

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 136**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/24** (2006.01)

**G01N 1/31** (2006.01)

**G01N 35/10** (2006.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2015 PCT/US2015/038994**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2016 WO16004311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2015 E 15814761 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3172336**

54 Título: **Control de retroalimentación para la detección mejorada de células raras**

30 Prioridad:

**02.07.2014 US 201462019964 P**

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

**09.04.2021**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.  
(100.0%)**

**511 Benedict Avenue  
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**PUGIA, MICHAEL;  
PHILIP, JULIA y  
MARFURT, KAREN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 818 136 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

Control de retroalimentación para la detección mejorada de células raras

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a ensayos celulares, y más particularmente a sistemas y métodos para la detección mejorada de células raras por ICC y/o ISH.

**Antecedentes de la invención**

10 El análisis de células raras es importante en aplicaciones médicas, tales como para diagnóstico de muchas enfermedades incluyendo cánceres. Estas aplicaciones requieren normalmente el aislamiento de ciertas células de interés que representan solo una pequeña fracción de la muestra analizada. Por ejemplo, células raras tales como células tumorales circulantes ("CTC") son de interés particular en el diagnóstico de cánceres metastásicos. En métodos convencionales, se aíslan CTC de sangre completa eliminando en primer lugar glóbulos rojos ("RBC") mediante lisis. En una muestra de sangre de 10 ml, por ejemplo, unos pocos cientos de CTC pueden separarse de aproximadamente 800.000.000 glóbulos blancos ("WBC"). Esto requiere métodos con alta eficiencia de separación y tasas de recuperación celular.

15 Para células raras que van a analizarse mediante métodos convencionales de microscopía de barrido o métodos moleculares tales como secuenciación de última generación, las células normales (por ejemplo, WBC) deben reducirse hasta una razón de 200 a 1 células normales con respecto a raras (normalmente células cancerosas) y el volumen de muestra debe reducirse desde 10 ml hasta unos pocos cientos de microlitros o menos.

20 Se han desarrollado varios enfoques hasta la fecha para capturar, aislar y enriquecer células raras. Un enfoque es agotar los WBC de una muestra de sangre completa (por ejemplo, agotamiento negativo). Otro enfoque es enriquecer las CTC en una muestra de sangre completa (por ejemplo, enriquecimiento positivo). Ambos de los enfoques anteriores se basan en una variedad de técnicas, tales como partículas magnéticas, filtración, citometría de flujo y canales y cámaras microfluídicos para realizar el análisis de células raras. El documento US 2014/106388 A1 se refiere a un método y a una matriz para detectar células vivas circulantes o diseminadas en líquidos corporales (por ejemplo, sangre, orina) o muestras de tejido (por ejemplo, médula ósea) mezcladas con líquido. El método incluye: a) filtrar la muestra líquida a través de una membrana porosa que es adecuada para retener las células que van a detectarse, de manera que las células que van a detectarse reposen sobre al menos una parte de la superficie de la membrana y el líquido de la muestra pase por la membrana; b) aplicar un primer líquido de proceso que contiene un primer agente para marcar las células que van a detectarse con un primer marcador; c) incubar el líquido de proceso sobre la membrana durante un período de tiempo predeterminado, en el que las células que van a detectarse están marcadas; y d) detectar las células marcadas que van a detectarse sobre la superficie de la membrana. Además, el documento US 2014/110349 A1 da a conocer un conjunto y un método de filtración, que son adecuados en particular para la filtración de células (tales como células tumorales) de una muestra. En el método, se determina un diferencial de presión entre la presión aguas arriba y la presión aguas abajo de un filtro; y el diferencial de presión entre aguas arriba y aguas abajo del filtro se ajusta de manera que el diferencial de presión no exceda un valor predeterminado.

35 Recientemente, Gumbrecht de Siemens desarrolló un enfoque novedoso para la automatización de la filtración. El enfoque se dirige a un formato de portaobjetos microfluídico tal como se muestra en el documento US 20120315664, que puede combinarse con un mantenimiento de presión diferencial tal como se muestra en el documento WO 2012159821. El sistema y método permiten la automatización de la filtración por membrana con una alta recuperación de células raras, tal como una reducción > 99% de WBC y con la eliminación completa de glóbulos rojos (RBC). Además, para una muestra de sangre completa que contiene 1000 células cancerosas, la razón de WBC con respecto a células cancerosas puede disminuirse desde 50.000-100.000: 1 hasta < 200: 1. Las células raras pueden medirse entonces usando un método de inmunocitoquímica (ICC) y/o hibridación *in situ* (ISH).

45 Los métodos de inmunocitoquímica (ICC) usan anticuerpos como pareja de afinidad para una célula rara correspondiente. Los métodos de hibridación *in situ* (ISH), por otro lado, usan una sonda de ácido nucleico como pareja de afinidad. ICC e ISH pueden realizarse individualmente o se pueden combinar entre sí de manera que las células raras se seleccionen como diana tanto por un anticuerpo como un ácido nucleico para lograr una detección potenciada. Por ejemplo, un método ISH se realiza a menudo en un ensayo de combinación con un método de ICC posterior o anterior con o sin una morfología citológica posterior mediante tinción con colorante cromogénico (hematoxilina y eosina (H&E)). Véase Farace F., *et al.*, Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer, J. Clin. Oncol 20 de junio de 2013; 31 (18): 2273-81. En un ensayo combinado, puede realizarse la reacción de ICC y leerse el portaobjetos sobre un microscopio. A continuación, el portaobjetos puede lavarse para eliminar los anticuerpos y se completa la reacción de ISH. La reacción de ISH puede leerse sobre el microscopio y las imágenes se superponen. Cuando se realiza, la tinción de H&E final elimina la reacción de ISH y también se lee sobre el microscopio, y las imágenes pueden superponerse.

55 La automatización de ICC y/o ISH requiere etapas de método específicas para disminuir el fondo y aumentar las señales observadas. Existen causas conocidas de ruido de fondo o señales bajas (Cytometry 2001, vol. 43 (2), p. 101-109) que pueden conducir a resultados falsos positivos. Por ejemplo, el ruido de fondo puede surgir debido a unión no específica

de la sonda a las secuencias de ácido nucleico (lo que no se desea) o puede surgir debido a la unión no específica de la sonda a material distinto de ácido nucleico. Las causas de una señalización inferior incluyen la no exposición del ácido nucleico diana, la no unión de la sonda a la diana y la reversión de la unión de manera que la sonda se elimina por lavado. Además, la unión de fondo puede aumentar con la temperatura de la reacción de ICC y/o ISH, ya sea debido a evaporación que provoca aumentos de concentración en anticuerpos y sondas o al impulsar eventos de unión no específica. Se emplean comúnmente métodos de lavado y bloqueo, pero son incapaces de eliminar suficientemente el fondo.

Además, la combinación de ICC e ISH tiene problemas asociados con la misma. Por ejemplo, la combinación duplica los problemas de fondo, requiere etapas de calentamiento adicionales y añade consideraciones adicionales. Por ejemplo, si se ejecuta ISH antes de ICC, la digestión enzimática, la fijación posterior, la desnaturalización, las temperaturas y la hibridación normalmente asociadas con ISH pueden destruir los determinantes antigénicos y/o interferir con la unión de anticuerpos posterior, provocando de ese modo falsos negativos o proporcionando una detección reducida de células raras. Por otro lado, si se ejecuta ICC en primer lugar, la digestión enzimática, el lavado riguroso y la hibridación en formamida pueden romper la unión del anticuerpo y lavar el anticuerpo de la célula, dando como resultado de ese modo falsos negativos o detección reducida de células raras. Esto requiere un mayor control de las etapas de lavado y temperatura.

### Breves descripciones de los dibujos

- Las figuras 1A-1B ilustra un sistema automatizado para la detección mejorada de células raras por ICC y/o ISH según un aspecto de la presente invención;
- la figura 2 ilustra un método de control de retroalimentación según un aspecto de la presente invención;
- la figura 3 ilustra otro método de control de retroalimentación según otro aspecto de la presente invención;
- la figura 4 es un esquema que ilustra un ensayo de ICC/ISH de combinación no según un aspecto de la presente invención;
- la figura 5 ilustra un elemento de control de la temperatura a modo de ejemplo de elemento de temperatura de calentamiento según un aspecto de la presente invención;
- la figura 6 ilustra una posición de sensor en el sistema según un aspecto de la presente invención;
- la figura 7 ilustra un procedimiento para calcular un tiempo teórico para que se produzca el drenaje de líquido según un aspecto de la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

Aspectos de la presente invención mejoran la detección de células raras por ICC y/o ISH disminuyendo el ruido de fondo y proporcionando una detección potenciada de células raras. En un aspecto, el ruido de fondo para los ensayos de detección por ICC y/o ISH se reduce y las señales de células raras se potencian por medio de un método y sistema de control de retroalimentación novedoso, que puede añadir fluido adicional según sea necesario basándose en una indicación de pérdida de fluido. El control de retroalimentación garantiza por tanto una concentración apropiada de los componentes y un volumen de flujo óptimo a lo largo de la duración del ensayo, lo que tanto reduce el ruido de fondo como potencia la detección de señales. Además, en ciertos aspectos, se proporciona un elemento de control de la temperatura que puede situarse sobre una membrana de un aparato de filtración para optimizar la temperatura sobre la membrana. En determinadas realizaciones, el elemento de control de la temperatura puede moverse desde una primera posición sobre la membrana hasta una segunda posición lejos de la membrana para permitir la adición de fluido adicional (basándose en la pérdida de fluido determinada) para un ensayo de detección por ICC y/o ISH en la segunda posición.

Según un aspecto, se proporciona un sistema automatizado para la filtración de una muestra y para la detección de células raras en la muestra según la reivindicación 1.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método automatizado para la filtración de una muestra y para la detección de células raras en la muestra según la reivindicación 10.

#### 1.1 Definiciones

Antes de explicar las realizaciones del/de los concepto(s) de la invención en detalle por medio de dibujos a modo de ejemplo, experimentación, resultados y procedimientos de laboratorio, ha de entenderse que el/los concepto(s) de la invención no se limita(n) en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, experimentación y/o resultados. El/los concepto(s) de la invención es/son capaz/capaces de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas formas. Como tal, se pretende dar a las expresiones usadas en el presente documento el alcance y significado más amplios posibles; y las realizaciones pretenden ser a modo de ejemplo, no exhaustivas. Además, ha de entenderse que la fraseología y

terminología empleadas en el presente documento son para el fin de descripción y no deben considerarse como limitativas.

5 A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con el/los concepto(s) de la invención dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica.

10 Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y las técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica de síntesis y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ensayos celulares, síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes. Todas las patentes, solicitudes de patentes publicadas y publicaciones no patentadas mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de conocimiento de los expertos en la técnica al que pertenece(n) este/os concepto(s) de la invención actualmente dado(s) a conocer y reivindicado(s).

20 Todos los sistemas, dispositivos y/o métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones, los sistemas y los métodos de este/os concepto(s) de la invención dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento pueden describirse en cuanto a aspectos o realizaciones, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones, sistemas y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance del/de los concepto(s) de la invención dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento. Todos de tales sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se considera que están dentro del espíritu, el alcance y el concepto del/de los concepto(s) de la invención tal como se define(n) mediante las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se utiliza según la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

30 Tal como se usa en el presente documento, el uso de los términos "un" o "una" junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Tal como se usa en el presente documento, el término "o" significa "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o que las alternativas sean mutuamente excluyentes.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Tal como se usan en el presente documento, las frases "cantidad eficaz", "cantidad efectiva" o similares se refieren a cantidades a concentraciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado.

40 Tal como se usa en el presente documento, se entenderá que el término "al menos uno" incluye uno, así como cualquier cantidad mayor de uno, incluyendo pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1000 o más, dependiendo del término al que se adjunta; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitantes, ya que límites superiores también pueden producir resultados satisfactorios.

45 Tal como se usan en el presente documento, los términos "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de método no mencionados, adicionales.

50 Tal como se usa en el presente documento, la frase "o combinaciones de los mismos" se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la técnica comprenderá que, normalmente, no hay un límite en el número de artículos o términos en cualquier combinación, a menos que resulte evidente de otra forma a partir del contexto.

55 Tal como se usa en el presente documento, los términos "pareja de afinidad", "reactivo de afinidad", "pareja de unión" o "sonda" se refieren a cualquier tipo de molécula que se une a un biomarcador específico tal como se describe en el

presente documento. Los ejemplos de sondas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (o fragmentos de unión o derivados de los mismos), receptores, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, ligandos, ácidos nucleicos (incluyendo, pero sin limitarse a, ADN, ARN, microARN, ARNm, ARNip, etc.), péptidos, polipéptidos, proteínas, epítomos, antígenos, ligandos, receptores, complejos, lípidos, glicoproteínas, glicolípidos, glucosaminoglucanos, hidratos de carbono, poli(hidratos de carbono), glicoconjugados y cualquier combinación o derivado de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada. Por tanto, los términos “anticuerpo” o “péptido(s) de anticuerpo” se refieren a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, un anticuerpo intacto), o un fragmento de unión del mismo que compete con el anticuerpo intacto por la unión al antígeno específico. Los fragmentos de unión pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fv unidos por disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un solo dominio (tales como, pero sin limitarse a, NANOBODIES®) y otros fragmentos de anticuerpos que retienen al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Véase, por ejemplo, Hudson *et al.*, Nature Med., 9: 129-134 (2003).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “fragmento de unión a antígeno” o “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, tal como se usan en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno. La función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFv, Fv unidos por disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un solo dominio (tales como, pero sin limitarse a, NANOBODIES®), CD H3 aislado y otros fragmentos de anticuerpos que retienen al menos una parte de la región variable de un anticuerpo intacto. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas recombinantes y/o enzimáticas convencionales y se examinan para detectar la unión al antígeno de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “biomarcador” tal como se usa en el presente documento se entenderá que se refiere a cualquier sitio diana en la superficie o dentro de una célula, por ejemplo, una célula rara, para el que una pareja de afinidad puede tener afinidad y, por tanto, puede unirse a dicho resto. El “biomarcador” puede ser, por ejemplo, pero no a modo de limitación, un ácido nucleico, péptido, polipéptido, proteína, epítomo, antígeno, ligando, receptor, complejo (es decir, un complejo de MHC-péptido), lípido, glucoproteína, glucolípido, glucosaminoglucano, hidrato de carbono, poli(hidrato de carbono), glicoconjugado, y cualquier combinación o derivado de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “partícula de captura” tal como se usa en el presente documento se entenderá que se refiere a la partícula que puede retenerse en la superficie del portaobjetos y es capaz de capturar el “biomarcador”, por ejemplo en tal caso, se añade una entidad de partícula de captura que comprende una “pareja de afinidad”, “reactivo de afinidad”, “pareja de unión” o “sonda” para las proteínas o ácidos nucleicos, que se une a los “biomarcadores” en la población sobre otra población de “biomarcadores” para fines de llevar a cabo una potenciación de una concentración de “biomarcadores” según los principios descritos en el presente documento. La composición de la partícula de la entidad de partícula de captura puede ser orgánica o inorgánica, magnética o no magnética con recubrimiento de sílice aplicado. Los polímeros orgánicos incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de hidroxietilo), poli(estireno/divinilbenceno), poli(estireno/acrilato), poli(tereftalato de etileno), resina de melamina, nailon, poli(butirato de vinilo), por ejemplo, ya se usen por sí mismos o conjuntamente con otros materiales incluyendo látex, formas de micropartículas y nanopartículas de los mismos. Las partículas también pueden comprender carbono (por ejemplo, nanotubos de carbono), metal (por ejemplo, oro, plata y hierro, incluidos óxidos metálicos de los mismos) o coloides.

Tal como se usa en el presente documento, el término “marcador” o “agente de obtención de imágenes” se refiere a un grupo funcional o molécula que produce o puede inducir la producción de una señal detectable. Esta señal puede medirse mediante analizadores microscópicos, analizadores de espectroscopía de masas, analizadores espectroscópicos, analizadores fluorescentes o analizadores de quimioluminiscencia.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos. El término “polipéptido” es un término genérico que se refiere a una proteína nativa, fragmentos de proteínas o análogos de una secuencia polipeptídica. Por tanto, proteína nativa, fragmentos de proteínas y análogos son especies del género polipéptido.

## 1.2 Sistema de detección de moléculas raras y filtración automatizado

Refiriéndose ahora a las figuras, la figura 1 ilustra un sistema automatizado 10 configurado para tanto la filtración de una muestra como para la detección de células raras. Para lograr la filtración, el sistema 10 comprende un aparato de filtración 11. El aparato de filtración 11 comprende al menos una membrana 12 a través de la cual se hace pasar la muestra para proporcionar un material retenido 14 que se sospecha que tiene una cantidad de células raras 15 al

tiempo que se permite que un permeado 16 que comprende una cantidad de células que no son raras discurra a su través. Además, el sistema 10 incluye un aparato de suministro de fluido 18 que introduce uno o más fluidos sobre la membrana para la filtración y/o útiles en la detección de las células raras 15. Además, el sistema 10 incluye al menos un sensor (un sensor de presión), por ejemplo, los sensores 20, 22, dispuesto sobre o alrededor de la membrana 12 para determinar directa o indirectamente una cantidad de pérdida de fluido sobre la membrana 12. Se proporciona un controlador 24, por ejemplo, un circuito de control electrónico, que está configurado para corregir la pérdida de fluido sobre la membrana 12 tal como se describe en el presente documento. Puede proporcionarse un detector, tal como un detector de fluorescencia (no mostrado), en el sistema 10 para la detección de células raras. Sin embargo, la invención no está limitada ya que el material retenido puede retirarse del sistema y transportarse o transferirse de otra forma a un sistema de detección independiente.

El aparato de filtración 11 puede ser cualquier instrumento adecuado para separar una cantidad de molécula rara de una molécula que no es rara, tal como la separación de células raras expuesta en el documento US 20120315664, por ejemplo. Las moléculas raras que no están unidas a la célula pueden capturarse sobre una "partícula de captura". Como tal, se entiende que la membrana 12 también puede estar soportada por un elemento de soporte y/o un portador. Como tal, se entiende que la membrana 12 tiene poros de un diámetro tal que retienen las células raras o las "partículas de captura" que tienen normalmente un diámetro más grande que los poros. El aparato de filtración 11 puede ser uno que es adecuado para la filtración de, por ejemplo, células tumorales de una muestra de sangre. Con un diámetro de orificio dimensionado apropiadamente, por ejemplo, 8  $\mu\text{m}$ , células que no son raras o moléculas que no son raras, tales como glóbulos blancos y rojos, pueden pasar a través de la membrana 12 mientras que las células raras (por ejemplo, células cancerosas), que son demasiado grandes y rígidas se retienen sobre la membrana 12. Un flujo uniforme de fluido sobre la superficie de la membrana 12 facilita la retención de las células raras 15 en una forma que, tras filtrar, las deja distribuidas de manera sustancialmente uniforme sobre la membrana 12.

La membrana 12 puede comprender una matriz porosa sólida o semisólida, y puede estar compuesta por material insoluble en agua orgánico o inorgánico. La matriz porosa puede tener cualquiera de varias formas tales como, por ejemplo, superficie tubular (por ejemplo, fibra hueca, espiral enrollada y fibra fina hueca), grabada con pistas, o plana o lisa (por ejemplo, tira, disco, película, membrana y placa). También se aprecia que la matriz puede fabricarse de una amplia variedad de materiales, que pueden producirse de manera natural o ser sintéticos, poliméricos o no poliméricos, fibrosos o no fibrosos. La matriz porosa puede producirse mediante, a modo de ilustración y no limitación, tecnología microelectromecánica (MEMS), mecanizado por láser, tecnología de semiconductores de óxido de metal (CMOS) o procedimientos de microfabricación para producir microtamices. Los ejemplos, a modo de ilustración y no limitación, de tales materiales para fabricar una matriz porosa incluyen celulosa (incluyendo papel), nitrocelulosa, acetato de celulosa, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli-(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon y poli(butirato de vinilo), material cerámico, material metálico, por ejemplo, o bien usados por sí mismos o bien conjuntamente entre sí y/o con otros materiales.

El tamaño de los poros de la membrana 12 puede ser aquel que sea suficiente para retener preferentemente células raras, por ejemplo, células raras aglutinadas, al tiempo que permite el paso de otras células incluyendo células que no son raras a través de los poros. En determinadas realizaciones, el tamaño de poro de los poros depende de la naturaleza y el tamaño de las células raras y las células que no son raras, la naturaleza y el tamaño de las células raras aglutinadas, la presión aplicada a la muestra de sangre, por ejemplo. Por ejemplo, sin limitación, el tamaño de poro promedio puede ser de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 75  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 75  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , o de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo. La densidad de poros en la matriz porosa puede ser de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 80%, o de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 70%, por ejemplo.

Tal como se explicará en detalle adicional a continuación, se aplica presión al fluido sobre la membrana 12 para facilitar el paso de fluido y células que no son raras a través de la membrana 12. Tal como se usa en el presente documento, el término "presión" se refiere a un diferencial de presión desde la presión atmosférica normal, que puede ser o bien presión positiva (aumento en la presión en relación con la presión atmosférica normal) o presión negativa (vacío) (disminución en la presión en relación con la presión atmosférica normal). El nivel de presión aplicado a la membrana 12 del aparato de filtración 11 puede ser dependiente de uno o más de la naturaleza y el tamaño de las células que no son raras, la naturaleza y el tamaño de las células raras aglutinadas, la naturaleza de la matriz porosa y el tamaño de los poros de la matriz porosa, por ejemplo.

En funcionamiento, el permeado 16 se prensa a través de la membrana 12 y el material retenido 14 se retiene sobre la membrana 12 (o también en los poros y las cavidades de la membrana 12). Para el proceso de filtración, hay por tanto una dirección prevalente de flujo del permeado 16 a través de la membrana 12. De este modo, puede haber un área aguas arriba de la membrana 12 donde se retiene el material retenido 14, y un área aguas abajo de la membrana 12 donde se prensa el permeado 16 y, por ejemplo, donde puede recogerse. Independientemente de la dirección

prevalente de flujo, la dirección de flujo también puede revertirse, por ejemplo, cuando se somete a retrolavado la membrana 12. El término “prensado a través” también define la dirección prevalente del diferencial de presión: el diferencial de presión positiva entre aguas arriba y aguas abajo de la membrana 12. Si el diferencial de presión era negativo, se entiende que se proporcionaría una fuerza de succión sobre la membrana 12.

5 Con el fin de pensar el permeado 16 a través de la membrana 12, el diferencial de presión puede caracterizarse por una presión superior aguas arriba de la membrana 12 que aguas abajo de la misma. La presión superior aguas arriba puede lograrse mediante la aplicación de sobrepresión aguas arriba de la membrana 12, aplicación de subpresión aguas abajo de la membrana 12, o una combinación de las dos mediante cualquier estructura adecuada conocida en la técnica. Con el fin de detener (reducir a cero) el flujo de permeado a través de la membrana 12, puede proporcionarse un diferencial de presión de cero independientemente de la orientación de la membrana 12.

10 A modo de ejemplo solo, el nivel de presión positiva aplicada a la membrana 12 puede ser de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 500 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 400 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 300 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 200 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 100 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 50 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 30 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 25 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 20 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 15 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 30 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 25 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 20 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 15 milibares, o de aproximadamente 5 milibares a aproximadamente 10 milibares, por ejemplo. Si se aplica una presión negativa a la membrana, se aprecia que el nivel de presión negativa (vacío) aplicada a la membrana 16 puede ser el negativo de los intervalos anteriores.

15 En determinadas realizaciones, la presión aplicada a la membrana 12 es una presión oscilante, lo que significa que la presión se aplica de manera intermitente a intervalos regulares o irregulares. Los intervalos pueden ser de desde aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 250 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 100 segundos, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 50 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 250 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 100 segundos, o de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 50 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 600 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 500 segundos, o de aproximadamente 100 segundos a aproximadamente 250 segundos, por ejemplo. En este enfoque, la presión oscila a de aproximadamente 0 milibares a aproximadamente 10 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 10 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 7,5 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 5,0 milibares, o de aproximadamente 1 milibar a aproximadamente 2,5 milibares, por ejemplo, durante parte o toda la aplicación de presión a la membrana 12. La presión oscilante se logra usando un interruptor de encendido-apagado, por ejemplo, y puede realizarse automática o manualmente. Son admisibles altas caídas de presión dependiendo de uno o más del volumen del depósito, volumen de muestra y velocidad de filtración.

25 En la realización mostrada, se muestra que el material retenido 14 tiene una cantidad de células raras 15. El permeado 16 que pasa a través de la membrana 12 puede recogerse en un recipiente de desechos adecuado (no mostrado) y desecharse y/o reciclarse según se desee.

30 El aparato de suministro de fluido 18 puede estar en comunicación de fluido con el sistema de filtración 11. Además, el aparato de suministro de fluido 18 puede estar dispuesto para introducir uno o más fluidos sobre la membrana 12 para la detección de las células raras 15 y puede comprender un sistema de pipeta robótica automático tal como se conoce bien en la técnica, por ejemplo, tal como el disponible comercialmente de Hamilton Robotics, Eppendorf International, Thermo Scientific, y similares. El aparato de suministro de fluido 18 suministra todos los fluidos o una porción de los fluidos necesarios para el ensayo que está realizándose.

35 Se aprecia que el uno o más fluidos pueden comprender cualquier componente (por ejemplo, fluidos) para llevar a cabo un proceso de filtración para la separación de una cantidad de células raras de células que no son raras. En una realización, el uno o más fluidos pueden comprender además un componente útil para llevar a cabo un ensayo de detección por ISH para la detección de células raras. Además, el uno o más fluidos pueden comprender un componente necesario para llevar a cabo un ensayo de detección por ICC, o una combinación ensayos de detección por ICC/ISH para la detección de células raras. A modo de ejemplo, el uno o más fluidos pueden comprender un elemento seleccionado del grupo que consiste en una sonda, un marcador, un reactivo, un agente de amplificación, un tampón, una disolución de lavado, y combinaciones de los mismos.

40 En un ensayo de ICC y/o ISH típico, se mezclan las muestras con tampón y se separan a través de filtración sobre la membrana 12, por ejemplo, un portaobjetos de microscopio poroso, para aislar predominantemente células raras (con algunas células que no son raras y sin glóbulos rojos). Tras el aislamiento, las células se fijan y se lavan. El proceso puede detenerse para almacenar en un biobanco los portaobjetos con células raras o continuarse con procedimientos

automatizados para la detección molecular de proteínas por ICC; de ácido nucleico por ISH; y de morfología citológica por tinción con colorante cromogénico (H&E). Si va a realizarse un ensayo de ICC y/o ISH, se proporcionan en esta coyuntura sondas (marcadores) y componentes de amplificación de señales adecuados. Alternativamente, pueden usarse los portaobjetos para extraer material celular para otros métodos de detección que no están automatizados en este procedimiento, tal como análisis de PCR para ADN.

En particular, los métodos de ICC usan anticuerpos como pareja de afinidad. En una realización, el aparato de suministro de fluido 18 suministra un anticuerpo específico para un biomarcador sobre una célula rara. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv, y F(ab')<sub>2</sub>, y Fab', por ejemplo. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado siempre que se mantenga la afinidad de unión por una molécula particular.

Los métodos de hibridación *in situ* (ISH) utilizan un ácido nucleico como pareja de afinidad para la célula rara. En una realización, el aparato de suministro de fluido 18 en su lugar o también suministra un ácido nucleico específico para un biomarcador para una célula rara sobre la membrana 12. El ácido nucleico puede ser cualquier forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir de análisis de unión, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones en la estructura de nucleótidos pueden conferirse antes o después del ensamblaje del polímero.

La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Los términos "ácido nucleico aislado" y "polinucleótido aislado" se usan indistintamente; un ácido nucleico o polinucleótido se considera "aislado" si: (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

Sin limitación, los biomarcadores de tipo de células raras incluyen biomarcadores de tipo de células cancerosas, oncoproteínas y oncogenes, biomarcadores de quimiorresistencia, biomarcadores de potencial metastásico, marcadores de tipificación de células endoteliales y otros. Véase Pugia documento WO2013044099 para ejemplos adicionales de los mismos. Los biomarcadores de tipo de células cancerosas incluyen pero no se limitan a citoqueratinas (CK) CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7, CK8 y CK9, CK10, CK12, CK 13, CK14, CK16, CK17, CK18, CK19 y CK2, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), N-cadherina, E-cadherina y vimentina. Las oncoproteínas y oncogenes con probablemente relevancia terapéutica debido a mutaciones incluyen pero no se limitan a WAF, BAX-1, PDGF, JAGGED 1, NOTCH, VEGF, VEGHR, CAIX, MIB1, MDM, PR, ER, SEL5, SEM1, PI3K, AKT2, TWIST1, EML-4, DRAFF, C-MET, ABL1, EGFR, GNAS, PDL1, MLH1, RET, MEK1, AKT1, ERBB2, HER2, HNF1A, MPL, SMAD4, ALK, ERBB4, HRAS, NOTCH1, SMARCB1, APC, FBXW7, IDH1, NPM1, SMO, ATM, FGFR1, JAK2, NRAS, SRC, BRAF, FGFR2, JAK3, RA, STK11, CDH1, FGFR3, KDR, PIK3CA, TP53, CDKN2A, FLT3, KIT, PTEN, VHL, CSF1R, GNA11, KRAS, PTPN11, DDR2, CTNNB1, GNAQ, MET, RB1, AKT1, BRAF, DDR2, MEK1, NRAS, FGFR1 y ROS1. Los marcadores de tipificación de células endoteliales incluyen, a modo de ilustración y no limitación, CD136, CD105/endogлина, CD144/VE-cadherina, N-cadherina, E-cadherina CD145, CD34, Cd41 CD136, CD34, CD90, CD31/PECAM-1, ESAM, VEGFR2/Fik-1, Tie-2, CD202b/TEK, CD56/NCAM, CD73/VAP-2, claudina 5, ZO-1 y vimentina, por ejemplo con mutación adicional que se espera que esté disponible en el futuro cercano.

En determinadas realizaciones, las células raras 15 pueden ser células endoteliales que se detectan usando marcadores, a modo de ilustración y no limitación, CD136, CD105/endogлина, CD144/VE-cadherina, CD145, CD34, Cd41 CD136, CD34, CD90, CD31/PECAM-1, ESAM, VEGFR2/Fik-1, Tie-2, CD202b/TEK, CD56/NCAM, CD73/VAP-2, claudina 5, ZO-1 y vimentina.

Además, los marcadores pueden ser biomarcadores que detectan células inmunitarias raras. Por ejemplo, se indican monocitos mediante CD45+, CD14+; se indican linfocitos T mediante CD45+, CD3+; se indican células T auxiliares mediante CD45+,CD3+, CD4+; se indican células T citotóxicas mediante CD45+, CD3+, CDS+; se indican linfocitos β mediante CD45+, CD19+ o CD45+, CD20+; se indican trombocitos mediante CD45+, CD61+; y se indican células citolíticas naturales mediante CD16+, CD56+ y CD3-. Además, dos moléculas de CD comúnmente usadas, concretamente, CD4 y CD8, se usan, en general, como marcadores para células T citotóxicas auxiliares y citotóxicas, respectivamente. Estas moléculas se definen en combinación con CD3+, ya que algunos otros leucocitos también expresan estas moléculas de CD (algunos macrófagos expresan bajos niveles de CD4; las células dendríticas expresan altos niveles de CDS).

Pueden realizarse ICC e ISH como "ensayos de afinidad directos" que conjugan un marcador, tal como una sonda fluorescente, con una pareja de afinidad. Los métodos de ICC e ISH también pueden realizarse como un "ensayo

indirecto". Un "ensayo indirecto" puede comprender un agente de afinidad secundario conjugado con un marcador donde el agente de afinidad secundario se une a la pareja de afinidad primaria tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, cuando se usa un método de TSA, puede unirse directamente HRP a la pareja de afinidad. Alternativamente, puede unirse HRP a un anticuerpo secundario o sonda que puede unirse a la pareja de afinidad como un "método indirecto". La HRP puede unirse también a una pareja de afinidad a través de una interacción de unión de estreptavidina a biotina donde o bien la estreptavidina o bien la biotina está directamente unida al agente de afinidad (por ejemplo, "conjugada").

En determinadas realizaciones, el marcador está directa o indirectamente unido a la pareja de afinidad. En cualquier caso, el aparato de suministro de fluido 18 está configurado para suministrar una cantidad eficaz de componentes para la detección de células raras 15. Las sondas usadas en el presente documento pueden ser cualquier molécula que produzca o pueda inducirse que produzca una señal, y pueden ser, por ejemplo, un agente que fluoresce, un radiomarcador, una enzima, un agente quimioluminiscente o un fotosensibilizador. La señal puede detectarse y/o medirse detectando la actividad enzimática, luminiscencia, absorbancia de luz o radioactividad, dependiendo de la naturaleza del marcador. El marcador puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, agentes que fluorescen, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva hasta un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa entonces por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y colorantes, por ejemplo. En algunos ejemplos, el marcador es parte de un sistema de producción de señales, que puede incluir componentes distintos del marcador para generar una señal conjuntamente con el marcador.

Según un aspecto, el marcador es un marcador fluorescente. Diversos tipos de marcadores fluorescentes, dependiendo de la aplicación y el fin, pueden emplearse según aspectos de la presente invención. Un marcador fluorescente diferente puede asociarse con múltiples agentes de afinidad diferentes de manera que múltiples anticuerpos marcados fluorescentemente, por ejemplo, pueden emplearse en un ensayo cualquiera realizado sobre una preparación de células raras aisladas.

En determinadas realizaciones, puede requerirse que el marcador genere señales no fluorescentes que pueden medirse por otros medios tales como otro aspecto, o el marcador es un marcador de espectroscopía de masas, mediante analizadores microscópicos, analizadores de espectroscopía de masas, analizadores espectroscópicos, analizadores fluorescentes o analizadores de quimioluminiscencia.

Ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados están disponibles comercialmente y se venden con las marcas comerciales BD Horizon™ V450 Pacific Blue™ AmCian BD Horizon™ V500 (em-máx. 500 nm), Alexa Fluor®, FITC, R-phycoerythrin (R-PE), Texas Red®, APC, Cy™ PerCP y Dylight™. Se describen ejemplos de fluoróforos adecuados a continuación en el presente documento. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, existe online un catálogo exhaustivo en <http://www.fluorophores.org>.

En la bibliografía de la técnica está disponible orientación de muestra adicional con respecto a la selección de fluoróforos, métodos de unión de fluoróforos a diversos tipos de moléculas y métodos de uso de los mismos [por ejemplo, se hace referencia a: Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5ª ed., Molecular Probes, Inc. (1994); patente estadounidense n.º 6.037.137 concedida a Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press Nueva York, N.Y. (1995); Kay M. *et al.*, 1995. *Biochemistry* 34:293; Stubbs *et al.*, 1996. *Biochemistry* 35:937; Gakamsky D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer," en "Receptors: A Practical Approach," 2ª ed., Stanford C. y Horton R. (eds.), Oxford University Press, RU. (2001); patente estadounidense n.º 6.350.466 concedida a Targesome, Inc. En realizaciones particulares, se proporcionan hasta 5 sondas marcadas y se miden a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión en un único ensayo.

En determinadas realizaciones, el marcador puede requerir componentes para producir una señal, y el sistema de producción de señales incluiría entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible tal como apreciaría el experto en la técnica. Tales otros componentes pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y una sustancia de unión específica requerida para la unión de las sustancias de generación de señales. Puede encontrarse una discusión detallada adicional de sistemas de producción de señales adecuados en la patente estadounidense n.º 5.185.243.

El marcador y otros elementos del sistema de producción de señales (si están presentes) pueden unirse a la pareja de afinidad, moléculas de tiramida, un soporte y/o pueden unirse a una célula. La unión puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y puede lograrse mediante técnicas bien conocidas, comúnmente disponibles en la bibliografía. Las células pueden unirse a un soporte sólido de cualquier manera conocida en la técnica, solo con la condición de que la unión no interfiera sustancialmente con la capacidad de un biomarcador sobre la célula para unirse con un agente de afinidad. En algunas realizaciones, las células pueden estar recubiertas o covalentemente unidas directamente al soporte sólido tal como la membrana 12. Pueden usarse también grupos de unión para acoplar covalentemente el soporte sólido y las células. También son posibles otros métodos de unión de las células. Por ejemplo, un soporte sólido puede tener un recubrimiento de un agente de unión para una molécula pequeña tal como,

por ejemplo, avidina o un anticuerpo, y una molécula pequeña tal como, por ejemplo, biotina, hapteno, etc., puede unirse a las células o viceversa.

Después de que una célula rara se seleccione como diana directa o indirectamente por una sonda, la sonda utilizada para ICC y/o ISH puede detectarse mediante un sistema de detección adecuado, tal como un microscopio de fluorescencia con filtros de excitación, emisión y corte específicos para cada sonda, o cualquier otro dispositivo de detección adecuado conocido en la técnica. Múltiples sondas fluorescentes, cada una con un agente de afinidad específico diferente, pueden usarse en un cóctel para detectar múltiples biomoléculas de una célula diana. Las células pueden caracterizarse entonces mediante la respuesta positiva (fluorescente) o negativa (no fluorescente) usando un microscopio fluorescente de barrido. Los métodos permiten usar tinciones de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) o de ADN fluorescente Hoechst A para teñir los núcleos de las células y la aplicación de medio de cubierta para ayudar a conservar la intensidad fluorescente de las sondas.

Un procedimiento de contratinción con colorante cromogénico automatizado se basa en los métodos de hematoxilina y eosina (H&E) ampliamente usados por patólogos que producen espectros visibles que se observan bajo un microscopio con una cámara a color. La hematoxilina y eosina (H&E) son colorantes cromogénicos. La hematoxilina tiñe los núcleos de las células de azul. La eosina Y tiñe las estructuras eosinófilas de las células en diversos tonos de rojo, rosa y naranja. El uso de colorantes cromogénicos para la contratinción o el inmunoensayo indirecto no es compatible con métodos de fluorescencia. La fluorescencia del inmunoensayo debe leerse antes que la contratinción con colorantes cromogénicos. Por tanto, la tinción con colorantes cromogénicos puede realizarse como una etapa secuencial después de que se lea la señal fluorescente.

En la bibliografía se describen completamente reactivos y procedimientos de ICC, ISH y H&E a modo de ejemplo y los componentes usados para los mismos. Por ejemplo, véase *Cytometry* 2001, 43(2), págs. 101-109; *Cytometry* 231-7 (1996); *J Histochem Cytochem* 2000, 48, 1369; M. Evans, *BMC Clin Pathology* 2002, 3, págs. 3-17; J.F. Swennenhuis *et al.*, *Cytometry Part A*, 75A, págs. 5020-527, 2009; solicitud provisional estadounidense n.º 61/806.581, titulada "Rare Cell Concentration"; solicitud provisional estadounidense n.º 61/824.816, titulada "Particle Release Collection"; solicitud provisional estadounidense n.º 62/003.758, titulada "Rare Molecule Signal Modification".

Además de las sondas para el ensayo de ICC y/o ISH, el aparato de suministro de fluido 18 puede suministrar uno o más componentes necesarios para la amplificación de la detección de células raras, tales componentes necesarios o útiles para la amplificación de la señal de tiramida (TSA), tales como tiramida, HRP y peróxido de hidrógeno, tampones adecuados, reactivos de lavado, y similares. La tiramida es un compuesto fenólico que, cuando se activa mediante la enzima peroxidasa del rábano (HRP) en presencia de peróxido de hidrógeno, se une covalentemente a restos ricos en electrones sobre una superficie (por ejemplo, predominantemente a residuos de tirosina en proteínas en preparaciones de tejido o células). Específicamente, en presencia de pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno, HRP convierte las tiramidas en productos intermedios de tiramida de vida corta, extremadamente reactivos. Las moléculas activadas reaccionan entonces rápidamente con y se unen covalentemente a regiones ricas en electrones (normalmente tirosina en forma de cadenas polipeptídicas de proteínas) de proteínas adyacentes tal como se describe. Esta unión de moléculas de tiramida activadas se produce inmediatamente adyacente a los sitios en los que la pareja de afinidad y la enzima HRP activadora se unen. Se produce deposición múltiple de la tiramida marcada en un tiempo muy corto (generalmente en el plazo de 3-10 minutos). La detección posterior del marcador, que puede estar unido a la pareja de afinidad y/o las moléculas de tiramida reactivas, produce eficazmente una gran amplificación de las señales para células raras. Pueden utilizarse otros agentes para reducir el ruido de fondo tales como tensioactivos y agentes bloqueantes tal como se conocen en la técnica. El aparato de suministro de fluido 18 puede estar configurado para suministrar tiramida, HRP y cualquiera de los componentes mencionados anteriormente adecuados para la amplificación de TSA al material retenido 14 sobre la membrana 12.

La muestra que va a someterse a prueba y colocarse sobre la membrana 12 puede ser de cualquier fuente adecuada tal como una muestra de sangre para un mamífero, que puede ser por sí misma sangre completa o plasma, por ejemplo. En determinadas realizaciones, la muestra de sangre es una que tiene células que no son raras y las células raras 15. Las células raras 15 son las células que están presentes en una muestra en cantidades relativamente pequeñas en comparación con la cantidad de células que no son raras en una muestra. En algunos ejemplos, las células raras están presentes en una cantidad de aproximadamente el 10<sup>-8</sup>% a aproximadamente el 10<sup>-2</sup>% en peso de una población de células total en una muestra que se sospecha que contiene las células raras 15. Las células raras 15 pueden ser, pero no se limitan a, células malignas tales como neoplasias malignas o células cancerosas; células endoteliales circulantes; células epiteliales circulantes; células fetales; células inmunitarias (células B, células T, macrófagos, células NK, monocitos); células madre; glóbulos rojos nucleados (normoblastos o eritroblastos); y granulocitos inmaduros; por ejemplo.

Las células que no son raras son las células que están presentes en cantidades relativamente grandes en comparación con la cantidad de células raras en una muestra. En algunos ejemplos, las células que no son raras son al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 10<sup>2</sup> veces, o al menos aproximadamente 10<sup>3</sup> veces, o al menos aproximadamente 10<sup>4</sup> veces, o al menos aproximadamente 10<sup>5</sup> veces, o al menos aproximadamente 10<sup>6</sup> veces, o al menos aproximadamente 10<sup>7</sup> veces, o al menos aproximadamente 10<sup>8</sup> veces más que la cantidad de las células raras en la población de células total en una muestra que se sospecha que contiene células que no son raras y células

raras. Las células que no son raras pueden ser, pero no se limitan a, glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos, por ejemplo.

Las muestras que se someten a análisis tal como se describe en el presente documento pueden ser de cualquier fuente adecuada y prepararse y procesarse según métodos conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, la muestra de sangre completa se filtra en primer lugar para eliminar la mayoría de los glóbulos rojos, plaquetas y similares, para aislar células raras (si están presente) mediante el aparato de filtración 11. La muestra restante que tiene las células raras 15 también comprende normalmente una cantidad de glóbulos blancos. Por ejemplo, en una realización, pueden mezclarse muestras de sangre completa con tampón y separarse a través de filtración sobre la membrana 12 para aislar células raras (si están presentes) con algunas células que no son raras (glóbulos blancos), y sin glóbulos rojos.

## 10 Control de retroalimentación

Los inventores han encontrado que los ensayos de ICC e ISH (individualmente o la combinación de ICC/ISH) pueden caracterizarse por la pérdida de componentes del ensayo, tal como por evaporación o similar. La evaporación puede tener lugar como resultado de las etapas de calentamiento en el ensayo, por ejemplo. Se ha encontrado que la pérdida de componentes, tal como la pérdida de sonda en ensayos de ICC y/o ISH, puede contribuir significativamente al aumento del ruido de fondo en la detección de células raras. Los aspectos de la presente invención incluyen por tanto un control de retroalimentación para el sistema 10 que tiene en consideración la pérdida de reactivos sobre la membrana 12.

Para determinar si se ha producido una pérdida de fluido mayor de la esperada sobre la membrana 12, el sistema 10 puede incluir uno o más sensores en comunicación con un controlador 24 programado o que tiene software/hardware para controlar el ensayo y cualquier ensayo posterior. Como tal, el controlador 24 está configurado para ejecutar instrucciones legibles por ordenador para ajustar parámetros tales como suministro de fluido de un componente particular a partir del aparato de suministro de fluido 18 o para el control de la temperatura tal como se describe a continuación. Para lograr esto, el controlador 24 comprende una o más entradas para recibir información de uno de los sensores descritos.

En determinadas realizaciones, el controlador 24 puede comprender, por ejemplo, un ordenador propósito especial que comprende un microprocesador, un microordenador, un controlador industrial, un controlador lógico programable, un circuito lógico discreto u otro dispositivo de control adecuado. En una realización, el controlador 24 comprende canales de entrada, una memoria, un canal de salida y un ordenador. Tal como se usa en el presente documento, el término ordenador puede incluir un procesador, un microcontrolador, un microordenador, un controlador lógico programable (PLC), un circuito integrado específico de aplicación y otros circuitos programables. La memoria puede incluir un medio legible por ordenador o un dispositivo de almacenamiento, por ejemplo, disco flexible, una memoria de solo lectura de disco compacto (CD-ROM), o similares. El controlador 24 comprende instrucciones legibles por ordenador para realizar cualquier aspecto de los métodos o para controlar cualquier aspecto del sistema 10 descrito en el presente documento.

En una realización, el controlador 24 puede incluir instrucciones para llevar a cabo un algoritmo 100 tal como el mostrado en la figura 2. Tal como se muestra, el controlador 24, por ejemplo, un circuito de control electrónico, puede comprender instrucciones para:

a) determinar 102 cuándo una cantidad real de fluido sobre la membrana 12 es menor que una cantidad esperada de fluido sobre la membrana basándose en la información de un sensor, por ejemplo, el sensor 20;

b) determinar 104 una cantidad de ajuste de fluido a añadir a la membrana 12; y

c) dar instrucciones 106 al aparato de suministro de fluido 18 para añadir la cantidad de ajuste a la membrana 12.

Pueden utilizarse diversos métodos para determinar que una cantidad real de fluido sobre la membrana 12 es menor que una cantidad esperada de fluido sobre la membrana basándose en la entrada de información al controlador 24 desde uno o más sensores. En una realización, se proporcionan uno o más sensores de presión para determinar cuándo se dispensa menos fluido sobre la membrana 12 de lo esperado. También se da a conocer en el presente documento (pero no parte de la invención) un sensor de nivel de fluido que puede utilizarse para determinar que menos de una cantidad esperada de fluido está sobre la membrana 12 en un punto de tiempo a lo largo de un intervalo de tiempo. En todavía otras realizaciones, pueden estar en su lugar uno o más sensores de temperatura o proporcionarse también. Cada sensor puede estar en comunicación, de manera directa o inalámbrica, con el controlador 24.

Tal como se mencionó, en una realización particular, el sistema 10 comprende uno o más sensores de presión para identificar cuándo se ha producido una pérdida de fluido. Por ejemplo, tal como se muestra en las figuras 1A-1B, uno o más sensores de presión 20 pueden disponerse sobre o alrededor de la membrana 12 para determinar una presión a la que pasa fluido a través de la membrana. En una realización, el sensor de presión 20 comprende un sensor de diferencial de presión que determina un diferencial de presión entre una región aguas arriba y aguas abajo de la membrana 12. Por ejemplo, puede situarse un único sensor de diferencial de presión para medir un diferencial de presión aguas arriba de (por encima de) la membrana 12 y aguas abajo de la membrana 12. A modo de ejemplo solo, una región aguas arriba de la membrana 12 puede comprender una ubicación de introducción de fluido en la membrana 12 y una región aguas abajo de la membrana 12 puede comprender una salida o drenaje para la membrana 12.

Tras un cambio en la presión detectado por el sensor 20, el controlador 24 está programado para determinar 104 una cantidad de ajuste de fluido a añadir a la membrana 12; y da instrucciones 106 al aparato de suministro de fluido 18 para añadir la cantidad de ajuste a la membrana 12. Para lograr esto, el controlador 24 está programado para llevar a cabo un algoritmo 200 tal como se muestra en la figura 3. Tal como se muestra, el algoritmo 200 incluye determinar 202 un tiempo real ( $T_{obs}$ ) transcurrido para que una cantidad conocida de fluido pase a través de la membrana 12 desde un tiempo inicial ( $t_0$ ) hasta un punto en el tiempo ( $t_1$ ). El punto en el tiempo se determina cuando el sensor de presión 20 indica una presión menor que, o dentro de una cantidad fijada a partir de un valor umbral predeterminado.

El tiempo inicial ( $t_0$ ) puede ser el punto en el tiempo en el que tiene lugar la adición de una primera cantidad de fluido a la membrana 12, o puede ser cualquier otro punto en el tiempo conocido donde se conoce una cantidad de fluido añadida a la membrana 12. La selección del punto en el tiempo puede seleccionarse manual o automáticamente. El punto en el tiempo ( $t_1$ ) en el que se detecta un cambio de presión puede ser uno en el que el controlador 24 recibe una indicación (por ejemplo, entrada) desde el sensor de presión 20 de una presión menor que, o dentro de una cantidad fijada a partir de un valor umbral predeterminado. En una realización particular, el valor de presión umbral predeterminado es indicativo de un estado donde no está pasando fluido adicional a través de la membrana 12. Por tanto, si la presión cae hasta el valor umbral predeterminado, o dentro de una cantidad establecida a partir del valor umbral predeterminado, se proporciona una indicación al controlador 24 de que está dispuesto poco o nada de fluido en la membrana 12.

Tal como se muestra en la figura 3, el algoritmo 200 incluye además determinar 204 un tiempo teórico para que una cantidad conocida de fluido se desplace a través de la membrana 12 desde el tiempo inicial ( $t_0$ ) hasta el punto en el tiempo ( $t_1$ ). En determinadas realizaciones, el tiempo teórico se mide empíricamente detectando la presión en un recipiente de desechos (véase la figura 6) después del paso de uno o más líquidos (véase la figura 7). Esta medición puede hacerse después de haber humedecido previamente la membrana 12 con alcoholes, por ejemplo, isopropanol (IPA), para eliminar cualquier contaminante de la membrana 12.

En referencia a la figura 6, se muestra una configuración a modo de ejemplo para medir la presión según un aspecto de la presente invención. En particular, la figura 6 muestra la membrana 12 (en forma de un portaobjetos 50) sobre un recipiente de desechos 52. El portaobjetos 50 se sella al recipiente de desechos 52 de manera que puede generarse una presión de vacío ( $P_s$ ). El recipiente de desechos 52 está conectado a un depósito de alta presión 54 para permitir la ventilación hasta presión atmosférica (1000 mbar) y sobrepresión ( $> 1000$  mbar). El recipiente de desechos 52 está también conectado a un depósito de baja presión 56 para permitir el vacío como una subpresión ( $> 1000$  mbar). Cualquier depósito 54, 56 puede aplicarse para generar  $P_s$  que es o bien sobre o bien subpresión a través de la abertura y el cierre de la válvula 58 respectiva. La  $P_s$  se mide por consiguiente mediante uno o más sensores de presión 60 tal como se muestra.

El tiempo teórico durante el cual una cantidad conocida de fluido debe pasar a través de la membrana puede basarse en un volumen conocido de líquido con una presión de vapor, densidad y velocidad de flujo conocidas. Por ejemplo, el valor teórico puede medirse empíricamente para una temperatura de referencia fija y en relación con agua. Esto puede ajustarse basándose en ecuaciones derivadas empíricamente que tienen en consideración el volumen, la presión de vapor, la tensión superficial, la densidad del líquido y la velocidad de flujo. El tiempo teórico puede ser también directamente dependiente de la temperatura y puede aplicarse (para cualquier temperatura observada) mediante una curva calibrada de tiempos observados empíricamente frente a temperatura.

En referencia a la figura 7, por ejemplo, la figura 7 muestra el comportamiento de  $P_s$  a lo largo del tiempo durante la medición del tiempo teórico. El portaobjetos 50 se sella al recipiente de desechos 52 al tiempo 0 y se aplica sobrepresión, por ejemplo 1010 mbar. El sensor de presión 60 mide un cambio mostrado por la línea de puntos. Se aplica líquido 1, normalmente IPA, a la parte superior del portaobjetos 50 en la situación de sobrepresión, luego se aplica una subpresión (vacío), por ejemplo 980 mbar. El líquido 1 comienza a drenarse y cuando se completa el drenaje, la lectura del sensor de presión 60 alcanzará la subpresión aplicada, en este caso 980 mbar. Esto se repite con un segundo líquido, normalmente agua, y la presión medida retorna a  $> 1000$  mbar debido al líquido sobre el portaobjetos. En una realización, el tiempo que tarda el segundo líquido en drenarse puede considerarse que es el tiempo teórico o ideal en que debe producirse el drenaje.

A continuación, el algoritmo 200 puede incluir determinar 206 una diferencia entre el tiempo teórico y el tiempo real para que el líquido pase a través de la membrana. Una diferencia entre el tiempo teórico y el tiempo real puede expresarse como un porcentaje según la siguiente fórmula, por ejemplo:

$$(I) \quad ((T_{obs}-T_{esp}) / T_{esp})$$

Una diferencia entre el tiempo teórico ( $T_{obs}$ ) y el tiempo real ( $T_{esp}$ ) (o viceversa) puede ser indicativa de una pérdida más rápida de lo esperado de una cantidad conocida de fluido a través de la membrana 12. Como resultado de la pérdida de fluido más rápida de lo esperado, es probable que, en un ensayo de ICC/ISH o de ISH, pueda estar presente una cantidad de fluido de fondo mayor de la deseada y/o que pueda haber una amplificación o detección reducida de células raras debido a la presencia de una menor cantidad de sondas y/o marcadores de la deseada, o un desequilibrio de los componentes para el ensayo.

En determinadas realizaciones, la diferencia (expresada como un %, por ejemplo) entre el tiempo teórico y el tiempo real para que el líquido pase a través de la membrana ( $(T_{\text{obs}} - T_{\text{esp}}) / T_{\text{esp}}$ ) se utiliza para determinar la cantidad de fluido adicional que debe añadirse a la membrana 12 para llevar la concentración de los componentes y el volumen del fluido sobre la membrana 12 de nuevo a valores óptimos. Esto es particularmente importante durante la incubación de una disolución de afinidad, ya sean anticuerpos de ICC o sondas de ISH. En estos casos, puede añadirse disolución de afinidad adicional, disolución de afinidad adicional que carece de sonda adicional o disolución de hibridación adicional con o sin sonda basándose en el nivel de líquido durante este periodo. Alternativamente, puede añadirse una disolución tal como medio de montaje con una presión de vapor superior en lugar de disolución de afinidad o hibridación adicional. Esto es particularmente importante cuando se usan temperaturas superiores, por ejemplo, > 50°C. De este modo, los aspectos de la presente invención permiten la corrección de la velocidad de evaporación de fluidos en el ensayo de ICC y/o ensayo de ISH mediante la adición de fluido(s) adicional(es).

Para proporcionar una detección optimizada de células raras, el algoritmo 200 incluye además determinar 208 una cantidad de ajuste del uno o más fluidos a añadir a la membrana desde el aparato de suministro de fluido 18 basándose en la diferencia entre el tiempo real y el tiempo teórico. En ciertas realizaciones, la cantidad de ajuste está representada por un porcentaje para cada componente. Por ejemplo, si se encuentra que el fluido que se desplaza a través de la membrana se desplazó un 10% más rápido de lo esperado o se usó un 10% más rápido de lo esperado, puede añadirse el 10% de cada componente a la membrana 12 y/o puede añadirse de nuevo el 10% del volumen esperado en forma de uno o más componentes. La cantidad de ajuste puede añadirse independientemente de un protocolo programado o puede añadirse a las cantidades convencionales expuestas en un protocolo de ensayo. Una vez que se determina la cantidad de ajuste, el algoritmo 200 incluye dar instrucciones 210 al aparato de suministro de fluido 18 para añadir la cantidad de ajuste a la membrana 12 a lo largo de un marco de tiempo predeterminado.

La realización mencionada anteriormente demostró el uso de un sensor de presión y un diferencial de tiempo para determinar una cantidad de ajuste de líquido al sistema 10 para corregir la pérdida de fluido. Una alternativa que no es parte de la invención es un sensor de nivel de fluido que se utiliza para determinar un nivel de fluido real. Este valor puede compararse con un valor teórico, esperado y/o estimado para el nivel de fluido y puede añadirse una cantidad de ajuste de fluido a la membrana basándose en la diferencia entre las cantidades de fluido real y teórica. El fluido adicional puede ser una disolución de afinidad adicional con o sin sonda adicional, disolución de hibridación adicional con o sin sonda, medio de montaje o cualquier otro fluido adecuado, incluyendo aquellos útiles en la detección de células raras por ICC y/o ISH.

Para ilustrar esta alternativa (un sensor de nivel de fluido no según la presente invención), la figura 4 muestra un esquema a modo de ejemplo de un sistema y método. Tal como se muestra, en el sistema 300, se prepara una muestra 27 con tampón 28 tal como se conoce en la técnica. Después de eso, la muestra 26 puede someterse a un proceso de filtración para separar una cantidad de células raras, por ejemplo, la célula 15, de células que no son raras. Las células raras 15 se retienen normalmente dentro de un material retenido 14 en la parte superior de una membrana 12. Las células raras 15 se ponen en contacto con reactivos de ICC/ISH 30, tales como un agente de afinidad y una sonda, y opcionalmente un agente potenciador de la señal (por ejemplo, tiramida, HRP) para llevar a cabo un ensayo de detección de células raras por ICC y/o ISH. Los reactivos 30 se someten entonces a un protocolo de calentamiento eficaz para hacer que las células puedan detectarse óptimamente aguas abajo por un elemento de control de temperatura, por ejemplo, un calentador 32, dispuesto por encima de la membrana 12.

Durante el calentamiento, la temperatura puede monitorizarse de manera continua o periódica por uno o más sensores de temperatura 34 sobre o alrededor de la membrana. Además, un sensor de nivel de fluido 36 puede detectar un nivel de fluido real en el pocillo de ensayo, por ejemplo, para determinar un volumen de fluido real sobre la membrana 12. Este valor se compara con un nivel de fluido objetivo o estimado y se determina una cantidad de ajuste de fluido si el nivel de líquido estimado es mayor que el nivel de líquido real. El controlador 24 tal como se describió anteriormente da instrucciones a un aparato de suministro de fluido 18 para añadir la cantidad de ajuste a la membrana 12. El fluido adicional puede ser una disolución de afinidad adicional con o sin sonda adicional, disolución de hibridación adicional con o sin sonda, medio de montaje o cualquier otro fluido adecuado, incluyendo aquellos útiles en la detección de células raras por ICC y/o ISH. Entonces vuelve a aplicarse calor para finalizar el protocolo de temperatura si es necesario. Una vez que se completa el protocolo de temperatura, el líquido sobre la membrana 12 se elimina por debajo hasta que un sensor de presión 38 sobre o alrededor de la membrana 12 indica que el fluido se drena y forma el permeado 16. Tal como se muestra, las etapas 3-8 tal como se ilustran pueden repetirse según sea necesario para ensayos de ICC/ISH.

La realización mencionada anteriormente introduce la inclusión de un elemento de control de temperatura. Se aprecia que, después de añadir la cantidad de ajuste, el fluido adicional sobre la membrana probablemente cambiará la temperatura sobre o alrededor de la membrana, lo que podría afectar negativamente a los resultados del ensayo. Además, se aprecia que los ensayos de ICC e ISH se benefician de una temperatura de funcionamiento estable para etapas particulares, por ejemplo, hibridación. En ciertas realizaciones, los sistemas descritos en el presente documento, por ejemplo, el sistema 10 también pueden comprender un elemento de control de la temperatura 26 tal como se muestra en las figuras 1A-1B para proporcionar un calentamiento o enfriamiento constante y fiable de la membrana 12 sin alteración de la presión sobre la membrana 12. El elemento de control de la temperatura 26 puede comprender cualquier fuente de calentamiento o enfriamiento adecuada tal como se conoce en la técnica, tal como un elemento Peltier, un LED de IR o un anillo de calor.

En una realización, el elemento de control de la temperatura 26 está configurado ventajosamente para moverse entre una primera posición 38 dispuesta sobre la membrana 12 tal como se muestra en la figura 1B y una segunda posición 40 tal como se muestra en la figura 1A donde el elemento de control de la temperatura es 32 no está dispuesto sobre la membrana 12. Puede proporcionarse cualquier disposición estructural adecuada para permitir que el elemento de control de la temperatura 26 se mueva sobre la muestra desde la primera posición 38 hasta la segunda posición 40 tal como disponiendo el elemento de control de la temperatura 26 en un brazo pivotable o deslizable. Por ejemplo, el elemento de control de la temperatura 26 puede tener una posición de reposo o estacionamiento, que está dispuesta al lado de un pocillo del aparato asociado. Esta posición de estacionamiento permite que el elemento de control de la temperatura 26 se aparte para la adición de líquido cuando se desee. En el caso de líquido añadido por una pipeta, el movimiento de la pipeta debe impedirse.

Aunque son posibles elementos de enfriamiento para el calentador, no son necesarios ya que la temperatura del líquido puede enfriar rápidamente la membrana 12 de nuevo hasta la temperatura ambiente cuando el calentador está apagado. La posición del calentador cuando está sobre el pocillo de líquido es importante para que pueda alcanzarse la temperatura objetivo en unos minutos, de manera que la evaporación se limite y el pocillo está sellado, de manera que el líquido no se toca ni se contamina de ninguna manera. Por ejemplo, se usa un cilindro calentador con brida que rodea el estante de desechos de polipropileno pero no toca la membrana o el líquido sobre la membrana 12. En una realización, una brida del elemento de control de la temperatura 32 está configurada para reposar sobre la tapa metálica de las unidades de filtración que sella el vacío entre el portaobjetos y el recipiente de desechos.

Con esta disposición del elemento de control de la temperatura 26, puede proporcionarse un control mejorado de los componentes del ensayo ya que el calentamiento/enfriamiento puede detenerse cuando no se necesita control de la temperatura. Además, se contempla que el movimiento del elemento de control de la temperatura 26 hasta una posición apartada de la membrana 12 en la segunda posición 40 permitirá espacio para que el aparato de suministro de fluido 18 añada componentes adicionales a la membrana 12 según sea necesario.

A modo de ejemplo solo, el elemento de control de la temperatura 26 móvil permite el pipeteo de diversos fluidos sobre la membrana para filtración y detección de células raras por ICC/ISH desde una posición superior de la membrana 12 en la segunda posición 40. Después de eso, el elemento de control de la temperatura 26 puede moverse de nuevo a la primera posición 38 dispuesta sobre la membrana 12. Ventajosamente también, si se aplica presión sobre la membrana 12 desde una posición por debajo de la membrana 12 (por ejemplo, para secar la membrana), la membrana 12 no se altera y puede mantenerse estable a lo largo del ensayo incluso si la temperatura cambia a lo largo del ensayo ya que el elemento de control de la temperatura 26 está dispuesto sobre la membrana. Además, en contraposición con los elementos de calentamiento situados por debajo de la membrana 12, no es necesario proporcionar orificios de drenaje en el elemento 26 de control de la temperatura. Esto da como resultado un calentamiento más regular de la membrana.

Un elemento de control de la temperatura ejemplar 26 se muestra en la figura 5 y puede incluir un accesorio, tal como un adaptador Hamilton 42, para unir el elemento de control de la temperatura 26 a un componente del sistema 10 sobre la membrana. El elemento de control de la temperatura 26 puede incluir además un elemento de enfriamiento tal como un enfriador de aluminio 44, un elemento de calentamiento tal como un elemento Peltier 46 y un elemento de transferencia de calor tal como un bloque de aluminio 48 que proporcionan colectivamente una salida de temperatura deseada para el elemento de control de la temperatura 26. Se aprecia que el elemento de control de la temperatura 26 estará dispuesto sobre, pero no en contacto, con la membrana 12. Los sensores de temperatura 34 pueden estar asociados con el elemento de control de la temperatura 34 según se desee para monitorizar la temperatura de salida del mismo.

Se aprecia que el controlador 24 también puede programarse con instrucciones para llevar a cabo un algoritmo que cambia la temperatura aplicada a la membrana 12 (calentamiento y/o enfriamiento), así como para ajustar el volumen de fluido sobre la membrana. Para lograr esto, el controlador 24 puede estar en comunicación con cualquier sensor, por ejemplo, sensores de temperatura 34, incluidos en el sistema. En realizaciones particulares, el controlador 24 está programado con instrucciones para llevar a cabo un protocolo de temperatura, que incluye pero no se limita al protocolo de gradiente de temperatura. El protocolo de temperatura puede incluir calentamiento lento, enfriamiento rápido, calentamiento rápido y/o enfriamiento lento para la membrana. En ciertas realizaciones, el protocolo de temperatura puede corresponder a un programa de temperatura predeterminado tal como se requiere para un ensayo de ICC y/o ISH que comprende etapas enzimáticas que requieren temperaturas definidas.

## Ejemplos

Se proporcionan ejemplos a continuación en el presente documento. Sin embargo, se entiende que la descripción en el presente documento no va a limitarse en su aplicación a la experimentación, resultados y procedimientos de laboratorio específicos. Más bien, los ejemplos se proporcionan simplemente como una de diversas realizaciones y pretenden ser a modo de ejemplo, no exhaustivos.

### 2.1 Preparación de muestras

Se recogieron muestras de sangre de ~10 ml de pacientes siguiendo un protocolo aprobado por IRB usando tubos de recogida de sangre y soportes de tubos que contenían K3EDTA y 0,45 ml de Transfix (Vacutest Kima TVT-09-50-45).

Se invirtieron los tubos 10 veces después de su recogida. Se almacenaron las muestras a TA durante hasta 5 días antes del aislamiento y, si se enviaron, se mantuvieron las muestras entre 10-25°C durante el envío. Se añadieron las muestras de sangre a un tubo de centrifuga de 50 ml y CS hasta 20 ml con disolución de fibrina en PBS. Se usó la línea celular de cáncer de pulmón H226 o H2228 o la línea celular de cáncer de mama SKBR (ATCC) para someter a prueba la respuesta del ensayo. Se añadieron estas células a 50, 200, 400 y 800 recuentos de células por tubo de sangre.

## 2.2 Aislamiento y fijación

El aislamiento de la fijación de las células raras se logró según el siguiente protocolo:

- Humedecer previamente con 1 ml de IPA el portaobjetos
- Lavar 1x con PBS,
- Filtración de la muestra de sangre, lavar 10x con 1 ml de PBS,
- Lavar 1x con 1 ml de formaldehído al 4% en PBS,
- Incubación con formaldehído al 4% en PBS (\*20 min)
- Lavar 2x con 1 ml de PBS, incubar cada uno durante 1 min

Se retiraron los portaobjetos y se almacenaron de manera segura antes de ICH e ISH.

## 2.3 Inmunocitoquímica (ICC)

Se realizaron reacciones de unión de anticuerpos con células después de que las células se permeabilizaran para permitir que los anticuerpos alcanzaran antígenos correspondientes sobre las células. Puede usarse peróxido de hidrógeno para la eliminación de la actividad peroxidasa endógena, lo que puede ayudar a la especificidad del anticuerpo conjugado con HRP. Finalmente, se bloqueó la unión no específica de la célula usando un agente bloqueante como caseína.

- Lavar 1x con 1 ml de TritonX al 0,2% en PBS para la permeabilización
- Incubación con 1 ml de TritonX al 0,2% en PBS (7 min)
- Lavar 5x con 1 ml de PBS
- Incubación con 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (30 min) (opcional)
- Lavar 5X con 1 ml de PBS
- Incubación con 1 ml de tampón bloqueante (25 min) para impedir la unión del marcador a células que no son raras
- Lavar 2x con 1 ml de PBS-T

En la siguiente etapa, se añadieron los anticuerpos a la disolución de afinidad. Estos pueden ser anticuerpos sin marcadores, anticuerpos con marcadores y anticuerpos con enzimas. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón para biomarcadores de tipo de células raras CK8/18/19 se marcaron con DyLight550 y anticuerpos monoclonales de ratón para biomarcadores de tipo de células que no son raras CD45 se marcaron con DyLight650. Pueden usarse conjugados de enzimas adicionales y otros marcadores. El protocolo fue tal como sigue para añadir anticuerpos a la disolución de afinidad.

- Incubación con 260 µl de disolución de afinidad (25 min), los portaobjetos se calentaron hasta 37°C
- Se añade disolución de afinidad adicional que carece de anticuerpos adicionales basándose en el nivel de líquido durante este periodo.
- Lavar 5x con 1 ml de PBS-T

## 2.4 Hibridación *in situ* (ISH)

El principio básico para la hibridación *in situ* (ISH) es utilizar la sonda para detectar secuencias de nucleótidos específicas dentro de las células. La sensibilidad de la técnica es tal que los niveles umbral de detección están en la región de 10-20 copias de ARNm por célula o un gen de ADN. Esta etapa se realiza después de la ICC e incluye el siguiente protocolo a modo de ejemplo.

Etapa A: Se usó tratamiento con proteasa. Se usa normalmente tratamiento con pepsina (n.º de producto de Sigma P6887, 40 unidades/ml en HCl 10 mM) o proteasa (como tripsina, proteasa K) para los métodos de ISH para exponer los ácidos nucleicos. Sin reticular el anticuerpo químicamente, la integridad estructural del antígeno y los anticuerpos se destruye. La pepsina tiene la ventaja de que puede inactivarse fácilmente por cambios de pH y la reacción es más fácil de controlar. Puede prepararse una disolución madre de pepsina al 10% en agua (o glicerol al 50%) de una vez, dividirse en alícuotas y almacenarse durante años a aproximadamente 20°C. La disolución de trabajo era enzima al 0,005% en HCl 0,01 N. El tiempo de incubación era de 1 minuto para portaobjetos envejecidos químicamente y 10-15 minutos para portaobjetos envejecidos durante la noche a 65°C, y le siguió incubación en PBS y series de etanol que duraban unos pocos segundos. También puede usarse tripsina a 0,5-1 mg/ml en tampón isotónico, similar al protocolo de bandeó. Después de 3-10 segundos de incubación, se detuvo la actividad de la enzima lavando con tampón de solución salina-citrato de sodio (SSC: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7, o n.º de producto S6639).

El protocolo de tratamiento con proteasa usado es tal como sigue:

- Se añaden 260 µl de disolución de proteasa (pepsina) a TA al portaobjetos a ~ 35-40°C durante 5-15 min
- Lavar 5x con 1 ml de SSC, incubar cada uno durante 1 min
- Lavar 2x con 1 ml de agua, incubar cada uno durante 1 min (lavado opcional)

Etapa B. Se usó tratamiento con ARNasa A. Cuando se realizan estudios con sondas para detectar ARNm, se añade a menudo una etapa de tratamiento con ARNasa para determinar que la unión es específica para el ARN digiriendo las células con ARNasas antes de la hibridación con la sonda oligonucleotídica. La ausencia de unión tras el tratamiento con ARNasa indica que la unión era de hecho a ARN dentro del tejido. Otro tratamiento previo comúnmente observado cuando se usan sondas de ARN es acetilación con anhídrido acético (0,25%) en trietanolamina. Se cree que este tratamiento es importante para disminuir el fondo pero también parece inactivar ARNasas y puede ayudar a producir una señal fuerte.

El protocolo de tratamiento con ARNasa fue tal como sigue:

- Incubación con 260 µl de ribonucleasa (ARNasa) durante 1 hora a 37°C (n.º de producto de Sigma R4642 a 100 µg/ml en 2x SSC)
- Lavar 5x con 1 ml de SSC
- Enjuagar los portaobjetos en HCl 10 mM.

Etapa C. Normalmente se requieren hibridación y lavado para cualquier método de ISH. El proceso de hibridación es crítico en el control de la eficacia de la sonda para aparearse con una hebra de ARN o ADN diana complementaria justo por debajo de su punto de fusión ( $T_m$ ). El ADN o ARNm diana y la sonda pueden desnaturalizarse simultáneamente usando una disolución de hibridación química. La sonda puede aparearse en el punto de fusión junto con ADN competidor bloqueante, que podría usarse como opción para reducir la unión no diana a secuencias repetitivas. Los ADN supresores más comunes sometidos a prueba fueron ADN de Cot1 (Life Technologies) y ADN de esperma de salmón (Sigma). Las secuencias repetitivas (especialmente familias Alu y L1 en el ser humano) tienen que bloquearse con ADN competidor antes de FISH. También puede usarse sonda de control adicional o múltiples sondas diana. Las temperaturas de la disolución de hibridación pueden variarse desde 25 hasta 100°C a lo largo de periodos de tiempo de 5 min a 25 horas.

La disolución de hibridación puede ser formamida al 70%/2X SSC, pH 7,0-8,0. Alternativamente, el ADN diana puede desnaturalizarse 5 minutos a 75°C usando solo disolución de hibridación, luego aparearse a de 40 a 100°C durante de 5 min a 25 h dependiendo de la temperatura de fusión. Se eligió un ADN competidor para permitir que secuencias repetitivas se hibridaran. Antes de su uso, los portaobjetos se envejecieron durante 8 horas a 65°C, luego se pretrataron 10 minutos en pepsina (algunos portaobjetos) y se desnaturalizaron 2 minutos a 75°C (algunos portaobjetos). Puede usarse una disolución de mezcla de hibridación alternativa que es: formamida al 50% (n.º de producto F7508), sulfato de dextrano al 10% (n.º de producto D8906), SDS al 0,1% (n.º de producto L4390). La sonda de marcador puede ser sonda 0,5-1,5 ng/µl y la sonda bloqueante puede ser 300 ng/ml (ADN de esperma de salmón n.º de producto D7656) en 2x SSC.

Los lavados tras la hibridación se realizaron a de TA a 65°C para eliminar la sonda no unida. Tampón de lavado tras la hibridación (2X SSC/NP-40 al 0,3%): Mezclar 3 ml de NP-40 con 100 ml de 20X SSC. NP-40 es un detergente disponible comercialmente. El nombre completo de NP-40 es NP-40 de tipo Tergitol, que es nonilfenoxipolietoxil-etanol. El volumen total se llevó hasta 1.000 ml con agua purificada y el pH se ajustó a 7,0-7,5 con NaOH 1 N.

En un ejemplo, se usó mezcla de sondas de FISH EGFR/CEN-7 (Y5500 Dako North America, Inc. Carpinteria, CA) con las células H226. Esta era una sonda de ADN doble, la mezcla de sondas de FISH detecta el número de copias del gen de EGFR (receptor de factor de crecimiento epidérmico) ubicado en el cromosoma 7p11.2, que abarca aproximadamente 188 kb y que contiene 28 exones y se usó la región del centrómero del cromosoma 7 como

referencia. Esta mezcla de sondas consiste en una sonda de ADN marcada con rojo Texas de 196 kb que cubre la región de EGFR completa, y una mezcla de sondas de PNA marcadas con fluoresceína dirigidas a la región centromérica del cromosoma 7. La hibridación específica con las dos dianas da como resultado la formación de una señal fluorescente roja distinta en cada gen de EGFR y una señal fluorescente verde distinta en cada región centromérica del cromosoma 7. Para disminuir la tinción de fondo, la mezcla de sondas también contiene oligonucleótidos de PNA sin marcar dirigidos hacia secuencias repetitivas. El reactivo se proporciona en forma líquida en disolución de hibridación que contiene formamida al 45%, dextrano de sulfato al 10%, N-metil-2-pirrolidona al 0,21%, NaCl 300 mmol/l, fosfato 5 mmol/l y agente bloqueante.

El protocolo de hibridación de ADN usado para EGFR es tal como sigue:

- 10
  - No se realiza tratamiento con proteasa o ARN
  - Los portaobjetos se lavan 2x con 1 ml de agua, se incuban cada uno durante 1 min (a menos que se hayan lavado previamente)
  - Se pipetearon 33  $\mu$ l de sonda marcada con fluorocromo de FISH EGFR/CEN-7 en disolución de hibridación sobre el área del portaobjetos que va a hibridarse
- 15
  - Se calentaron los portaobjetos hasta 82°C durante 5 min seguido por incubación durante de 1 a 12 h a 60°C. Se añade disolución de hibridación adicional que carece de sonda basándose en el nivel de líquido durante este periodo. Alternativamente, puede añadirse medio de montaje en lugar de disolución de hibridación adicional.
  - Lavar 5x con 1 ml de tampón de lavado riguroso (2X SSC/NP-40 al 0,3%) a 25-60°C.

- 20 Otro ejemplo usado es la sonda de ADN de ALK, conjugada con fluorocromo (Y5417) para las células H2228. El gen de ALK humano consiste en 29 exones que abarcan una región de ~728 kb en el cromosoma 2, banda p23. Y5417 es una sonda basada en una combinación de tecnología de ADN y PNA, y contiene una sonda conjugada con fluorocromo de dos partes y sondas bloqueantes de PNA sin marcar. La sonda de ADN conjugada con fluorocromo es una sonda de ADN marcada con rojo Texas (ALK-aguas abajo) que cubre 289 kb teloméricos con respecto a la región de agrupación de punto de rotura de ALK y una sonda de ADN marcada con fluoresceína (ALK-aguas arriba) que cubre 557 kb centroméricos con respecto a la región de agrupación de punto de rotura de ALK.

En otra realización del método anterior, el método de ISH anterior se realizó usando un ensayo de amplificación de señal de ADN ramificado. Por ejemplo, se usó un kit de CTC Scope (Advance Cell Diagnostics). Este kit se basa en el ensayo de amplificación de señal de ADN ramificado. Una sonda de oligonucleótido específica de ARN se hibrida con ARN diana en células como "sonda de captura". En este ejemplo, se detectó ARN de her2Neu en células SKBR. Esta sonda va seguida por reactivos de pre-amplificación y una serie de reactivos "extendedores" de la amplificación, que usan moléculas de ADN monocatenarias para generar un complejo de múltiples capas. Cada "extendedor" tiene dos dominios, uno que se hibrida con la molécula de ADN previa y uno que se conecta con la siguiente capa. Una vez que se completa el complejo, se captura una molécula de ADN marcada con sonda fluorescente de modo que pueda detectarse la señal. El procedimiento de automatización se expandió para permitir el uso de cuatro capas de amplificación después de la disolución de hibridación de sonda diana. Cada etapa se incubó durante un tiempo y temperatura fijados, luego se lava. Este método usa una etapa de tratamiento con proteasa.

El protocolo de hibridación de ADN b usado para her2nue fue tal como sigue:

- 40
  - Incubación con 1 ml de TritonX al 0,2% en PBS (\*7 min) (si no se permeabilizó previamente)
  - Lavar 2x con 1 ml de PBS, incubar cada uno durante 1 min
  - 260  $\mu$ l de disolución de proteasa RTU de CTC Scope a de TA a \*40°C durante 5 min
  - Lavar 2x con 1 ml de agua, incubar cada uno durante 1 min
  - Incubar 260  $\mu$ l de disolución de hibridación de sonda diana de RTU a 40°C durante \*180 min
  - Lavar 3x con 1 ml de tampón de CTC Scope, incubar cada uno durante 2 min a TA
- 45
  - Incubar 260  $\mu$ l de disolución Amp1 de RTU de CTC Scope a 40°C durante \*40 min
  - Lavar 3x con 1 ml de tampón de CTC Scope, incubar cada uno durante 2 min a TA
  - Incubar 260  $\mu$ l de disolución Amp2 de RTU de CTC Scope a 40°C durante \*15 min
  - Lavar 3x con 1 ml de tampón de CTC Scope, incubar cada uno durante 2 min a TA

- Incubar 260 µl de disolución Amp3 de RTU de CTC Scope a 40°C durante \*30 min
- Lavar 3x con 1 ml de tampón de CTC Scope, incubar cada uno durante 2 min a TA
- Incubar 260 µl de disolución Amp4 de RTU de CTC Scope a 40°C durante \*15 min
- Lavar 3x con 1 ml de tampón de CTC Scope, incubar cada uno durante 2 min a TA

5 2.5 Tinción de núcleos y medio de montaje

10 La tinción de núcleos se realiza normalmente para los procedimientos de o bien ICC o bien ISH. 4',6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) es una tinción fluorescente que se une fuertemente a regiones ricas en A-T en el ADN. Se usa extensamente en microscopía de fluorescencia. Alternativamente, la tinción de Hoechst 33342 es parte de una familia de bis-bencimididas de colorantes fluorescentes azules para teñir el ADN. Si ya se realiza la tinción de núcleos para ICC, entonces no es necesario que se repita para ISH. Tras la tinción de núcleos, la señal de fluorescencia de los marcadores se protege usando medio de montaje tal como mezclas basadas en glicerol con DAPCO o 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, lo que prolonga la fluorescencia. El protocolo de tinción de núcleos y medio de montaje usado para todos los métodos de ICC e ISH fue tal como sigue:

- Incubación con 260 µl de DAPI durante 20 s (tinción de núcleos)
- Lavar 2X con 1 ml de PBS
- Añadir 33 µl de medio de montaje de glicerol/DAPCO

15 2.6 Procedimiento de amplificación de TSA opcional para ISH o ICC

20 En una realización del método anterior, se añadió una etapa de amplificación de la fluorescencia usando un kit de amplificación de señal de tiramida disponible comercialmente (Molecular Probes, n.º: T-20916, T-20936 y T-30954). Para la amplificación de ISH, se hizo reaccionar una sonda con biotina con un conjugado de esteptavidina-HRP y las células se hicieron reaccionar con tiramida-Alexa488. En cualquiera de los métodos de ICC e ISH, la reacción de TSA se realiza mediante incubación de 25 min a TA de 260 µl de tiramida-Alexa488 en peróxido de hidrógeno al 0,0015% (25 min) (etapa de amplificación 3) y lavando 5 veces con 1 ml de TritonX al 0,2% en PBS para eliminar por lavado tiramida-Alexa488 no unida. El portaobjetos que se hizo reaccionar se incubó entonces con 500 µl de DPAI y se lava dos veces con 1 ml de PBS-T para lavar DAPI extra. Para un ejemplo de amplificación de ICC, se hace reaccionar un anticuerpo con biotina con un conjugado de esteptavidina-HRP en la misma secuencia.

25 2.7 Metodología de medición microscópica de la señal celular

30 Se realizó el examen de los portaobjetos bajo un microscopio de fluorescencia con conjuntos de filtros apropiados. La medición de una cantidad de señal obtenida en cualquiera de los métodos de ensayo anteriores para células raras que comprende medir dos o más biomarcador se correlaciona con el nivel de enfermedad en el sujeto. Esta medición se explica más completamente tal como sigue: Para determinar en primer lugar si la célula es de interés usando un marcador de células raras con señal distinta diferenciada y por comparación con un marcador de células que no son raras en una segunda señal distinta diferenciada, las células raras se cuentan cuando la señal de células raras está por encima de un umbral y señal de células que no son raras está por debajo de un umbral. El umbral se define como el punto en el que la señal es detectable por encima del ruido. El ruido en este caso es la señal de fondo sobre la matriz de filtración. Una señal distinta diferenciada adicional para otras características de células raras puede medirse para cada célula rara. Las células raras con señal de características de células raras adicionales por encima del umbral se cuentan como célula rara con esta característica. El proceso de filtración permite que todas las señales se midan simultáneamente. Se selecciona un umbral de señal diferenciado para cada determinación de si una célula es una célula rara, una célula que no es rara o si una célula rara tiene una característica adicional. El umbral de señal de células que no son raras se establece usando un control negativo con células que no son raras. Los umbrales de señal característica adicional y de células raras se determinan usando un control positivo con una célula que no es rara y células raras cultivadas que se fijan con la característica adicional. Las señales por debajo del umbral se establecen en cero. Se ejecutó la muestra desconocida y solo las señales de características adicionales por encima del umbral se midieron en células que son células positivas para células raras y células negativas para células que no son raras.

45 Los métodos anteriores pueden emplearse para determinar el potencial de un sujeto mamífero para presentar enfermedad. La señal obtenida en cualquiera de los métodos de ensayo anteriores para una célula rara que comprende una o más características adicionales se correlaciona con el potencial de un sujeto mamífero para presentar enfermedad midiendo las señales de células raras y células que no son raras que identifican a las células por encima del umbral de células raras y por debajo del umbral de células que no son raras. La señal de características adicionales sobre la célula rara se mide entonces si está por encima del umbral positivo. Los números de células raras se cuentan para cada paciente. Si la señal para la característica está por encima del umbral para la característica, se considera que la célula tiene esta característica. Cuanto mayor es el aumento en la señal de la característica por encima del umbral, mayor es la característica para la célula rara. Cuanto mayor es el número de células raras, el número de células raras

con características y la extensión de características adicionales, mayor es la correlación del sujeto que presenta enfermedad frente a sujetos que carecen de enfermedad.

2.8 Resultados

5 La siguiente tabla enumera los resultados de la modificación de un método de ICC/ISH según aspectos de la presente invención.

Tabla 1

Etapa de la invención	Efecto observado
Sin adición de retroalimentación para ISH	Fondo de EFGR alto en blanco
Adición de retroalimentación para ISH	Sin fondo de sonda de EFGR en células distintas de H226 con mutación
Sin adición de retroalimentación para ICC	Fondo de marcador de glóbulos blancos CD45 en células cancerosas
Adición de retroalimentación para ICC	Sin fondo de marcador de glóbulos blancos CD45 en células cancerosas

2.9 Procedimiento de contratinción con colorante cromogénico opcional

10 Para cualquiera de los métodos descritos anteriormente, puede realizarse una tinción con colorante cromogénico (H&E) como método regresivo son hematoxilina de Harris (Sigma Aldrich) o método progresivo con disoluciones de Mayer o Gill (método de tinción Diff-Quick o HAE-1-1FU de ScyTeck Laboratories) tal como conocen los expertos en la técnica. Este método debe realizarse tras hacerse mediciones fluorescentes. La H&E regresiva más compleja se realizó prelavando el portaobjetos 2 veces con 1 ml de agua. El portaobjetos se tiñó para ICC e ISH o solo contenía células fijadas. A continuación, se incubaron 500 µl de hematoxilina (Sigma Aldrich HHS 32) durante 5 min seguido por lavado del portaobjetos 3 veces con 1 ml de agua. A continuación, se incubaron 500 µl de disolución de diferenciación (Sigma Aldrich A 3179) durante 1 min seguido por lavado del portaobjetos una vez con 1 ml de agua. A continuación, se incubaron 500 µl de disolución de agente azulante (Sigma Aldrich S5134) durante 1 min seguido por lavado del portaobjetos 1 vez con 1 ml de agua y 2 veces con 1 ml de etanol al 95%. Finalmente, se incubaron 500 µl de (disolución de eosina Y Sigma Aldrich HT110-1) durante 1 min seguido por lavado del portaobjetos 1 vez con 1 ml de etanol al 95%.

20 Procedimiento de partículas de captura opcional

Además del procedimiento mostrado anteriormente, pueden aislarse “biomarcadores” libremente circulantes mediante “partícula de captura” para los procedimientos de ICC e ISH mostrados anteriormente.

25 Se recogieron muestras de sangre completa (aproximadamente 8 ml) de donantes sanos en tubos que contenían K<sub>3</sub>EDTA y 0,45 ml de conservante TRANSFIX®, que también contenían paraformaldehído al 1% (Vacutest Kima TVT-09-50-45). Se recogieron células cancerosas del cultivo tisular y se añadió un número conocido a cada muestra de sangre. Se usó la línea de células cancerosas SBKR (ATCC) para las pruebas. Estas células no fijadas se lisaron mediante sonicación de modo que solo permanecieron ácidos nucleicos libres de células para CK19 y proteínas para her2nue y se añadieron a de 10<sup>4</sup> (por ejemplo 10.000) a 10<sup>8</sup> recuentos de células por tubo de sangre. Se centrifugaron los tubos de sangre usando una centrífuga y se retiró el plasma (~ de 3 a 5 ml). Esta muestra de plasma contenía células que no son raras (por ejemplo células mononucleares de sangre periférica o capa leucocítica) en concentraciones típicas.

35 Antes de la filtración, se transfirió una muestra de plasma de (3-5 ml) a un tubo FALCON® de 50 ml, que se llenó hasta 20 ml con PBS. A esto le siguió la adición de 25 ul de partículas magnéticas recubiertas con sílice de 0,2 micrómetros de diámetro a cada tubo (Siemens Healthcare Diagnostics, reactivos de preparación de muestras VERSANT). Puede usarse disolución de proteinasa K para inactivar nucleasas que de lo contrario podrían degradar el ADN o ARN durante el aislamiento.

40 La muestra diluida se colocó en una estación de filtración y la muestra diluida se filtró a través de la membrana de la estación de filtración tal como se muestra en el ejemplo 1 con las únicas diferencias de que los tamaños de poro de la membrana de filtración oscilaban desde 0,1 um y el vacío aplicado variaba entre 1 y -500 mBar ya que los diámetros de la partícula de captura eran de 0,2 um. Usando el protocolo de ICC e ISH descrito tal como se muestra en el ejemplo 1, se midieron ARN, ADN y proteína sobre la membrana produciendo los mismos efectos.

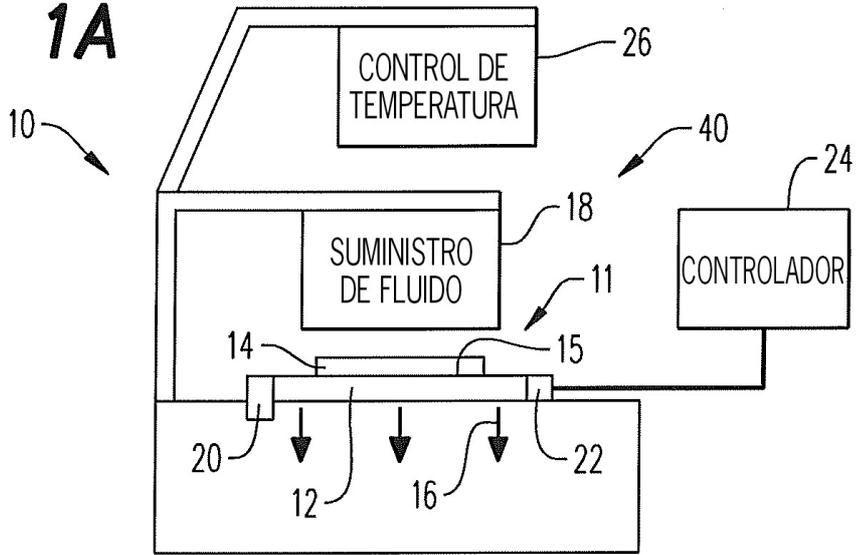
**REIVINDICACIONES**

1. Sistema automatizado para la filtración de una muestra y para la detección de células raras de una muestra, comprendiendo el sistema:
- 5 un aparato de filtración (11) que comprende una membrana (12) a través de la cual se hace pasar la muestra para proporcionar un material retenido (14) que se sospecha que tiene una cantidad de células raras (15);
- un aparato de suministro de fluido (18) que introduce un fluido sobre la membrana (12) para la filtración o detección de las células raras (15);
- un sensor de presión (20) dispuesto sobre o alrededor de la membrana (12) para indicar directa o indirectamente un nivel de fluido sobre la membrana (12), en el que el fluido es un líquido,
- 10 caracterizándose el sistema automatizado porque comprende además un circuito de control electrónico (24) configurado para:
- a) determinar un tiempo real transcurrido para que una cantidad conocida de fluido pase a través de la membrana (12) desde un tiempo inicial hasta un punto en el tiempo,
- 15 determinándose el punto en el tiempo cuando el sensor de presión (20) indica una presión menor que, o dentro de una cantidad fijada a partir de un valor umbral predeterminado;
- b) determinar un tiempo teórico para que una cantidad conocida de fluido se desplace a través de la membrana (12) desde el tiempo inicial hasta el punto en el tiempo, en el que una diferencia entre el tiempo teórico y el tiempo real es indicativa de una pérdida del fluido más rápida de lo esperado;
- 20 c) determinar la cantidad de ajuste del fluido a añadir a la membrana (12) desde el aparato de suministro de fluido (18) basándose en la diferencia entre el tiempo real y el tiempo teórico; y
- d) dar instrucciones al aparato de suministro de fluido (18) para que añada la cantidad de ajuste a la membrana (12).
2. Sistema automatizado según la reivindicación 1, en el que el valor umbral de presión predeterminado es un valor que indica que todo el fluido menos el material retenido (14) ha pasado a través de la membrana (12).
3. Sistema automatizado según la reivindicación 1, que comprende además un elemento de control de la temperatura (26) que puede moverse desde una primera posición sobre una superficie superior de la membrana (12) para calentar o enfriar la membrana (12) hasta una temperatura predeterminada hasta una segunda posición lejos de la membrana (12), en el que la segunda posición permite la adición de fluido desde el aparato de suministro de fluido (18).
- 25 4. Sistema automatizado según la reivindicación 3, en el que el circuito de control electrónico (24) da instrucciones al elemento de control de la temperatura (26) en la segunda posición cuando el circuito de control electrónico (24) da instrucciones al aparato de suministro de fluido (18) para añadir la cantidad de ajuste a la membrana (12).
- 30 5. Sistema automatizado según la reivindicación 3, que comprende además un sensor de temperatura dispuesto sobre o alrededor de la membrana (12), en el que el circuito de control electrónico (24) está configurado para ajustar una temperatura del elemento de control de la temperatura (26) basándose en la información del sensor de temperatura.
6. Sistema automatizado según la reivindicación 1, en el que el fluido comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en una sonda, un marcador, un reactivo, un tampón, una disolución de lavado, y combinaciones de los mismos.
- 35 7. Sistema automatizado según la reivindicación 1, en el que el uno o más fluidos comprenden un componente necesario para llevar a cabo un ensayo de detección por ISH.
8. Sistema automatizado según la reivindicación 1, en el que el fluido comprende un componente para llevar a cabo un ensayo de detección de células raras por ICC, o
- 40 en el que el fluido comprende un componente para llevar a cabo un ensayo de detección de células raras por ISH.
9. Sistema automatizado según la reivindicación 1, que comprende además un detector para la detección de las células raras (15) sobre la membrana (12).
10. Método automatizado para la filtración de una muestra y para la detección de moléculas raras en la muestra, el método se caracteriza por las etapas que comprenden:
- 45 a) hacer pasar una muestra a través de una membrana (12) para proporcionar un material retenido (14) que se sospecha que tiene una cantidad de moléculas raras;
- b) introducir un fluido sobre la membrana (12) para la detección de las moléculas raras;

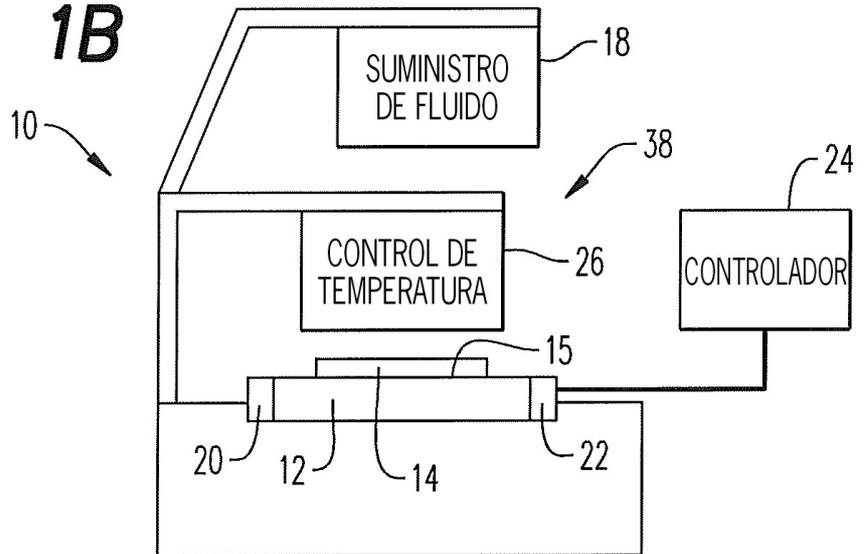
- c) determinar cuándo una cantidad real del fluido sobre la membrana (12) es menor que una cantidad esperada de fluido sobre la membrana (12);
- d) determinar una cantidad de ajuste de fluido a añadir a la membrana (12) cuando la cantidad del fluido sobre la membrana (12) es menor que la cantidad esperada
- 5 detectando una presión a la que el líquido pasa a través de la membrana (12);
- detectando una caída en la presión por debajo de un valor umbral predeterminado en un punto en el tiempo por medio de un sensor;
- determinando un tiempo real transcurrido para que la muestra y el uno o más fluidos se desplacen a través de la membrana (12) desde un tiempo inicial hasta el punto en el tiempo; y
- 10 determinando un tiempo teórico para que la muestra y el uno o más fluidos se desplacen a través de la membrana (12) desde el tiempo inicial hasta el punto en el tiempo, en el que una diferencia entre el tiempo teórico y el tiempo real es indicativa de una pérdida de fluido más rápida de lo esperado,
- en el que la cantidad de ajuste se determina preferiblemente con la diferencia entre el tiempo real y el tiempo teórico; y
- e) dar instrucciones al aparato de suministro de fluido (18) para añadir la cantidad de ajuste a la membrana (12),
- 15 en el que el fluido es un líquido.
11. Método según la reivindicación 10, que comprende además proporcionar un elemento de control de la temperatura (26) que puede moverse desde una primera posición sobre una superficie superior de la membrana (12) para calentar o enfriar la membrana (12) hasta una temperatura predeterminada hasta una segunda posición lejos de la membrana (12), en el que la segunda posición permite la adición del fluido desde el aparato de suministro de fluido (18).
- 20 12. Método según la reivindicación 11, que comprende además dar instrucciones al elemento de control de la temperatura (26) en la segunda posición cuando el circuito de control electrónico (24) da instrucciones a la estación de introducción de fluido para añadir la cantidad de ajuste a la membrana (12).
13. Método según la reivindicación 11, que comprende además:
- proporcionar un sensor de temperatura para detectar una temperatura sobre o alrededor de la membrana (12); y
- 25 ajustar una salida de temperatura del elemento de control de la temperatura (26) basándose en la información del sensor de temperatura.
14. Método según la reivindicación 11, en el que el fluido comprende un componente para un ensayo de detección de células raras por ICC, o
- en el que el fluido comprende un componente para un ensayo de detección de células raras por ISH.

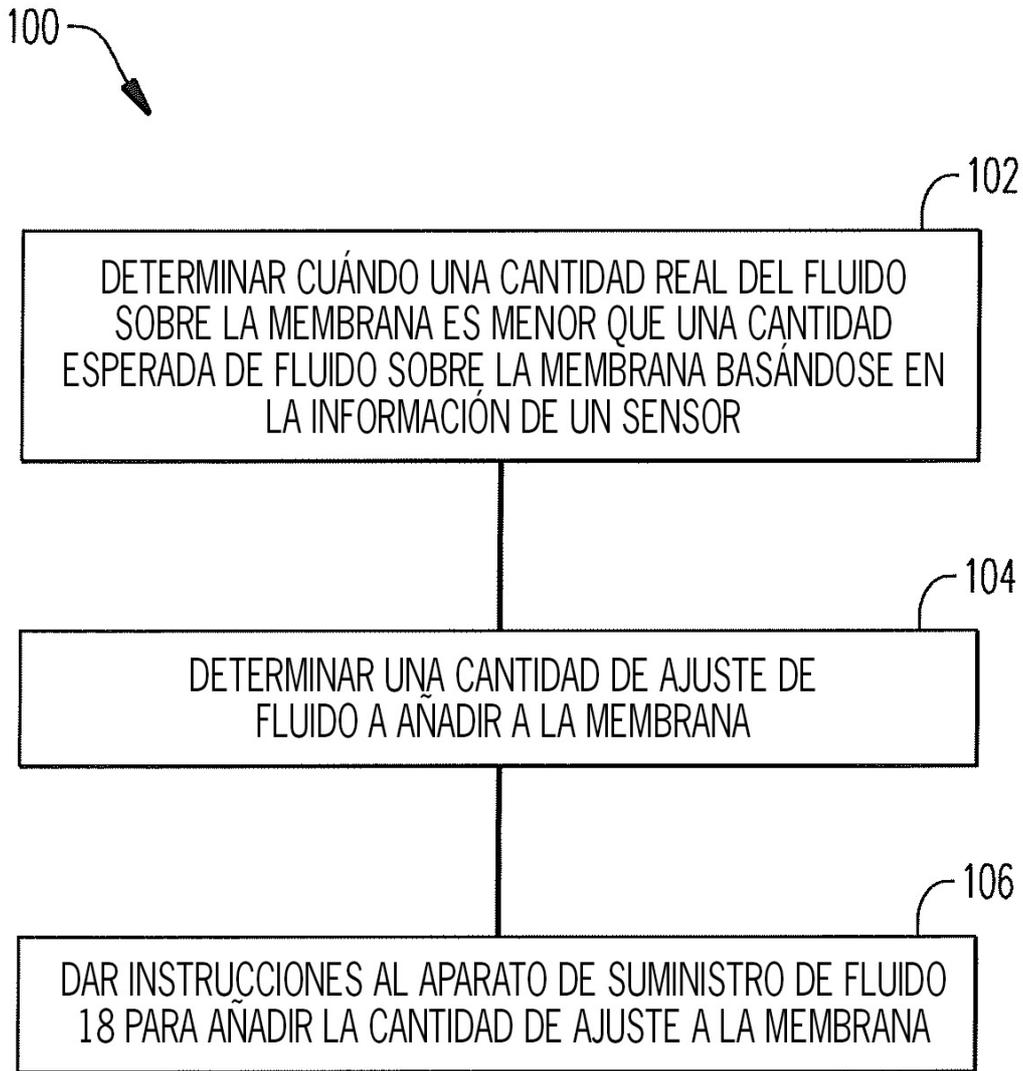
30

**FIG. 1A**

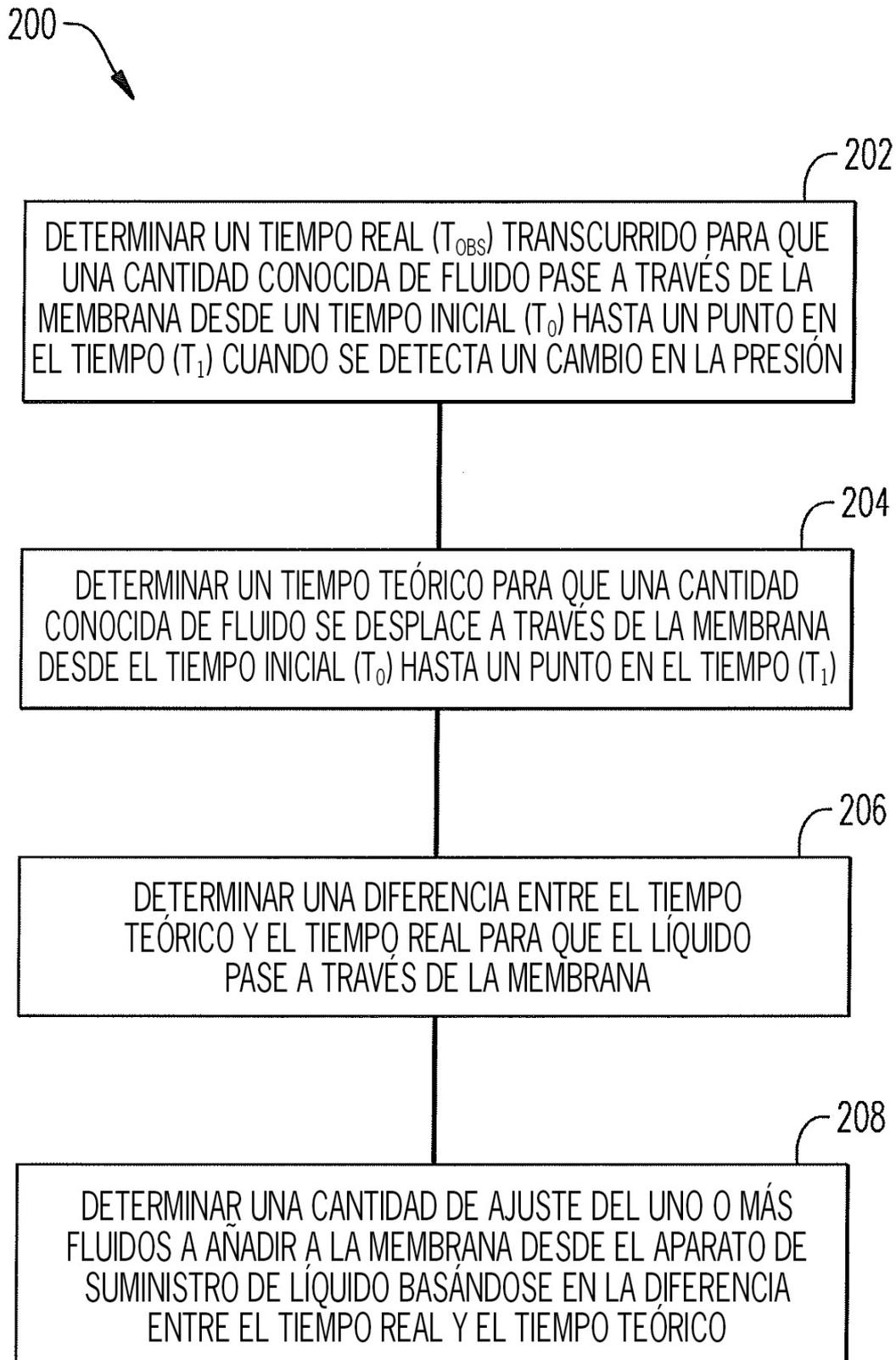


**FIG. 1B**



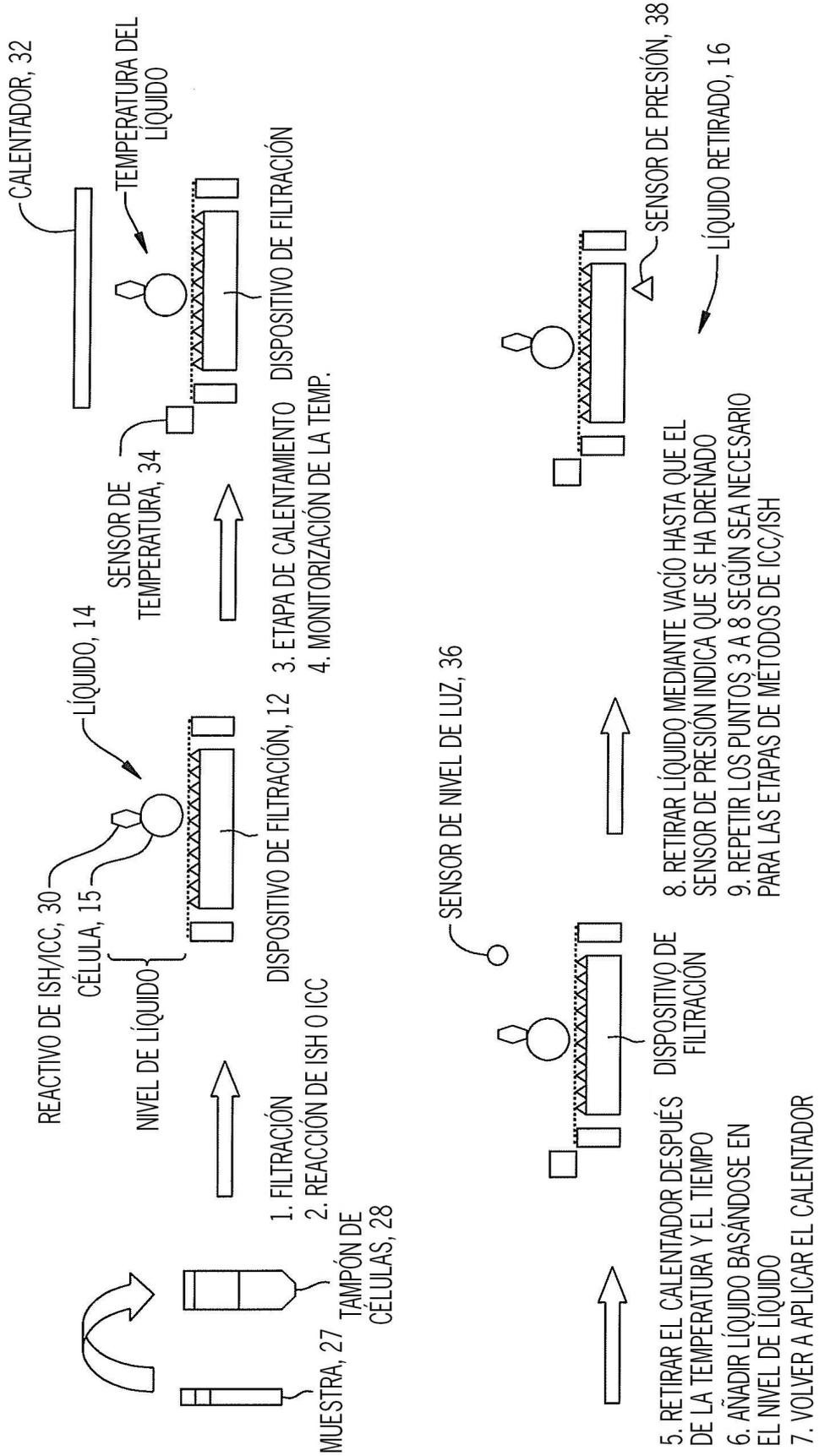


**FIG. 2**

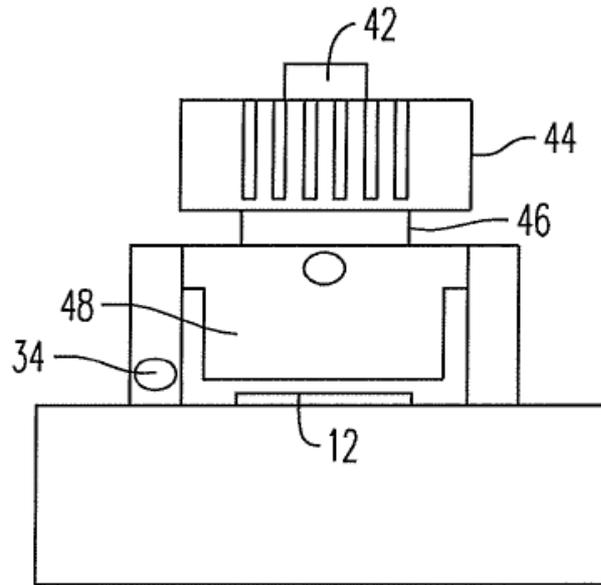


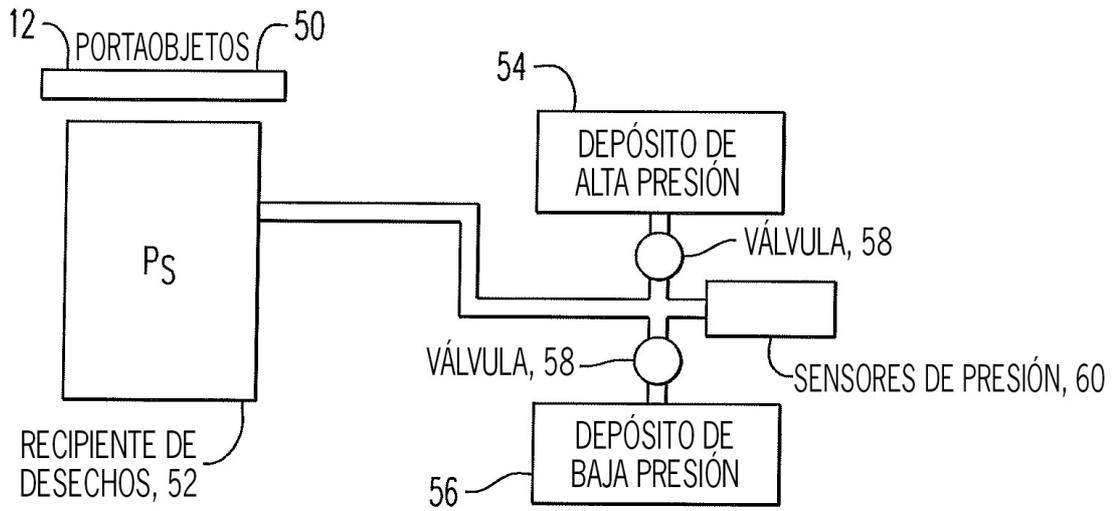
**FIG. 3**

FIG. 4

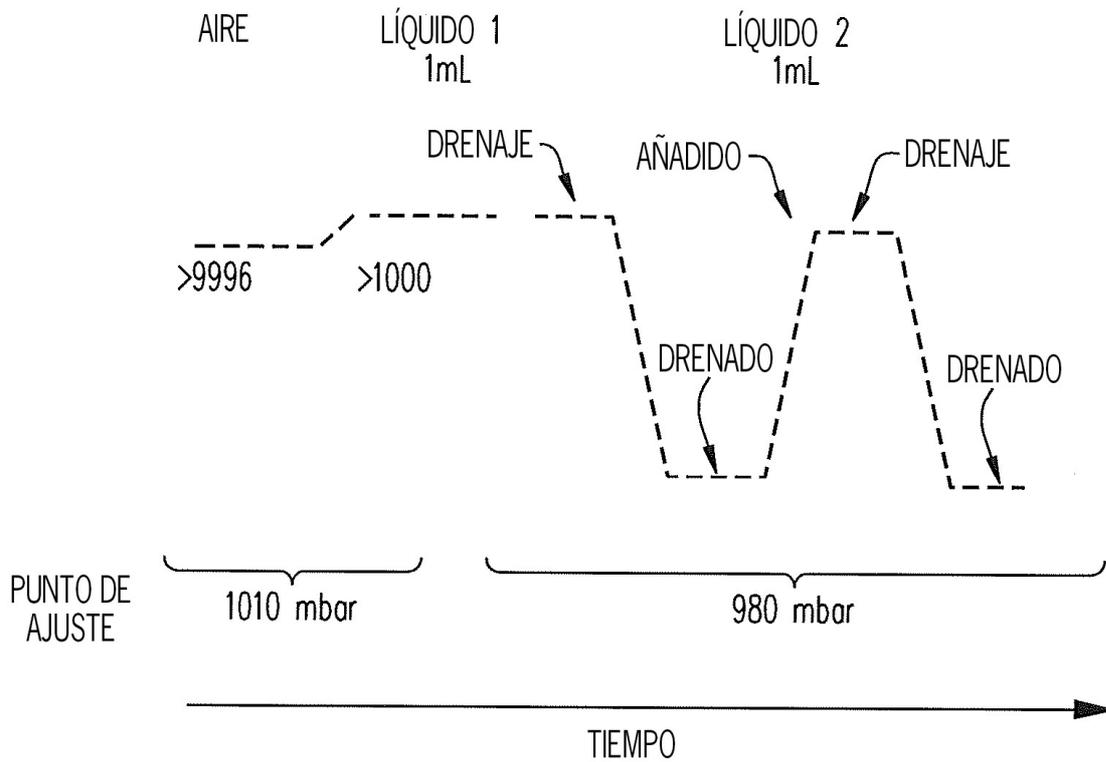


**FIG. 5**





**FIG. 6**



**FIG. 7**