

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 929**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2016** **E 16189483 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3296742**

54 Título: **Método de determinación de la presencia y/o cantidad de moléculas diana**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2021

73 Titular/es:

CANOPY BIOSCIENCES, LLC (100.0%)
4340 Duncan Avenue, Suite 220
St. Louis, Missouri 63110, US

72 Inventor/es:

HENNIG, CHRISTIAN, DR.

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 822 929 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

Método de determinación de la presencia y/o cantidad de moléculas diana

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la biología celular y se refiere a métodos para el análisis de células individuales en una muestra de sangre mediante la determinación de la presencia y/o cantidad de una o más moléculas diana en una pluralidad de células.

10

Antecedentes de la invención

Los citómetros de flujo y los separadores de células activados por fluorescencia (FACS) son actualmente el método de referencia para la caracterización de células en suspensión usando anticuerpos fluorescentes y otras sondas marcadas con colorante. Son herramientas analíticas usadas ampliamente en la investigación biomédica y el diagnóstico clínico y facilitan enormemente el estudio de propiedades tanto físicas (por ejemplo, tamaño, forma) como bioquímicas (por ejemplo, distribución del ciclo celular, contenido de ADN) de muestras biológicas, tales como células. La información sobre las células de interés se obtiene ópticamente de manera cuantitativa y no destructiva (Givan, A., 2001, *Flow Cytometry: First Principles*, John Wiley & Sons, Nueva York). La citometría de flujo se usa habitualmente en una variedad de campos biomédicos (por ejemplo, inmunología o biología celular y molecular), lo que permite estudios de análisis del ciclo celular, niveles de expresión génica, medición de citocinas intracelulares, análisis de vacunas, fagocitosis y muchos más (Shapiro, H. y Leif, R., 2003, *Practical Flow Cytometry*, Wiley-Liss, Nueva York). Además de sus aplicaciones en la investigación biomédica básica, la citometría de flujo se ha convertido en una importante herramienta clínica para controlar la progresión de enfermedades hematológicas tales como leucemia y SIDA. Los sistemas de FACS modernos pueden examinar ópticamente decenas de miles de células por segundo y luego seleccionar una subpoblación específica de células para un análisis adicional, lo que permite estudios de muestras poco comunes, tales como células madre (Gratama J., *et al.*, 1998, *Cytometry* 34, 128). Una alternativa o adición a la citometría de flujo es la citometría basada en chip microfluídico para el análisis integral de células inmunitarias (iCBC, por sus siglas en inglés) usando tamaños de muestra muy pequeños, en la que las células se (auto)inmovilizan dentro del chip (Hennig C., *et al.*, 2008, *Cytometry Parte A*, 75A, 362-370).

La citometría de flujo tradicional detecta y analiza señales ópticas (dispersión de luz angular o fluorescencia emitida) para identificar muestras biológicas o células individuales. Para el caso de la detección de señales de fluorescencia, la señal medida consiste en ruido de fondo, autofluorescencia de la célula, la señal de marcadores de fluorescencia unidos de manera inespecífica y, finalmente, la señal de marcadores unidos de manera específica a moléculas diana sobre o en las células (siempre que la medición se lleve a cabo en el rango dinámico del dispositivo de FACS). Para determinar el resultado deseado, sólo es relevante la señal de los marcadores unidos de manera específica, mientras que la parte restante de la señal medida es "ruido" o el denominado error de medición. Este error impide que la señal específica pueda medirse con más sensibilidad y en casos de baja intensidad de la señal específica y una intensidad relativamente alta del fondo, la señal específica puede "desaparecer" en el fondo, lo que conduce a resultados falsos negativos. Por tanto, la señal de fondo influye directamente en la sensibilidad de detección de la medición mediante citometría de flujo. Además, la señal de fondo también influye en la distinción entre muestras/poblaciones de células positivas y negativas, ya que los valores positivos y negativos medidos pueden volverse indistinguibles dependiendo de la señal de fondo.

Los principales motivos de los errores de medición son una alta señal de fondo y un pequeño rango dinámico del dispositivo de detección, altas señales de autofluorescencia de las células, unión inespecífica de los marcadores a la célula y variaciones que se producen durante el proceso de tinción (por ejemplo, diferentes concentraciones de marcador, etiquetado del marcador o condiciones de tinción). Aunque es deseable reducir las señales de fondo inespecíficas tanto como sea posible, los métodos basados en FACS sólo tienen un potencial limitado para reducir las señales de fondo. En principio, sólo es posible reducir la señal de fondo básica del dispositivo de FACS proporcionando un amplio rango de medición dinámico y evitando la acumulación de señales interferentes.

Para eliminar la señal de fondo del dispositivo de detección y la autofluorescencia de las células, los métodos conocidos en la actualidad usan normalmente una muestra de control en la que las células investigadas no se tratan con el reactivo de detección de fluorescencia. Sin embargo, este enfoque tiene varios inconvenientes, ya que al comparar dos poblaciones de células diferentes pueden producirse errores de medición adicionales. Esto se debe al hecho de que las poblaciones pueden diferir en su densidad, antigüedad, intensidad de expresión del marcador investigado, etc. Además, también la fluorescencia del material de muestra (aparte de las células) puede variar entre diferentes muestras debido a variaciones en sus procesos de fabricación o sus composiciones. Por último, y lo que es más significativo, el valor de la muestra de control es normalmente un valor promedio que se calcula basándose en una medición de la muestra de control y no tiene en cuenta las variaciones que existen entre las células individuales. Esto conduce a la situación de que se calibren frente al mismo valor promedio de muestra de control células que tienen una baja autofluorescencia y células que tienen una alta autofluorescencia, con el resultado de que las células que tienen una baja autofluorescencia son propensas a evaluarse como (falsos) negativos y es probable que las células que tienen una alta autofluorescencia se evalúen como (falsos) positivos. Como todo lo

65

anterior puede alterar significativamente la sensibilidad del método de detección, sería deseable disponer de métodos que superen los inconvenientes de los métodos existentes y permitan un análisis celular más sensible y fiable.

5 Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención satisfacer la necesidad anterior de un método de análisis celular más sensible y fiable proporcionando métodos para el análisis de células individuales que incluyen determinar la presencia y/o cantidad de una o más moléculas diana en una población de una pluralidad de células. La presente invención se basa en el principio de que se inmovilizan células intactas sobre un sustrato sólido y que la posición de cada célula individual sobre el sustrato sólido se determina (automáticamente) para permitir la identificación de la célula y la determinación de la señal (de fluorescencia) para dicha célula individual en más de un ciclo de detección de señales. Esto hace que sea posible usar una célula individual inmovilizada sobre el sustrato sólido para al menos dos mediciones de fluorescencia, realizándose la primera medición antes de que la célula se ponga en contacto con un reactivo de detección, por ejemplo, un anticuerpo marcado con etiqueta fluorescente. Esta primera medición proporciona un valor de señal de fondo para la célula individual, tal como su autofluorescencia, y también incluye la señal de fondo básica del dispositivo de detección usado, el sustrato, etc. En una segunda etapa de medición, la célula se pone en contacto en primer lugar con el reactivo de detección que se une a una molécula diana dada. Basándose en la posición determinada previamente de la célula sobre el sustrato sólido, la célula se identificará y la señal medida se calibra frente al valor de la señal de fondo individual obtenido en la primera medición, por ejemplo, simplemente restando el valor de la primera medición de fluorescencia del valor de la segunda medición. Esto permite un análisis de células individuales en el que cada señal de célula individual se calibra frente a su propia señal de fondo individual y, por tanto, permite una reducción significativa de los errores de medición que se observan normalmente en los métodos existentes. Por tanto, los métodos de la presente invención proporcionan señales de detección de fluorescencia mejoradas reduciendo la señal de fondo con una base de células individuales.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para el análisis de células individuales en una muestra de sangre mediante la determinación de la presencia y/o cantidad de una o más moléculas diana en una pluralidad de células, que comprende: (i) inmovilizar dicha pluralidad de células sobre un sólido sustrato, en el que las células se inmovilizan en forma de una monocapa y están preferiblemente separadas entre sí; (ii) determinar la posición de las células inmovilizadas individuales sobre el sustrato sólido; (iii) medir la autofluorescencia de las células inmovilizadas individuales; (iv) poner en contacto las células inmovilizadas con un primer reactivo de detección que comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una primera molécula diana y (b) una etiqueta fluorescente en condiciones que permiten la unión del reactivo de detección a la primera molécula diana; (v) medir la fluorescencia de la etiqueta fluorescente del reactivo de detección unido a la primera molécula diana para las células inmovilizadas individuales; (vi) determinar la presencia y/o cantidad de la primera molécula diana en las células inmovilizadas individuales comparando la fluorescencia medida en la etapa (v) con la fluorescencia medida en la etapa (iii) célula a célula; (vii) opcionalmente repetir las etapas (iv) a (vi) con un reactivo de detección segundo o adicional que comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una molécula diana segunda o adicional y (b) una etiqueta fluorescente.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considere junto con los ejemplos no limitativos y los dibujos adjuntos.

La figura 1 muestra la detección de fluorescencia de CD25. Se muestran los resultados para los valores con corrección (línea roja) o sin ella (línea azul) de la autofluorescencia.

50 Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han desarrollado métodos que permiten el análisis de una pluralidad de células con una base de célula a célula con una mayor sensibilidad. El análisis se logra normalmente mediante la detección de señales de fluorescencia de moléculas diana dadas en una célula, siendo las señales de fluorescencia medidas menos propensas a errores debidos al ruido de fondo y la autofluorescencia celular. Tal como se describió ya anteriormente, la sensibilidad aumentada se logra mediante una reducción del fondo y la autofluorescencia de las células mediante dos mediciones de fluorescencia independientes de la misma célula. La primera medición de las células se realiza antes de que las células se pongan en contacto con un reactivo de detección, tal como un anticuerpo con etiqueta fluorescente, para determinar la fluorescencia de cada célula individual en ausencia de un reactivo de detección. O bien de manera simultánea a esta primera medición o bien incluso antes de la misma, se determina la posición de cada una de las células analizadas sobre un soporte sólido, sobre el que se inmovilizan, y se almacenan los datos de posición para mediciones posteriores. La segunda medición se realiza después de que las células se hayan puesto en contacto con el reactivo de detección. Como la posición de cada célula individual, así como su señal de fluorescencia en ausencia del reactivo de detección, se registraron antes de la segunda medición, el valor medido con esta segunda medición puede corregirse por la fluorescencia innata de cada célula individual y el fondo en la posición de la célula, obteniéndose así una señal más específica para cada célula. Dicho de otro

modo, como las mediciones primera y segunda se toman para cada célula de manera independiente, los valores calculados representan datos corregidos individualmente. Esto es muy ventajoso ya que evita una calibración de la fluorescencia celular mediante un factor de corrección que se ha determinado basándose en una célula o muestra diferente y representa generalmente un valor promedio determinado basándose en una población de células diferente de la célula analizada. Además, a medida que las células se inmovilizan y se registra su posición, pueden someterse a múltiples ciclos de detección, por ejemplo de diferentes marcadores, de modo que pueda generarse un perfil de marcador celular mucho más específico para cada célula individual. Esto mejora enormemente la posibilidad de un análisis de células individuales fiable, ya que tiene en cuenta que incluso dentro de una población de células del mismo tipo de célula, pueden existir variaciones significativas con respecto a la autofluorescencia y la expresión de marcadores. Por consiguiente, pueden evitarse errores o resultados falsos que surgen de no usar la misma célula para las mediciones y pruebas de referencia.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para el análisis de células individuales en una muestra de sangre mediante la determinación de la presencia y/o cantidad de una o más moléculas diana en una pluralidad de células, que comprende: (i) inmovilizar dicha pluralidad de células sobre un sustrato sólido, en el que las células se inmovilizan en forma de una monocapa y están preferiblemente separadas entre sí; (ii) determinar la posición de las células inmovilizadas individuales sobre el sustrato sólido; (iii) medir la autofluorescencia de las células inmovilizadas individuales; (iv) poner en contacto las células inmovilizadas con un primer reactivo de detección que comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una primera molécula diana y (b) una etiqueta fluorescente en condiciones que permiten la unión del reactivo de detección a la primera molécula diana; (v) medir la fluorescencia de la etiqueta fluorescente del reactivo de detección unido a la primera molécula diana para las células inmovilizadas individuales; (vi) determinar la presencia y/o cantidad de la primera molécula diana en las células inmovilizadas individuales comparando la fluorescencia medida en la etapa (v) con la fluorescencia medida en la etapa (iii) célula a célula; (vii) opcionalmente repetir las etapas (iv) a (vi) con un reactivo de detección segundo o adicional que comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una molécula diana segunda o adicional y (b) una etiqueta fluorescente.

El término “análisis de células individuales”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al análisis de células individuales en una muestra que contiene una pluralidad de células, por ejemplo sometiendo a prueba cada célula individual para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de una molécula marcadora dada. El análisis puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de reactivos de detección con etiqueta específicos para una molécula marcadora de interés que se ponen en contacto con la célula en condiciones que permiten la unión del reactivo de detección a la molécula marcadora y luego se determina la presencia y la cantidad del reactivo de detección unido por medio de la etiqueta. Los métodos de detección usados habitualmente implican el uso de reactivos de detección con etiqueta fluorescente y la medición de la fluorescencia de la etiqueta unida.

“Determinar la presencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un análisis cualitativo, estableciendo normalmente un valor umbral para la señal determinada que se considera, cuando se alcanza o se supera, que es indicativo de la presencia de una molécula de interés. Por consiguiente, se considera que los valores de señal por debajo del valor umbral son indicativos de la ausencia de la molécula de interés. De manera similar, el término “determinar la cantidad”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un análisis cuantitativo, en el que se determina la intensidad de la señal, correspondiendo la intensidad de señal a la concentración local de la molécula marcadora. Por ejemplo, estos resultados cuantitativos pueden ser unidades relativas de fluorescencia que se han medido mediante la determinación de la señal de fluorescencia de etiquetas fluorescentes unidas a una molécula diana dada.

“Molécula diana”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula biológica que o bien está presente de manera natural en una célula o bien se ha introducido artificialmente en una célula. Una “molécula diana” puede ser cualquier molécula, normalmente una molécula orgánica, tal como un péptido, que incluye oligo y polipéptidos, así como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas o hidratos de carbono, así como híbridos de las moléculas mencionadas anteriormente, tales como proteínas glicosiladas. La molécula diana puede estar ubicada dentro de la célula, por ejemplo en el núcleo, nucleolo, citoplasma, mitocondrias, aparato de Golgi o retículo endoplásmico, o puede estar ubicada en o sobre la membrana celular. En diversas realizaciones, las moléculas diana cuya presencia y/o cantidad se determina en los métodos de la presente invención son polipéptidos. En diversas realizaciones, la molécula diana es una molécula de la superficie celular, es decir, una molécula que se une o se inserta en el lado exterior de la membrana celular y está expuesta al menos parcialmente al entorno celular.

En diversas realizaciones más preferidas, la “molécula diana” es un “biomarcador”, “molécula marcadora” o “marcador”. Los términos “biomarcador”, “molécula marcadora” y “marcador”, tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren generalmente a una molécula cuya presencia o cantidad puede determinarse y tiene valor informativo porque es indicativa de un tipo de célula, condición celular, estadio celular, etc. Dicha información puede ser, a su vez, indicativa o predictiva de una condición o un estado del organismo del que se obtuvo la célula.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polipéptido”, “proteína”, “péptido” se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos codificados y no codificados,

aminoácidos modificados o derivatizados química o bioquímicamente, y polipéptidos que tienen cadenas principales peptídicas modificadas. En la totalidad de la solicitud, se usará la notación convencional de una letra de los aminoácidos. Normalmente, el término “aminoácido” se referirá a “aminoácido proteínogénico”, es decir, aquellos aminoácidos que están presentes de manera natural en las proteínas. De la manera más particular, los aminoácidos están en la forma isomérica L, pero también se prevén D-aminoácidos. Las moléculas de polipéptido útiles como moléculas diana comprenden normalmente al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 300 o al menos 500 aminoácidos.

La idoneidad de la(s) diana(s) que va(n) a analizarse puede determinarse por el tipo y la naturaleza del análisis requerido para la muestra biológica. En algunas realizaciones, una diana puede proporcionar información sobre la presencia o ausencia de un analito en la muestra biológica. En otra realización, una diana puede proporcionar información sobre el estado de una muestra biológica. Por ejemplo, los métodos dados a conocer en el presente documento pueden usarse para detectar diana(s), lo que puede ayudar a comparar diferentes tipos de células o tejidos, comparar diferentes fases de desarrollo, detectar la presencia de una enfermedad o anomalía o determinar el tipo de enfermedad o anomalía.

Las dianas adecuadas ya se han enumerado anteriormente e incluyen uno o más de péptidos, proteínas, tales como antígenos, enzimas y receptores, ácidos nucleicos (por ejemplo, polinucleótidos, ADN, ARN o aptámeros), polisacáridos (por ejemplo, lectinas o azúcares) y lípidos. Una o más de las dianas mencionadas anteriormente pueden ser características de un tipo de célula particular, mientras que otras dianas pueden estar asociadas con una enfermedad o condición específica. En algunas realizaciones, las dianas en una muestra celular que pueden detectarse y analizarse usando los métodos dados a conocer en el presente documento pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas de la superficie celular, tales como receptores, por ejemplo receptores para hormonas o factores de crecimiento, y ligandos, en particular la familia CD (*cluster of differentiation*, grupo de diferenciación) de moléculas de la superficie celular, usada habitualmente para la inmunofenotipificación de células.

Los ejemplos de dianas de hormonas o receptores de hormonas incluyen, pero no se limitan a, gonadotropina coriónica humana (HCG, por sus siglas en inglés), hormona adrenocorticotrópica, antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés), receptor de estrógenos, receptor de progesterona, receptor de andrógenos, receptor del complemento gC1q-R/p33, receptor de IL-2, receptor de neurotrofina p75, receptor de PTH, receptor de hormona tiroidea y receptor de insulina.

Los ejemplos de dianas de células hematopoyéticas incluyen, pero no se limitan a, CD45, CD34, CD133, HLA-DR, CD115, CD116, CD117, CD33, CD38, CD90, CD71, Ki67, Flt3, CD163, CD45RA, CD3, IgD, CD105, CD45 y c-kit.

Los ejemplos de dianas de células linfoides incluyen, pero no se limitan a, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-antitripsina, CD19, CD20, bcl-2, bcl-6, BLA 36 (antígeno de linfocitos B de 36 kD), BMI (diana mielóide), BM2 (diana mielóide), galectina-3, granzima B, antígeno HLA de clase I, antígeno HLA de clase II (DP), antígeno HLA de clase II (DQ) y antígeno HLA de clase II (DR).

Los ejemplos de marcadores CD incluyen, pero no se limitan a, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3 delta, CD3 épsilon, CD3 gamma, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 alfa, CD8 beta, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CDw17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD44R, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CDw93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CDw109, CD114, CD115, CD116, CD117, CDw119, CD120a, CD120b, CD121a, CDw121b, CD122, CD123, CD124, CDw125, CD126, CD127, CDw128a, CDw128b, CD130, CDw131, CD132, CD134, CD135, CDw136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CDw150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 y TCR-zeta.

“Pluralidad de células”, tal como se usa en el presente documento, significa que se trata de más de una, concretamente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 células. En diversas realizaciones, una pluralidad de células comprende al menos 30, 50, 80, 100, 200, 500 ó 1000 células. En diversas realizaciones, las células analizadas en los métodos de la presente invención son células eucariotas. Las células eucariotas pueden ser células hematopoyéticas. El grupo de células hematopoyéticas en el sentido de la invención comprende células mieloides (eritrocitos, trombocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos, eosinófilos, basófilos, mastocitos) y células linfoides (células B, diversos tipos de células T, células NK). Aquellas células que no producen hemoglobina también se denominan leucocitos. Aquellas células que producen hemoglobina (glóbulos rojos) se denominan eritrocitos. Un término colectivo para las células implicadas en la respuesta inmunitaria es linfocitos.

El término “inmovilizar”, tal como se usa en el presente documento, significa que las células se fijan a un sustrato

dado de tal manera que ya no pueden moverse libremente y de manera más específica no pueden moverse de la posición en la que se inmovilizan. La inmovilización puede lograrse uniendo las células de manera específica o de manera inespecífica al sustrato sólido. A este respecto, el término “de manera inespecífica” significa que el material que se une a las células se une a las células sin ninguna distinción, es decir, sin ninguna forma de selección intencionada. Tal inmovilización inespecífica puede lograrse mediante varias estrategias diferentes, todas las cuales las conocen bien los expertos en la técnica. En diversas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento usan inmovilización inespecífica, preferiblemente inmovilización inespecífica no covalente. Tal inmovilización puede, por ejemplo, estar mediada por interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals o enlaces de hidrógeno. En realizaciones preferidas, tal como se describirá a continuación, la inmovilización se logra recubriendo el sustrato con moléculas cargadas negativamente que luego se unen a las células cargadas positivamente de manera predominante mediante interacciones electrostáticas.

Por el contrario, la “inmovilización específica” es una forma de inmovilización que es específica de una célula o de un tipo de célula. Esto puede lograrse recubriendo un sustrato con un reactivo de captura que tenga especificidad para un cierto tipo de célula, tal como anticuerpos. En este contexto, un “tipo de célula” se define como células que pueden distinguirse de otras células por su morfología o fenotipo.

En general, la inmovilización se logra preferiblemente mediante medios que permiten que las células mantengan su forma esencialmente esférica o elíptica en suspensión tras la inmovilización, es decir, esencialmente sin el “aplanamiento” de la forma de la célula que se observa a menudo. Esto es ventajoso para las siguientes etapas de determinación y obtención de imágenes de la posición de las células. Todas las técnicas descritas en el presente documento para la inmovilización celular permiten mantener las células en su forma esencialmente esférica o elíptica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sustrato sólido” significa un sustrato que es sólido en condiciones estándar (temperatura de aproximadamente 20°C y presión de aproximadamente 1013 mbar). Los sustratos sólidos de la presente invención pueden tener cualquier forma, incluidos sustratos que tienen al menos una superficie sustancialmente plana (por ejemplo, sustratos en forma de “portaobjetos”, “membrana” o “chip”) y sustratos que tienen una superficie curva (para ejemplo, sustratos en forma de perlas y sustratos en forma de tubo). Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la variedad de materiales, formas y tamaños de sustratos sólidos que se usan de manera rutinaria en la técnica. Normalmente, los sustratos sólidos usados en la presente invención son sustratos sólidos que son adecuados para inmovilizar células e incluyen cualquier sustrato sólido que se conoce en la técnica que es adecuado para tales propósitos. Los ejemplos, sin limitación, incluyen portaobjetos, viales, tubos y cartuchos.

El material de sustrato puede ser cualquier material adecuado, siendo los más habituales vidrio y plásticos, tales como polipropileno, policarbonato, poliacrilato, PET, y similares. Se entiende que el material de soporte es adecuado para el método de detección. Por ejemplo, para la detección de fluorescencia se requiere normalmente que el material sea transmisor de luz de una longitud de onda dada para permitir la excitación de la etiqueta y la detección de la fluorescencia emitida.

El término “monocapa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una capa de células en la que esencialmente ninguna célula está situada encima de otra. En diversas realizaciones, esto significa que las células estén distribuidas de manera bidimensional sobre una superficie (normalmente plana). Como la inmovilización se logra normalmente mediante la interacción con el sustrato sólido, la formación de la monocapa puede lograrse bloqueando o inhibiendo las interacciones intercelulares mientras que al mismo tiempo se fomentan interacciones célula-superficie. “Separadas entre sí”, tal como se usa en el presente documento, significa que las células individuales que se inmovilizan sobre la misma superficie no entran en contacto directamente entre sí. La distancia entre dos células puede expresarse en veces del diámetro promedio de las células, para células esencialmente redondas, o la extensión promedio en la mayor dimensión, en el caso de formas de células alargadas. En diversas realizaciones, la distancia entre dos células es al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 ó 1,0 veces el diámetro promedio o la extensión promedio. La separación de las células inmovilizadas sobre un sustrato puede verse influida por la concentración de células en la muestra que se pone en contacto con el sustrato. En diversas realizaciones de la presente invención, las muestras se diluyen de tal manera que contengan como máximo 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ó 10^2 células por ml. La orientación de la monocapa así como la separación de las células permite determinar y registrar la posición de cada célula individual.

“Determinación de la posición”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso en el que se determina la posición de células individuales inmovilizadas sobre un soporte sólido con respecto a un punto de referencia en el soporte sólido o entre sí. Este proceso está automatizado preferiblemente y se basa en un programa informático que puede reconocer las células y asigna un identificador de posición a cada célula. Una vez que se completa este proceso se registra la información de posición para que cada célula quede claramente identificada en cualquier momento en que se analice dicho soporte sólido. Como la información de posición se registra con respecto a un punto de referencia o con respecto a todas las demás células, cada célula individual puede volver a identificarse fácilmente aunque el soporte sólido se gire, se volteee, etc. Esto permite el análisis de la misma célula individual varias veces. En diversas realizaciones, la determinación de la posición se basa en una imagen inicial que

se toma de una población dada de células inmovilizadas. Esta imagen inicial se usa como referencia en otras mediciones de la misma población de células. En diversas realizaciones, los programas de software informático pueden hacer coincidir la misma célula en la imagen inicial y en imágenes adicionales. Tal como se indicó anteriormente, se usa un punto de referencia en el sustrato sólido o las posiciones relativas de las células entre sí para la nueva identificación de cada célula. La fecha de posición puede almacenarse en un medio de almacenamiento de datos, de tal manera que pueda recuperarse fácilmente para mediciones posteriores. Están disponibles comercialmente software y dispositivos que permiten la determinación, el almacenamiento y la recuperación de información de posición de células en cultivo. En diversas realizaciones, sin limitación adicional, el dispositivo usado para la determinación de la posición de las células es una platina de microscopio asistida por ordenador. La información de posición puede almacenarse, por ejemplo, mediante la determinación/el cálculo de las coordenadas, por ejemplo coordenadas x/y, del centro de cada célula y almacenando dichos datos de coordenadas así como el tamaño de la célula.

En diversas realizaciones, el posicionamiento de las células se determina de manera automatizada usando un microscopio óptico en modo de transmisión. Para lograr esto, en primer lugar se determina el plano focal, seguido de la registración de al menos dos imágenes de cada célula, en las que una imagen puede tomarse en el plano focal y la otra ligeramente fuera de foco o ambas se toman fuera de foco. En diversas realizaciones, se registran varias imágenes que están ligeramente fuera de foco. Los intervalos típicos para imágenes fuera de foco van desde el plano focal $\pm 100 \mu\text{m}$. Se ha encontrado que es particularmente ventajoso que se tomen dos o más imágenes ligeramente fuera de foco, por ejemplo, una primera imagen en un plano que está cerca del plano focal, por ejemplo ± 5 o $\pm 10 \mu\text{m}$, y una segunda imagen más alejada del plano focal, por ejemplo ± 20 - $50 \mu\text{m}$. En una realización, la primera imagen se toma $+5 \mu\text{m}$ fuera de foco y la segunda $+40 \mu\text{m}$ fuera de foco. En otra realización, la primera imagen se toma $-1 \mu\text{m}$ fuera de foco y la segunda $+10 \mu\text{m}$ fuera de foco. En general, esta técnica es ventajosa, ya que las imágenes fuera de foco hacen más nítido el contorno de la célula. Superponiendo dichas imágenes, las formas redondas de las células individuales pueden identificarse fácilmente de manera automatizada usando un programa de software adaptado de manera específica. Dicho método específico de identificación de células y registro de su posición de manera automatizada mediante microscopía (de transmisión) de luz, usando dos o más imágenes de la misma configuración de células inmovilizadas en un soporte sólido registradas en diferentes planos focal/(fuera de foco), registrándose una imagen en el plano focal y registrándose la(s) otra(s) imagen/imágenes ligeramente fuera de foco o registrándose ambas ligeramente fuera de foco, y luego superponiendo dichas imágenes para identificar formas celulares y así determinar la posición de las células individuales en relación con un punto de referencia o entre sí es otro aspecto de la presente invención. Aunque esta técnica se usa en el presente documento en relación con la microscopía de fluorescencia para la detección de objetivos, se entiende que su uso no se limita a ello, sino que puede expandirse fácilmente a otras técnicas en las que el registro de la posición de las células inmovilizadas es útil o necesario.

El término "medición" o "medir", tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refiere a la determinación de una señal, que incluye normalmente la cuantificación de señales detectadas. Las señales medidas son preferiblemente señales de fluorescencia. La señal de fluorescencia medida incluye la autofluorescencia de las células, la fluorescencia de fondo, si la hubiera, y, dependiendo de la etapa, la fluorescencia real del reactivo de detección. El término "autofluorescencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la fluorescencia natural de células y estructuras biológicas celulares, tales como mitocondrias, lisosomas y otros orgánulos celulares, y se usa para distinguir esta fluorescencia innata de la célula de la fluorescencia que se origina por marcadores fluorescentes añadidos artificialmente (fluoróforos). Como la autofluorescencia y la fluorescencia de marcadores se miden para cada célula individualmente, es posible corregir las señales a nivel de célula individual y así lograr una medición mucho más sensible y fiable.

"Poner en contacto", tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a proporcionar acceso de un componente, reactivo, analito o muestra a otro e incluye disolver, mezclar, suspender, agitar, o combinaciones de los mismos.

Por el término "reactivo de detección", tal como se usa en el presente documento, se entiende cualquier molécula, o complejo de moléculas, con una afinidad de unión específica por un analito de interés que permite la detección del mismo mediante un método de detección dado. En algunas realizaciones, el reactivo de detección puede ser un conjugado de un resto de unión a la diana y una etiqueta, tal como un colorante fluorescente o un fluoróforo. El reactivo de detección se usa para detectar la presencia o ausencia de una molécula diana. Los reactivos de detección, en particular sus restos de unión a la diana, incluyen pero no se limitan a, ácidos nucleicos, moléculas sensoras de ácidos nucleicos, aptámeros, anticuerpos, péptidos combinatorios, proteínas combinatorias y moléculas pequeñas. En diversas realizaciones de la invención, el reactivo de detección es un anticuerpo conjugado con una etiqueta, tal como un fluoróforo. Por "reactivo de detección fluorescente", tal como se usa en el presente documento, se entiende cualquier reactivo de detección que presente propiedades fluorescentes, porque o bien el resto de unión a la diana en sí mismo es fluorescente o bien porque está conjugado con un colorante fluorescente. Dependiendo de la estructura molecular del reactivo de detección, los colorantes fluorescentes pueden conjugarse con la parte de unión a la diana mediante diferentes grupos funcionales. Los grupos funcionales adecuados para la conjugación incluyen, pero no se limitan a, grupos amino, grupos carboxilo, grupos maleimida, grupos oxo y grupos tiol. Por ejemplo, pueden unirse colorantes fluorescentes que contienen grupos amino a reactivos de detección que

contienen grupos amino usando agentes de reticulación conocidos en la técnica.

El reactivo de detección es preferiblemente específico para una diana dada. “Específico”, tal como se usa en este contexto, significa que preferiblemente se une a la diana sobre otras moléculas no diana. La unión preferida puede significar que se une con al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 1000 veces mayor afinidad, tal como se mide, por ejemplo, mediante K_d , a su diana en comparación con otras moléculas estructuralmente no relacionadas que también pueden estar presentes en la muestra o la célula, pero no significa necesariamente que la afinidad sea alta. Sin embargo, la afinidad del reactivo de detección por la diana es lo suficientemente alta como para permitir la detección en las condiciones de medición. Esto puede significar, por ejemplo, que la afinidad (K_d) del reactivo de detección por la diana es de 1 μ M o menos, preferiblemente 0,1 μ M o menos, más preferiblemente 10 nM o menos, tal como se determina, por ejemplo, mediante calorimetría de valoración isotérmica, resonancia de plasmón superficial u otros métodos adecuados para mediciones de afinidad.

Los fluoróforos útiles como etiquetas fluorescentes pueden ser o bien fluoróforos de “molécula pequeña” o bien fluoróforos proteicos (por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes y todas sus variantes). Los fluoróforos de molécula pequeña adecuados incluyen, pero no se limitan a, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), BODIPY FL, cumarina, Cy5, dansil-glicina, EDANS, fluoresceína, TAMRA, Texas Red® (TR). Los colorantes ópticos adecuados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el 1996 Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

En diversas realizaciones, el colorante fluorescente puede ser una proteína fluorescente tal como una proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés; Chalfie, *et al.*, Science 263 (5148): 802-805 (11 de febrero de 1994); y EGFP; Clontech – número de registro de Genbank U55762), proteína azul fluorescente (BFP, por sus siglas en inglés; 1. Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal (Quebec) Canadá H3H 1J9; 2. Stauber, R. H. Biotechniques 24(3):462-471 (1998); 3. Heim, R. y Tsien, R. Y. Curr. Biol. 6: 178-182 (1996)), proteína cian fluorescente (CFP, por sus siglas en inglés) y proteína amarilla fluorescente mejorada (EYFP, por sus siglas en inglés; 1. Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303).

En diversas otras realizaciones, el colorante fluorescente puede ser una partícula de nanocrystal semiconductor fluorescente, o un punto cuántico, tal como los que pueden obtenerse de Life Technologies Corporation (Carlsbad, EE.UU.).

Tal como se detalló anteriormente, en diversas realizaciones de la invención, las moléculas fluorescentes (fluoróforos) pueden conjugarse con restos de unión a la diana para formar reactivos de detección. Los fluoróforos pueden activarse (excitarse) mediante la luz de un instrumento de detección y emitir luz de una longitud de onda diferente. Dado que los reactivos de detección se unen a dianas en o sobre las células, la cantidad de luz detectada de los fluoróforos corresponde al número de dianas en o sobre una célula dada.

Dependiendo del tipo de reactivos de detección usados, puede ser posible usar varios reactivos de detección, por ejemplo, varios reactivos de detección fluorescentes, simultáneamente, ya que las células se ponen en contacto con estos reactivos de detección de manera simultánea o sucesiva y luego los diferentes reactivos de detección se detectan por separado., por ejemplo, en el caso de que se utilicen diferentes fluoróforos para los diferentes reactivos de detección, midiendo la fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Se prefiere que las etiquetas de los diferentes reactivos de detección sean lo suficientemente diferentes como para permitir la distinción al medir sus señales respectivas. En el caso de los fluoróforos, esto puede significar que su emitancia máxima sea lo suficientemente diferente de la de otros fluoróforos usados.

El término “comparar la fluorescencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la comparación de la fluorescencia de una célula dada determinada antes de que las células se hayan tratado con el reactivo de detección (es decir, su autofluorescencia y fluorescencia de fondo) y los datos de fluorescencia determinados en las mediciones de la misma célula habiéndose puesto en contacto dicha célula con un reactivo de detección. La comparación puede tener lugar, preferiblemente de manera automatizada, porque la autofluorescencia determinada de la célula respectiva y la señal de fondo se restan del valor de medición real para proporcionar un valor corregido que sea representativo de la cantidad de reactivo de detección unido a dicho célula y, por tanto, representativo a su vez de la cantidad/concentración de moléculas diana presentes sobre o en dicha célula. La comparación puede llevarse a cabo por píxeles, es decir, mediante la resta de los valores de fluorescencia por píxeles. Alternativamente, para cada imagen de fluorescencia, los valores de fluorescencia respectivos pueden calcularse primero y luego restarse entre sí. Por consiguiente, el término “una base de célula a célula”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a esta fluorescencia calculada individualmente de una célula dada que se ha corregido mediante su propia autofluorescencia y fondo individuales.

Es importante señalar que dicha comparación de los valores de fluorescencia obtenidos para la autofluorescencia de las células y los obtenidos a partir de la obtención de imágenes de microscopía de fluorescencia reales de los marcadores diana que van a analizarse es claramente distinta del método dado a conocer previamente de corrección de fondo local que no compara de manera específica la fluorescencia de las células antes y después de la tinción, así como las técnicas que usan múltiples imágenes para corregir la inhomogeneidad local de iluminación.

5 Sin embargo, la presente invención también incluye realizaciones en las que las inhomogeneidades de iluminación se corrigen dentro de una medición, por ejemplo, la medición de fondo, la medición real (de marcador) o ambas, normalizando los valores individuales (posiciones) en una configuración unos frente a otros, normalmente frente al primer valor (posición) determinado. Por tanto, se obtiene una imagen que ya se ha corregido para las inhomogeneidades de iluminación en cada una de ambas configuraciones, es decir, la determinación de la autofluorescencia y la medición de la fluorescencia real, y luego puede usarse tal como se describió anteriormente.

10 Los datos de fluorescencia de cada célula pueden registrarse y almacenarse junto con la información de posición. Por ejemplo, es posible almacenar dichos datos en formato de modo lista. Para un análisis adicional, puede realizarse una separación en ventanas ("gating") multivariante manualmente y/o cada célula puede agruparse mediante agrupación jerárquica, comparándose los grupos resultantes con un modelo citometría-ontología con el propósito de identificación celular, captura de conocimiento y estructuración.

15 En diversas realizaciones, el método de la presente invención comprende además una etapa de blanquear el reactivo de detección, extinguir la señal del reactivo de detección o retirar el reactivo de detección después de la etapa (vi) y antes del siguiente ciclo de detección. "Blanqueamiento" o "fotoblanqueo", tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refiere a la alteración fotoquímica de una etiqueta, normalmente un colorante o una molécula de fluoróforo, de tal manera que pierde de manera permanente su capacidad para proporcionar una señal detectable, por ejemplo fluorescer. Esto puede lograrse mediante la exposición a la luz de una longitud de onda e intensidad definidas durante un periodo de tiempo suficiente para fotoblanquear la etiqueta. Otras opciones para inactivar la etiqueta son escindir el enlace entre el resto de unión a la diana y la etiqueta o inhibir las propiedades de señalización de la etiqueta mediante el uso de un inhibidor, tal como una molécula extintora.

25 El fotoblanqueo también puede usarse antes de la etapa de poner en contacto las células con el reactivo de detección, por ejemplo, para extinguir la autofluorescencia. Esto puede ayudar a mejorar la relación señal/ruido. Esto se realiza o bien antes de que se determine la autofluorescencia o bien se repite la medición de la autofluorescencia antes de la medición real del reactivo de detección. En diversas realizaciones, el fotoblanqueo se lleva a cabo con láser.

30 "Extinción", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proceso que disminuya la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. Una variedad de procesos pueden dar como resultado extinción, tales como reacciones en estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos y extinción por colisión. Como consecuencia, la extinción depende a menudo en gran medida de la presión y la temperatura. El oxígeno molecular, los iones yoduro y la acrilamida son extintores químicos habituales.

35 En diversas realizaciones, los reactivos de detección se retiran antes del siguiente ciclo de detección. Esto significa generalmente que la molécula de detección se libera de su molécula diana. La liberación puede lograrse mediante una pluralidad de ciclos de lavado, valoración externa de la molécula de detección con agentes de unión a molécula de detección que compiten por la unión a la diana o una combinación de ambos, lavado y valoración externa. Alternativamente, si la molécula de detección es un conjugado de una parte de unión a la diana y una etiqueta, la etiqueta puede separarse por escisión del resto de la molécula. Los conjugados de anticuerpos escindibles adecuados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO2010/070037.

40 Tal como se describió ya anteriormente, en diversas realizaciones, el método de la presente invención comprende una etapa de blanquear las células inmovilizadas antes de las etapas (iii) - (vii) para reducir la autofluorescencia de las células.

45 En diversas realizaciones de la invención, las etapas (iv) a (vi) se repiten 1-50 veces, preferiblemente 2-20 veces, más preferiblemente 4-10 veces. En cada uno de estos ciclos puede usarse un reactivo de detección con especificidad por un marcador diferente, de tal manera que cada célula se caracteriza con respecto a un panel de marcadores que se detectan y cuantifican. Esto permite, por ejemplo, someter a inmunofenotipificación células individuales. La ventaja de un método de este tipo en comparación con los métodos de FACS conocidos es que se analiza la misma célula para detectar la presencia y concentración de diferentes marcadores y que el número de marcadores que pueden determinarse no está limitado, en principio, ya que no es necesario que la medición sea simultáneamente (mediante el uso de diferentes etiquetas y canales) pero puede realizarse sucesivamente. Incluso es posible almacenar el sustrato con las células inmovilizadas después de una medición y repetir la misma medición o realizar otras mediciones en un momento posterior. Esta es otra ventaja importante sobre las técnicas de FACS existentes en las que las células se descartan normalmente después de un ciclo de medición y no es posible la identificación de una célula individual después de la medición.

50 En diversas realizaciones de la invención, las células se inmovilizan de manera inespecífica sobre un sustrato sólido, preferiblemente funcionalizando la superficie del sustrato sólido con grupos funcionales cargados negativamente, antes de poner en contacto una muestra que contiene células con la superficie del sustrato sólido funcionalizado.

Esto puede lograrse mediante un tratamiento químico o físico de la superficie para alterar su química. En una realización preferida, se usan ácidos o bases para tal modificación. En una realización, cuando el sustrato es un sustrato de vidrio, el sustrato se trata en primer lugar con ácido fluorhídrico (HF) y luego con un alcohol, tal como etanol. Es posible realizar varias etapas de lavado antes, entre y después de las etapas de funcionalización, preferiblemente con agua o un tampón adecuado. Se ha encontrado que una superficie de sustrato tratada así puede inmovilizar células de manera muy eficiente y al mismo tiempo permite que las células mantengan la forma esférica o elíptica, es decir, esencialmente sin aplanamiento de las células. Alternativamente, la superficie del sustrato sólido puede funcionalizarse con una molécula de unión a células adecuada, preferiblemente una biomolécula o un polímero aniónico, y poner en contacto una muestra que contiene células con la superficie del sustrato sólido funcionalizado. El término "molécula de unión a células", tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas que pueden unirse a la superficie de una célula. Estas moléculas pueden unirse, sin limitación, a proteínas de la membrana celular, hidratos de carbono que modifican las proteínas de la membrana, otras moléculas que modifican las proteínas de la membrana o la propia membrana lipídica. La adhesión celular, es decir, la unión de una célula a una superficie o un sustrato, puede estar mediada por las denominadas moléculas de adhesión celular. Los ejemplos de estas moléculas de proteína incluyen selectinas, integrinas y cadherinas. En realizaciones preferidas, las moléculas de unión a células son biomoléculas o polímeros aniónicos. Las biomoléculas/polímeros aniónicos preferidos usados en los métodos de la presente invención son ácidos nucleicos, más preferiblemente ADN. Por tanto, en diversas realizaciones, la superficie del sustrato sólido se funcionaliza con moléculas de ADN. Cabe señalar que la composición de bases real de la molécula de ácido nucleico no tiene importancia esencialmente para la funcionalidad deseada, sino que la capacidad de unión depende de su estructura general y de la carga neta negativa. Las moléculas de ADN preferidas de la presente invención tienen una secuencia de bases aleatoria o arbitraria y una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 150 ó 200 bases. Sin embargo, para evitar la formación de estructuras secundarias, puede ser preferible usar homopolímeros de sólo un tipo de nucleótido. En algunas realizaciones de la invención, las moléculas de ADN pueden modificarse, por ejemplo, en su estructura principal. Tales modificaciones pueden servir para aumentar la estabilidad de las moléculas de ADN o aumentar la carga neta de las mismas.

En diversas realizaciones, el sustrato sólido presenta al menos parcialmente transmisión óptica para la luz de la longitud de onda de excitación y/o emisión para permitir la excitación del fluoróforo y la detección de la luz emitida. "Presenta parcialmente transmisión óptica" significa, por tanto, que una parte definida del sustrato sólido sobre el que se inmovilizan las células presenta suficiente transmisión como para que la luz de la longitud de onda relevante permita mediciones de fluorescencia.

En diversas realizaciones, el soporte sólido forma parte de un dispositivo que presenta al menos parcialmente transmisión óptica para permitir la detección de fluorescencia y tiene una abertura de entrada y de salida para permitir el paso de un medio fluido. Preferiblemente, el dispositivo es un dispositivo tal como se describe en la publicación de patente internacional WO 2010/049430 A1. El dispositivo puede tener la forma de un cartucho cerrado que tiene dichas aberturas de entrada y de salida para la carga de las células, la puesta en contacto con el reactivo de detección, diversas etapas de lavado y similares. En diversas realizaciones, el soporte sólido es un sustrato portador sustancialmente plano que forma un canal junto con dos elementos separadores dispuestos sobre el sustrato portador y un recubrimiento superior que se extiende paralelo al sustrato portador está separado del mismo por medio de los elementos separadores. Todos estos elementos pueden estar conectados (fijados de manera permanente) entre sí y partes del sustrato portador y el recubrimiento superior que son paralelos entre sí pueden presentar transmisión óptica para permitir el análisis de las células inmovilizadas sobre el sustrato portador. Los elementos separadores pueden diseñarse y disponerse de tal manera que definan un canal que conecta al menos una abertura de entrada y al menos una de salida, estando la entrada y/o salida dispuestas cada una en el sustrato portador o el recubrimiento superior o entre ambos en un elemento separador. El canal puede tener el mismo diámetro que la abertura de entrada y/o de salida en sus extremos, aumentando el diámetro desde cada extremo hacia el centro entre la entrada y la salida para permitir el flujo sin burbujas de una muestra o medio líquido hacia y a través del "cartucho".

"Medio fluido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier líquido que se usa en relación con los métodos descritos en el presente documento e incluye las muestras que contienen las células, normalmente en suspensión en un medio o tampón o en forma de un líquido biológico, tal como sangre, orina, saliva y similares, disoluciones líquidas de los reactivos de detección, disoluciones de lavado, y similares. El medio fluido también puede ser un medio diseñado para soportar el crecimiento de células.

En diversas realizaciones en las que el soporte sólido forma parte de un dispositivo cerrado tal como se describió anteriormente, las etapas de inmovilizar las células, poner en contacto las células con reactivos de detección y etapas opcionales tales como fijar las células, permear las células, lavar las células, etc. se llevan a cabo suministrando un medio fluido que comprende los respectivos agentes activos requeridos a través de la entrada a las células y retirándolo de nuevo por medio de la salida. El contacto puede tener lugar mediante una alimentación continua del medio líquido respectivo a través del dispositivo mediante las aberturas de entrada y de salida.

En diversas realizaciones, las etapas (ii) - (vii) del método de la presente invención están automatizadas. "Automatizado" en este sentido significa que las etapas enumeradas se controlan u operan mediante el uso de

máquinas, ordenadores, etc., y no requieren la intervención real del personal de laboratorio.

En diversas realizaciones, la etapa (iii) se repite con cada ciclo de detección. Esto puede permitir compensar las variaciones en la autofluorescencia de las células, por ejemplo provocadas por una exposición prolongada a la luz u otros factores, corrigiendo cada medición mediante una medición de referencia realizada antes de la medición real pero después de una medición previa del reactivo de detección.

Tal como también se describió anteriormente, en diversas realizaciones, la etapa (iv) comprende poner en contacto las células inmovilizadas con una pluralidad de reactivos de detección, cada uno de los cuales comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una molécula diana y (b) una etiqueta fluorescente, en la que los reactivos de detección difieren con respecto al resto de unión a la diana y a la etiqueta fluorescente, en condiciones que permiten la unión de los reactivos de detección a sus moléculas diana y en la que las etapas (v) y (vi) se repiten para cada par de reactivo de detección/molécula diana. Se entiende que en tales realizaciones los reactivos de detección o al menos las etiquetas contenidas en los mismos tienen que diferir lo suficiente como para permitir la distinción entre los diferentes reactivos de detección, tal como también se describió con más detalle anteriormente.

Aunque pueden analizarse células vivas en los métodos de la invención, en diversas realizaciones de la invención, las células inmovilizadas se desnaturalizan, preferiblemente mediante tratamiento con formalina. El término "formalina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una disolución de formaldehído en agua, normalmente a una concentración del 2-10% en peso, preferiblemente el 4-8% en peso, usada ampliamente en aplicaciones histológicas para desnaturalizar y fijar células y tejidos e incluso órganos completos. "Desnaturalizar", tal como se usa en el presente documento, se refiere principalmente a la fijación de las células. La fijación pone fin a cualquier reacción bioquímica en curso y también puede aumentar la resistencia mecánica o la estabilidad de las células tratadas. La desnaturalización puede incluir además la permeabilización de las células para asegurar el libre acceso del reactivo de detección a su molécula diana, si esta última está ubicada dentro de la célula. Para la permeabilización pueden usarse disolventes orgánicos, tales como metanol y acetona, y detergentes tales como saponina, Triton X-100 y Tween-20.

Las células inmovilizadas se almacenan preferiblemente en condiciones que inhiben cualquier proceso biológico y bioquímico en las células, tal como cualquier reacción metabólica, y que también previenen, al menos en cierta medida, la degradación del material celular.

En otras diversas realizaciones de la invención, la etapa de determinar la posición de las células inmovilizadas individuales se lleva a cabo usando un microscopio óptico de luz o se combina con la etapa de determinar la autofluorescencia de las células inmovilizadas individuales.

En diversas realizaciones, el método de la presente invención puede ponerse en práctica basándose en la metodología de citometría en chip (Henning, C. *et al.* (2008), Cytometry Parte A, Volumen 75A, Número 4). Sin limitación adicional, el método para el análisis de células individuales en una muestra de sangre mediante la determinación de la presencia y/o la cantidad de una o más moléculas diana puede usar chips microfluídicos ZellSafe (Zellkraftwerk GmbH, Leipzig, Alemania) que contienen superficies adhesivas a células, por ejemplo para inmovilizar células hematopoyéticas primarias humanas o de ratón. Después de la adhesión a los chips, las células pueden fijarse con paraformaldehído tamponado con PBS para un almacenamiento a largo plazo. Los chips pueden (volver a) analizarse para determinar la expresión de biomarcadores y la pérdida/cambios celulares de la composición del tipo de célula mediante citometría en chip.

Para detectar las señales de fluorescencia de las células investigadas, pueden usarse microscopios de fluorescencia disponibles comercialmente, tales como el Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania). Para el registro de posición y el reconocimiento de células, pueden usarse ordenadores y componentes de software específicos, todos los cuales están disponibles fácilmente en el campo o podrían obtenerse por los expertos en la técnica por medios conocidos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de una señal de fluorescencia de CD 25 con o sin corrección de autofluorescencia

Se inmovilizaron células mononucleares de sangre periférica humana que contenían células altamente autofluorescentes en chips microfluídicos ZellSafe (Zellkraftwerk GmbH, Leipzig, Alemania) y se trataron tal como se describe en Hennig *et al.* (Hennig, C. *et al.* (2008), Cytometry Parte A, Volumen 75A, Número 4). Se registraron señales de fluorescencia con el instrumento ZellScanner ONE (Zellkraftwerk GmbH, Leipzig, Alemania). Se midió la fluorescencia de las células antes de cada tratamiento con la molécula de detección para determinar la señal de fondo de autofluorescencia de cada célula. Después del tratamiento con las moléculas de detección (CD19 y CD3, respectivamente), se volvió a medir el chip. La figura 1a muestra un recorte de una imagen que contiene células antes del tratamiento con la molécula de detección (por tanto, todas las señales visibles son de autofluorescencia). Las figuras 1b y 1c muestran el mismo recorte después de la tinción con la molécula de detección 1 (CD19) y la

5 molécula de detección 2 (CD3), respectivamente. La generación de gráficos de puntos de datos de citometría a partir de estas células SIN corrección de autofluorescencia (figura 1d) generará una población de células con falso positivo (P1), lo que reduce en gran medida la relación señal/fondo para el marcador 1 (CD19) y 2 (CD3). La figura 1e muestra que la aplicación del método descrito en el presente documento de corrección de autofluorescencia mejora significativamente la relación señal-fondo midiendo únicamente la verdadera señal que evoluciona a partir del tratamiento con la molécula de detección.

REIVINDICACIONES

1. Método para el análisis de células individuales en una muestra de sangre mediante la determinación de la presencia y/o cantidad de una o más moléculas diana en una pluralidad de células, que comprende:
 - (i) inmovilizar dicha pluralidad de células sobre un sustrato sólido, en el que las células se inmovilizan en forma de una monocapa y están preferiblemente separadas entre sí;
 - (ii) determinar la posición de las células inmovilizadas individuales sobre el sustrato sólido;
 - (iii) medir la autofluorescencia de las células inmovilizadas individuales;
 - (iv) poner en contacto las células inmovilizadas con un primer reactivo de detección que comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una primera molécula diana y (b) una etiqueta fluorescente en condiciones que permiten la unión del reactivo de detección a la primera molécula diana;
 - (v) medir la fluorescencia de la etiqueta fluorescente del reactivo de detección unido a la primera molécula diana para las células inmovilizadas individuales;
 - (vi) determinar la presencia y/o cantidad de la primera molécula diana en las células inmovilizadas individuales comparando la fluorescencia medida en la etapa (v) con la fluorescencia medida en la etapa (iii) célula a célula;
 - (vii) opcionalmente repetir las etapas (iv) a (vi) con un reactivo de detección segundo o adicional que comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una molécula diana segunda o adicional y (b) una etiqueta fluorescente.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende además una etapa de blanquear el reactivo de detección, extinguir la señal del reactivo de detección, o retirar el reactivo de detección después de la etapa (vi) y antes del siguiente ciclo de detección.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el método comprende una etapa de blanquear las células inmovilizadas antes de las etapas (iii) - (vii) para reducir la autofluorescencia de las células.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células son células eucariotas, preferiblemente células hematopoyéticas.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las moléculas diana son moléculas polipeptídicas.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el reactivo de detección es un conjugado de anticuerpo.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas (iv) a (vi) se repiten 1 a 50 veces, preferiblemente 2-20 veces, más preferiblemente 4-10 veces.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células se inmovilizan de manera inespecífica sobre un sustrato sólido, preferiblemente funcionalizando la superficie del sustrato sólido con una molécula de unión celular adecuada, preferiblemente una biomolécula o polímero aniónico, y poniendo en contacto una muestra que contiene células con la superficie del sustrato sólido funcionalizado.
9. Método según la reivindicación 8, en el que la superficie del sustrato sólido se funcionaliza con moléculas de ADN.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato sólido forma parte de un dispositivo que presenta al menos parcialmente transmisión óptica para permitir la detección de fluorescencia y tiene una abertura de entrada y de salida para permitir el paso de un medio fluido.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas (ii) - (vii) están automatizadas.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (iii) se repite con cada ciclo de detección.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa (iv) comprende poner en contacto las células inmovilizadas con una pluralidad de reactivos de detección, cada uno de los cuales

comprende (a) un resto que reconoce y se une de manera específica a una molécula diana y (b) una etiqueta fluorescente, en el que los reactivos de detección difieren con respecto al resto de unión a la diana y el marcador fluorescente, en condiciones que permiten la unión de los reactivos de detección a sus moléculas diana y en el que las etapas (v) y (vi) se repiten para cada par de reactivo de detección/molécula diana.

- 5
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células inmovilizadas se desnaturalizan, preferiblemente mediante tratamiento con formalina.
- 10
15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de determinar la posición de las células inmovilizadas individuales se lleva a cabo usando un microscopio óptico de luz o se combina con la etapa de determinar la autofluorescencia de las células inmovilizadas individuales.

Figura 1

