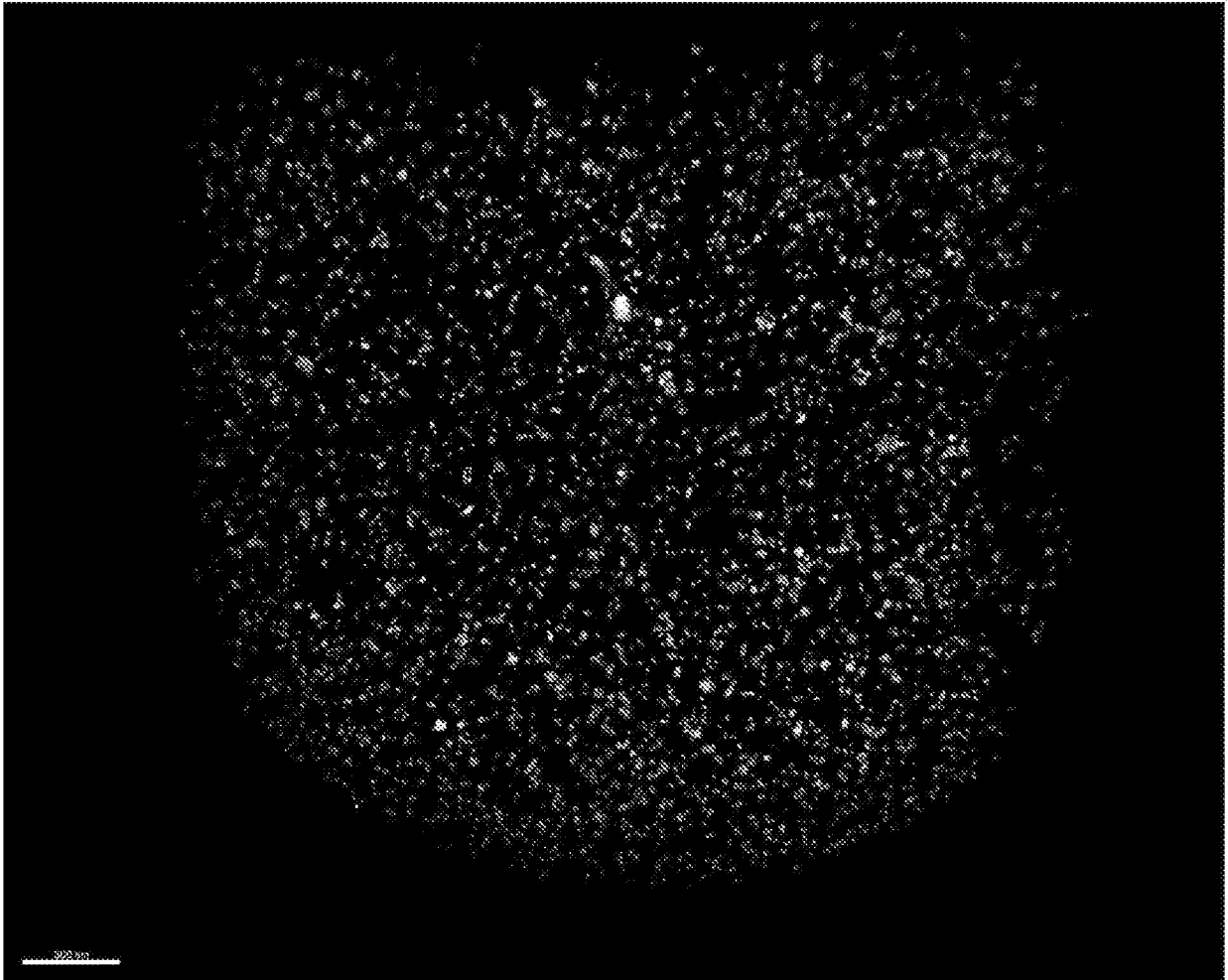


FIG. 3C

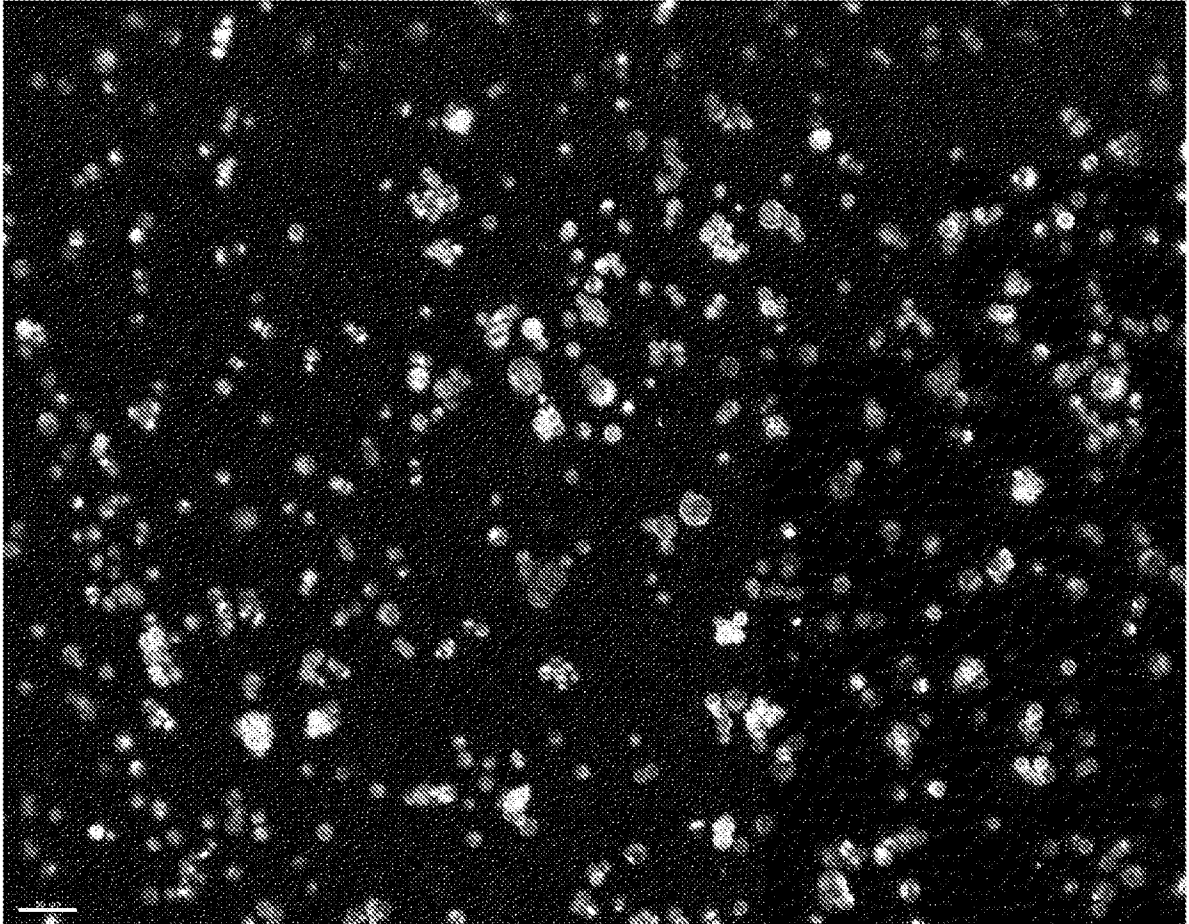


FIG. 4A

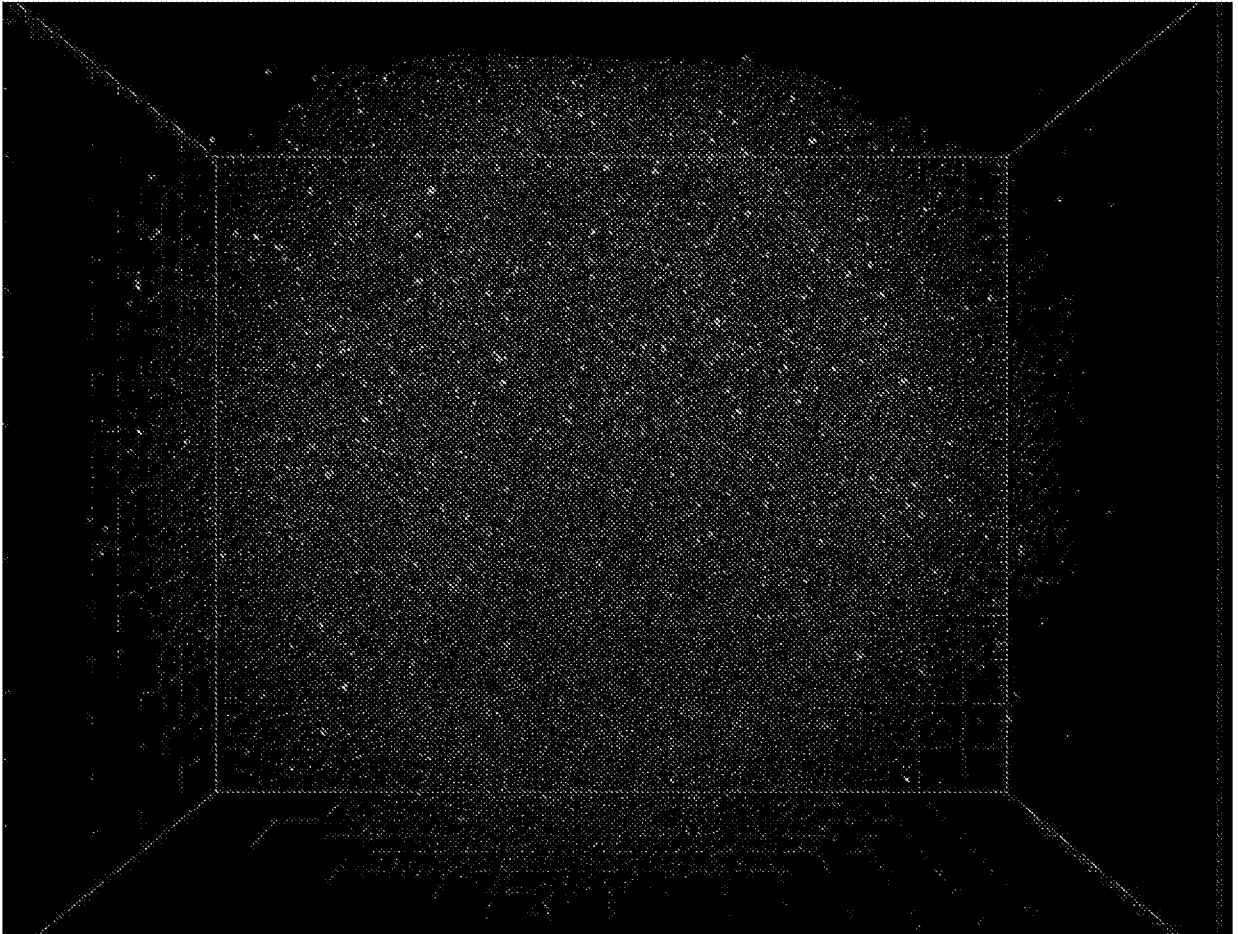


FIG. 4B

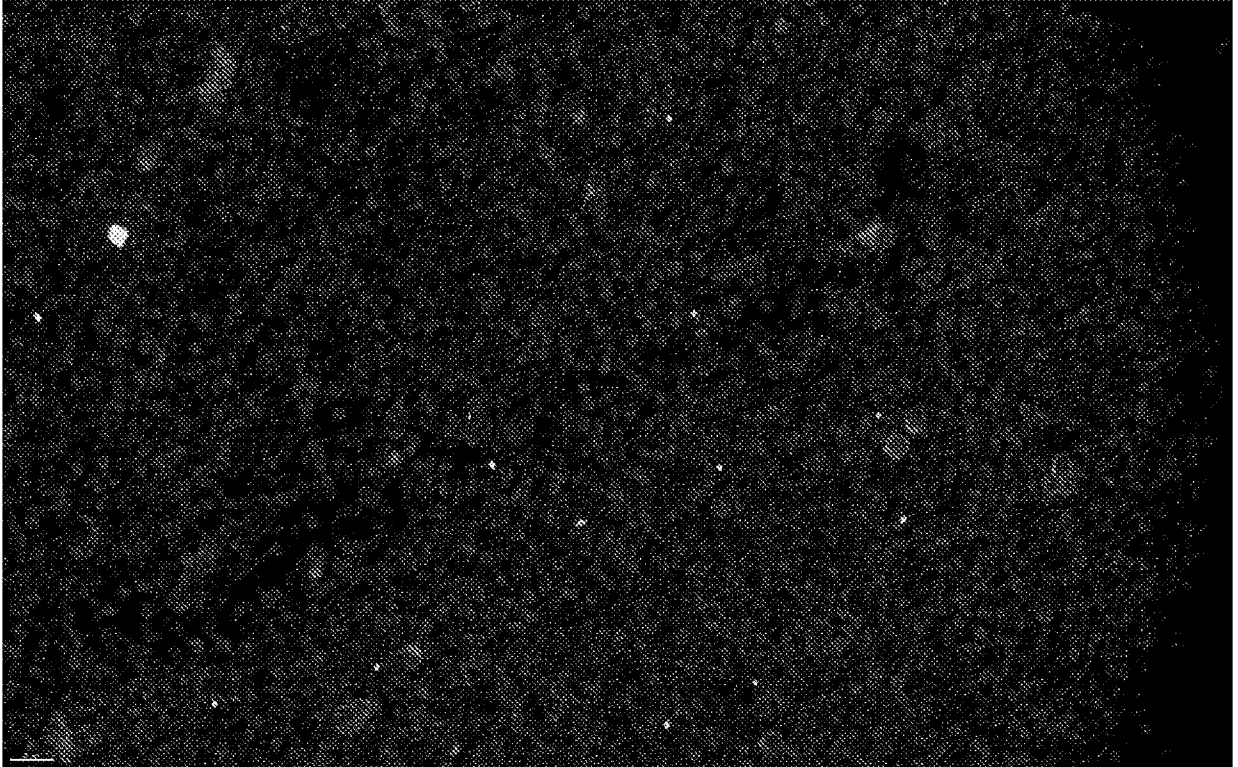


FIG. 4C

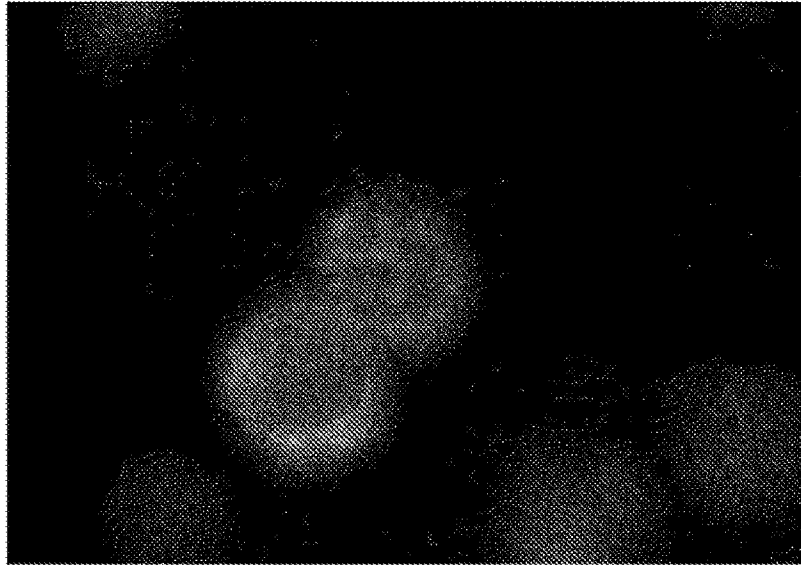


FIG. 4D



FIG. 5A

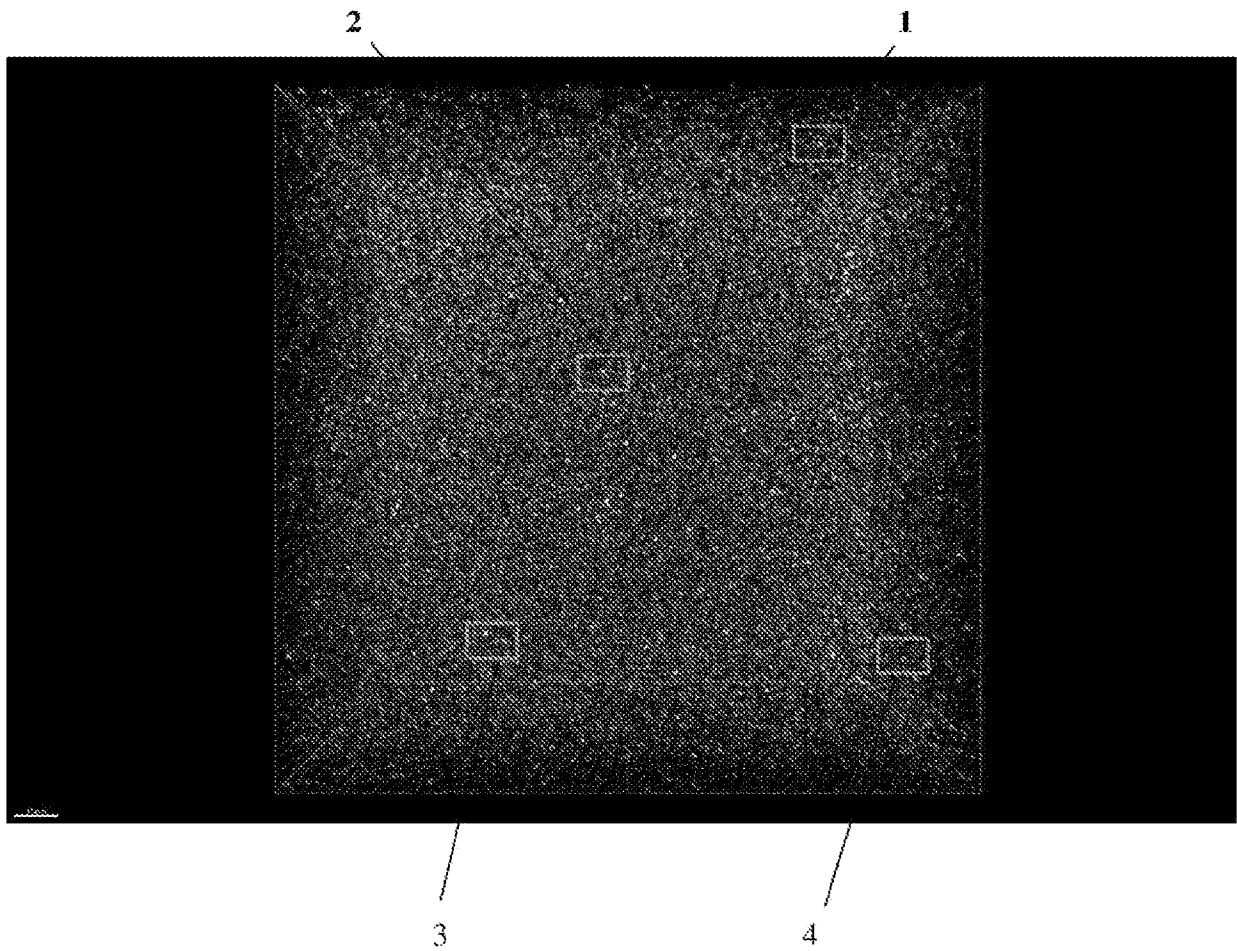


FIG. 5B

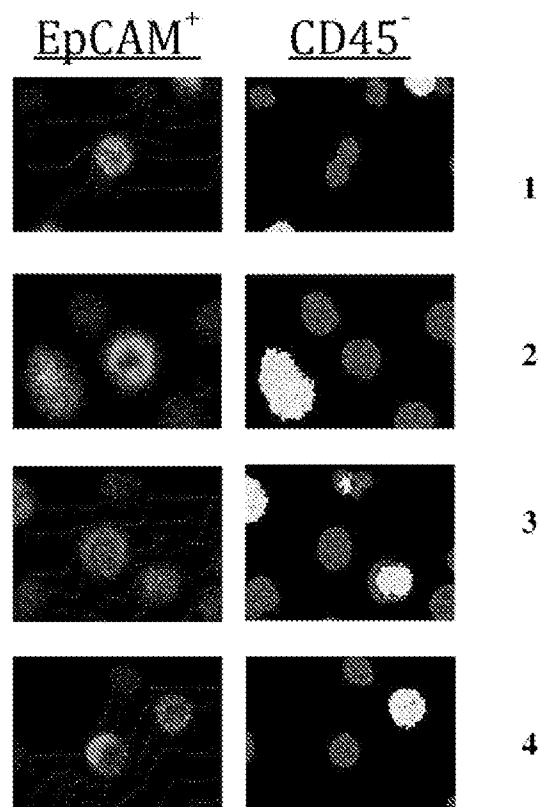


FIG. 6A

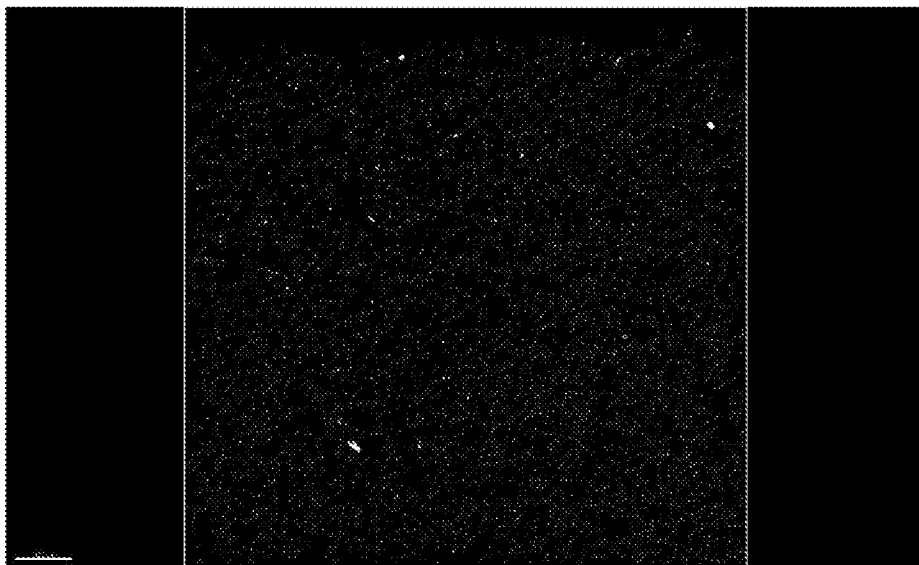


FIG. 6B

