



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 035**

51 Int. Cl.:
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841854 .0**
96 Fecha de presentación : **05.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1963859**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Método de discriminación de al menos dos poblaciones celulares y aplicación.**

30 Prioridad: **20.12.2005 FR 05 12948**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2011

73 Titular/es: **HORIBA ABX S.A.S.**
rue du Caducée Parc Euromédecine
F-34000 Montpellier, FR

72 Inventor/es: **Lacombe, Francis;**
Belloc, Francis;
Veriac, Sylvie y
Lefevre, Didier

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 035 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

La presente invención se refiere a un método de detección, de discriminación y de recuento de elementos biológicos presentes en un líquido, que utiliza los principios de la citometría de flujo, adaptable a los aparatos utilizados rutinariamente en hematología.

5 Los analizadores automáticos en hematología (autómatas de hematología), presentes en el mercado aportan cada vez más posibilidades de análisis y de clasificación de los elementos analizados.

10 La medida de la fluorescencia, ya ampliamente extendida en la citometría de flujo, se utiliza principalmente para la clasificación de los elementos por inmunofenotipado. En los autómatas de hematología utilizados rutinariamente, está dedicada sobre todo a poner en evidencia los colorantes supravitales utilizados como sondas moleculares para la cuantificación de los ácidos nucleicos u otros componentes celulares.

La utilización de sondas inmunológicas en hematología de rutina no está generalizada todavía aunque algunos ensayos embrionarios ya han visto la luz para diferentes constructores.

15 Por ejemplo, la sociedad BAYER (Bayer Diagnostics, Tarrytown, New York, USA), a través de BAYER-TECHNICON H*1 ha sido la primera en proponer, en la tipificación linfocitaria, la utilización de cócteles de anticuerpos para la determinación de los diferentes tipos de linfocitos. En este caso, la medida de las expresiones antigénicas no se haría por fluorescencia sino por la medida de la absorbancia luminosa generada por un compuesto de avidina-peroxidasa que presenta una gran afinidad para la biotina, acoplada ella misma sobre un anticuerpo. Dicho anticuerpo es específico de los antígenos
20 objetivos de las moléculas de superficie específicas de los tipos celulares caracterizados (CD4, CD8, CD2, CD19).

25 El ABBOTT CD4000, de la sociedad ABBOTT (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA), propone un análisis que utiliza dos longitudes de onda de fluorescencia para la realización, entre otros, de inmunofenotipados. La patente WO 98/02727 de la sociedad Abbott Laboratories describe un aparato de este tipo, que permite realizar el marcaje con un anticuerpo sobre una muestra de sangre total. ABBOTT describe de forma detallada en la patente un aparato destinado a la realización de reacciones anticuerpo-antígeno sobre una muestra de sangre total.

30 Se debe poder utilizar un método de fenotipado simple, rápido, eficaz y específico en autómatas muy sencillos, de tipo autómatas de hematología, que permita trabajar con un número limitado de detectores. Aunque las tecnologías son sensiblemente las mismas, los autómatas de rutina utilizados en hematología presentan características diferentes de los citómetros de flujo, especialmente en términos de número de parámetros de medida que se reducen a los estrictamente necesarios, particularmente en las medidas de rutina. Además, siendo el coste un factor limitante muy importante, la simplificación de los aparatos y de los análisis que permiten efectuar no pueden más que seguir el sentido de la economía
35 global.

40 La citometría de flujo es una tecnología que permite medir simultáneamente múltiples parámetros correspondientes a diferentes características físicas de un elemento biológico como por ejemplo una célula o un orgánulo celular. Los elementos biológicos se arrastran en un flujo líquido y el aparato registra el comportamiento de cada uno de ellos cuando pasan en la cubeta de medida por delante de una fuente luminosa.

Esta tecnología es de hecho la combinación de tres sistemas:

1) Sistema fluido: Flujo laminar que permite a los elementos biológicos en suspensión pasar uno a uno delante de la luz en la cubeta de medida.

45 2) Sistema óptico: Rayos láser u otra fuente luminosa y diferentes filtros que permiten seleccionar las longitudes de onda apropiadas tanto en excitación como en emisión.

3) Sistema electrónico: PMT (fotomultiplicador) o fotodiodo, que capta la luz emitida, permitiendo su transformación en señal eléctrica y después en señal numérica.

50 En resumen, la fuente luminosa permite generar una luz que va a pasar a través de las lentes e iluminar los elementos biológicos que desfilan en una cubeta de medida. En contacto con el elemento biológico, una parte de la luz se difunde. Esta luz pasa a través de varias lentes y otros diafragmas y se focaliza sobre un sensor de tipo fotodiodo para generar la medida de FSC (dispersión frontal). Esta medida, en la gama de ángulos elegida, da una indicación del tamaño del elemento biológico.

Otra parte de la luz se desvía de forma ortogonal y pasa a través de otro conjunto de lentes, y de un juego de espejos semi-reflectantes, para ser medida a nivel de un sensor para generar la señal SSC

(dispersión lateral). Esta medida de luz ortogonal, da una indicación de la densidad del elemento biológico así como de su granularidad (estructura).

Finalmente, las medidas de la intensidad luminosa se pueden realizar gracias tanto a tubos fotomultiplicadores o fotodiodos como a las longitudes de onda y a las señales ópticas a analizar.

5 El paso de los elementos biológicos en un citómetro necesita previamente una etapa a lo largo de la cual el elemento biológico se hace detectable, y por tanto marcado, por una sonda, específica de una estructura o de una función de dicho elemento biológico, habiéndose hecho la propia sonda previamente detectable.

10 Cuando el marcador de la sonda es una molécula fluorescente ésta puede absorber un fotón en una gama de longitud de onda que es específica del mismo (espectro de excitación). Así excitada, la molécula fluorescente, va a volver a su estado fundamental, y restituir un fotón con una energía más débil. Una molécula fluorescente posee por tanto un espectro de longitudes de onda de excitación que le es propio y en el cual ella va a absorber la energía para emitirla de nuevo bajo forma de fluorescencia (fluorescencia emitida), según un espectro de emisión igualmente característico. La longitud de onda de la fluorescencia emitida es siempre mayor (frecuencia más débil) que la longitud de onda de excitación.

15 Las señales de difusión (FSC, SSC) y de fluorescencia van a ser transformadas en señales eléctricas por los detectores adaptados, y después analizadas por un sistema informático.

20 Así en la citometría de flujo, comúnmente una banda de longitudes de onda de fluorescencia está asociada con cada sonda o cóctel de sondas utilizados. Cada sonda está pues acoplada con un fluorocromo (marcador fluorescente), en el que las señales se miden sobre un solo canal de fluorescencia, aunque dicho fluorocromo esté injertado sobre uno o varios tipos de sondas. Por ejemplo, el documento EP0633462 describe un método de discriminación de diferentes células linfocitarias mediante el marcaje simultáneo de dichas poblaciones por tres anticuerpos monoclonales hechos detectables por tres fluorocromos diferentes. Los documentos Hawley *et al.* (BioTechniques 30, (2001) N° 5, 1028-1034) y Maurer *et al.* (Journal of Immunological Methods, (1990) N° 135, 43-47) describen igualmente cada uno la utilización de la citometría de flujo para detectar varios marcadores.

25 La disminución de los costes podría pasar por la utilización de parámetros de inmunofenotipado con un número restringido de canales de medida de fluorescencia además de los parámetros físicos clásicos elegidos entre la difusión en el eje (dispersión frontal o FSC), la difusión ortogonal (dispersión lateral o SSC), el volumen por impedanciometría, etc.

30 La posibilidad de sumar las respuestas de fluorescencia permitiría expresar varios marcajes diferentes sobre un mismo canal de medida y multiplicar así las capacidades de análisis de un sistema y por tanto su relación precio/prestación, sin aumentar por tanto la complejidad del aparato por adición de canales de medida.

35 La dificultad cuando varias sondas están conjugadas con el mismo fluorocromo, es que la expresión de las características biológicas reconocidas respectivamente por las diferentes sondas, va a influir directamente en la cantidad de fluorescencia total emitida.

40 Así, por ejemplo, si una característica biológica está fuertemente presente (por ejemplo un antígeno en la superficie de una célula) la cantidad de sondas marcadas y fijadas, será proporcional a la cantidad de dicha característica biológica. En consecuencia la cantidad de fluorescencia emitida por dicha sonda, ella misma proporcional a la cantidad de características biológicas que hayan sido fijadas a dicha sonda marcada, será elevada.

45 Paralelamente, si otra característica biológica de la misma muestra está débilmente representada, la cantidad de fluorescencia emitida por la sonda correspondiente, conjugada con el mismo fluorocromo, será demasiado débil y podrá pasar desapercibida puesto que está enmascarada por la fluorescencia de la primera sonda.

Por supuesto, las mismas dificultades se encuentran durante la utilización de otros tipos de marcajes.

50 Uno de los fines de la presente invención es precisamente permitir la detección neta y sin ambigüedad de al menos tres sondas mediante la utilización de dos medios de detección solamente. Esto implica por tanto que al menos dos sondas sean detectadas por un solo y mismo medio de detección. Esto se puede realizar si se utilizan tres sondas diferentes, cada una de las cuales reconoce y se fija a uno de los elementos biológicos a detectar o a una de las características del elemento o elementos biológicos, volviéndose cada una de las propias sondas detectables mediante un marcador diferente, presentando dos de dichos marcadores dos espectros de emisión que tienen al menos una parte común (espectros de emisión solapantes) y presentando el tercero un espectro de emisión que no tiene

esencialmente ninguna parte común con los otros dos (espectro no solapante). Los dos (o n) marcadores que tienen un espectro de emisión solapante se miden por un primer medio de detección, siendo medido el marcador que tiene el espectro de emisión no solapante por un segundo medio de detección.

Así, la presente invención consiste en:

5 (1) - equilibrar las diferencias de expresión antigénica o de característica celular por el rendimiento de emisión de n sondas acopladas a n marcadores medidos en una sola y misma banda de detección;

10 (2) – crear una relación entre las señales emitidas por el segundo medio de detección de una parte, y las señales emitidas por el primer medio de detección de otra parte, con el fin de utilizarla como eje constitutivo de una matriz;

(3) - combinar en dos dimensiones la relación emitida por el ítem (2) de una parte, y las señales emitidas por el primer medio de detección de otra parte, con el fin de mejorar la representación gráfica, y por tanto mejorar la caracterización y la cuantificación de los elementos biológicos de interés.

15 Por "elemento biológico" se entiende según la invención por ejemplo una célula eucariota o procariota, un grupo de células, un fragmento celular.

Por "característica biológica", se entiende un componente específico del elemento biológico estudiado, por ejemplo, un componente biológico de la célula tal como un orgánulo celular, una proteína, un lípido, un glúcido, o también un ácido nucleico (ARN o ADN).

20 Por "sonda", según la invención se entiende todo medio que permite identificar específicamente una característica biológica o química presente en o sobre los elementos biológicos estudiados. Dichos medios utilizables según la invención son perfectamente conocidos en particular en los campos de la biología celular, de la biología molecular, de la inmunología y de la citometría de flujo. Se pueden citar sin ser limitativos, los anticuerpos, los ácidos nucleicos (ADN o ARN), los compuestos químicos, particularmente los compuestos químicos intercalantes, los que son reactivos con el entorno iónico (H^+ , Ca^{++} , etc.), las lectinas, ligandos u otros colorantes de viabilidad celular.

25 Por "marcador de la sonda" se entiende todo compuesto que por su naturaleza es directamente detectable ya sea visualmente, ya sea con ayuda de un aparato adecuado, ya sea detectable después de excitación. Tal compuesto una vez acoplado a la sonda hace a ésta detectable. Se pueden citar las moléculas fluorescentes cuando se trata por ejemplo de compuestos químicos o de moléculas biológicas como las proteínas. Todos estos productos están comercialmente disponibles y son ofertados por la mayor parte de los distribuidores de productos químicos de laboratorio, como por ejemplo las sociedades Sigma, Aldrich, Fluka, Riedel de Haen, etc...

30 Es notable que en una misma experiencia de discriminación de poblaciones de elementos biológicos que utiliza el método según la invención, sea posible utilizar sondas de naturaleza diferente (anticuerpos conjugados y ácidos nucleicos marcados o viabilidad celular por ejemplo) ya que su detección se puede realizar según los criterios definidos según la invención (al menos dos espectros de emisión solapantes y un espectro no solapante).

35 Por "medio de detección", se entiende según la invención todo medio para detectar, incluso cuantificar, el marcador de la sonda. Dicho medio de detección es por supuesto característico del método utilizado para hacer que la sonda sea detectable. Dicho medio de detección está formado, en todos los casos, por el conjunto de los componentes físicos capaces de detectar el marcador de una sonda particular. Por ejemplo, si se trata de un marcador que emite fluorescencia, el medio de detección será el conjunto compuesto de lentes ópticas de observación de la muestra, filtros espaciales (diafragma, "pin hole", etc), filtros espectroscópicos (dicroicos, interferenciales) especialmente ordenados para no dejar pasar hacia el sensor más que la parte del espectro denominada "banda de detección" específica del marcador o marcadores a medir y del propio sensor opto-electrónico (fotodiodo, tubo fotomultiplicador...). A continuación este sensor será conectado electrónicamente a la cadena de adquisición electrónica que realizará el tratamiento de la señal hasta analógica y/o numérica y finalmente el tratamiento informático de los datos mediante un ordenador.

40 Se puede tratar también por ejemplo de un detector de fluorescencia si la sonda está marcada con ayuda de un marcador fluorescente o si la sonda es ella misma fluorescente, o incluso de un espectrofotómetro si la sonda es un marcador absorbente en una parte específica del espectro cromático de la luz de excitación.

45 Por "espectro de emisión" se entiende según la invención el reparto de la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda en una banda característica del marcador o de la propia sonda. Generalmente un espectro tal presenta un pico de intensidad que corresponde al máximo de

emisión. La detección se podrá hacer en un intervalo comprendido entre dos longitudes de onda, que encuadran generalmente una longitud de onda intermedia dada correspondiente al pico de fluorescencia máxima emitida (pico de detección máxima).

5 Por "banda de detección" se entiende una gama de longitudes de onda elegida en el espectro de emisión del marcador o marcadores considerados (Por ejemplo, si se trata de un marcador que emite fluorescencia, la banda de detección será una banda elegida con preferencia alrededor del pico máximo de emisión de fluorescencia). Esta banda de detección se define por el sistema de filtración espectral incorporado en el medio de detección, por intermedio de al menos un filtro interferencial o paso de banda eventualmente montado detrás de uno o varios espejos dicróicos.

10 Por "espectros de emisión solapantes", se entiende que, en un mismo medio de detección, para dos marcadores diferentes, sus espectros de emisión presentan una zona común. Por ejemplo si se trata de dos marcadores que emiten fluorescencia, sus espectros de emisión se denominarán espectros de emisión solapantes cuando presenten un intervalo de emisión común comprendido entre dos longitudes de onda comunes a sus dos espectros de emisión. Generalmente tales espectros presentan picos de emisión máximos claros.

15 Por "espectro de emisión esencialmente no solapante", se entiende que para tres marcadores diferentes de los cuales dos presentan espectros de emisión solapantes, el tercero presenta un espectro de emisión que no tiene ninguna zona de solapamiento significativo con ninguno de los espectros de los otros dos marcadores.

20 Por la lectura de lo que precede se comprende por tanto que si se utilizan tres sondas que reconocen tres características biológicas diferentes, marcadas con tres marcadores que tienen cada uno un espectro de emisión diferente, pero de los cuales dos son solapantes y uno no solapante, el método no utiliza más que dos medios de detección en la medida en que los marcadores con espectros solapantes tienen una banda de detección común.

25 Esto es lo que constituye la gran originalidad del método objeto de la invención con respecto a los métodos conocidos de la técnica anterior que para detectar tres características biológicas utilizan tres sondas que presentan tres espectros de emisión independientes que se analizan por tres medios de detección diferentes.

30 Para los marcadores solapantes, la elección cuidadosa de los marcadores en su aspecto de detección, conducirá a elegir dos marcadores que puedan responder, uno más eficazmente que el otro, en la misma banda de detección.

35 Según una variante de la invención, el rendimiento de emisión en la banda de detección se podrá elegir para que sea inversamente proporcional a la expresión de las características biológicas consideradas. La elección de la banda de detección será determinada también en función de esta expresión para no enmascarar una expresión positiva débil (esta es la primera fase de equilibrio de la invención).

40 Así, por ejemplo, para un antígeno poco expresado se elegirá un marcador que presente un rendimiento de emisión elevado en la banda de detección elegida y para un antígeno muy expresado se elegirá un marcador que presente un rendimiento de emisión poco elevado en la misma banda de detección. Esto permite controlar las cantidades de marcadores medidas con el fin de equilibrar las emisiones en proporción inversa del nivel de expresión de los antígenos o sondas considerados.

45 El método según la invención permite discriminar y contar los elementos biológicos de forma sencilla, rápida, eficaz. Permite además utilizar aparatos sencillos, lo que tiene como consecuencia una disminución de los costes tanto de fabricación como de utilización y de mantenimiento. Además se facilita el análisis automatizado.

Así la invención tiene por objeto un método de discriminación de al menos dos poblaciones de elementos biológicos portadores de características específicas, eventualmente presentes en una muestra, que comprende

50 - el marcaje simultáneo de dichas poblaciones de elementos biológicos por tres sondas diferentes, detectables o convertidas en detectables por tres marcadores diferentes, de los cuales dos de dichos marcadores (marcadores solapantes o MC) presentan cada uno un espectro de emisión, dichos espectros de emisión se solapan y el tercero (marcador no solapante o MnC) presenta un espectro de emisión que no solapa esencialmente los espectros de los otros dos marcadores (espectro de emisión no solapante);

55 - la medida por todos los medios apropiados, de la cantidad total de marcador no solapante (qMnC), en una banda de detección elegida en el espectro de emisión de dicho marcador no solapante;

- la medida por todos los medios apropiados, de la cantidad total de marcador solapante (qMC) en una banda de detección común a los espectros de emisión de dichos marcadores solapantes,

- el establecimiento para cada elemento biológico analizado, de la relación (R) de la cantidad total de marcador no solapante con respecto a la cantidad total de marcador solapante [$R = (qMnC) / (qMC)$]

- el establecimiento por todos los medios de un diagrama que presenta la relación (R) en función de la cantidad de elementos biológicos marcados por los marcadores solapantes [$R = f(qMC)$].

Este método se caracteriza igualmente porque comprende, además, una última etapa de cuantificación por todos los medios apropiados, generalmente un ordenador, de los elementos biológicos identificados sobre dicho diagrama o dichos diagramas y de los datos estadísticos correspondientes.

El método según la invención es un método que permite la discriminación y el recuento de elementos biológicos que responden positivamente o no a un criterio dado. El método no tiene como fin cuantificar el número de sondas fijadas por elemento biológico. El método permite poner en evidencia sin ambigüedad, en una muestra, particularmente una muestra biológica, poblaciones de elementos biológicos que presentan la característica o características buscadas.

Conforme a la última etapa del método según la invención, el análisis de una matriz biparamétrica de ordenada R y de abscisa qMC permite mejorar la representación gráfica, y por tanto mejorar la caracterización y la cuantificación de los elementos biológicos de interés.

Según la invención, la muestra puede ser una muestra biológica natural, particularmente una muestra biológica natural líquida. Puede ser igualmente una suspensión celular no natural, como por ejemplo un medio de cultivo. Se pueden citar sin ser limitativos, como líquidos biológicos naturales la sangre, la orina, un tejido disociado, la médula ósea, el líquido céfalo-raquídeo, el líquido pleural o el líquido sinovial, el producto resultante de un procedimiento de aféresis o como suspensión celular sintética, un medio de cultivo de células o de microorganismos.

Según la invención los elementos biológicos contenidos en la muestra pueden ser células, eucariotas o procariotas, o una mezcla de las dos, o fragmentos de dichas células, orgánulos. Las sondas utilizables según el método de la invención pueden ser, idénticas o diferentes, anticuerpos, ácidos nucleicos (ADN o ARN), o incluso cualquier sonda molecular como por ejemplo los colorantes que reconocen específicamente los ácidos nucleicos, los sustratos enzimáticos o incluso marcadores específicos de proteínas, ligandos de receptores, moléculas sensibles al entorno iónico (sondas de pH, Ca^{++} , etc.) o cualquier otra molécula específica de la característica biológica deseada.

Cuando las sondas son anticuerpos, estos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, naturales o recombinantes, humanos o animales.

Las sondas, si no son detectables naturalmente, para ser detectables deberán ser conjugadas a un marcador que pueda ser reconocido por el medio de detección, en la banda de detección elegida.

Según la invención, los marcadores que sirven para hacer detectable la sonda, pueden ser compuestos químicos detectables aptos para ser injertados sobre las sondas, marcadores intercalantes o no de los ácidos nucleicos, o incluso marcadores específicos de las proteínas o cualquier otra molécula específica de la característica biológica deseada. A este respecto se pueden citar los colorantes fluorescentes o también absorbentes tales como: Alexa Fluor[®] 350, Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 532, Alexa Fluor[®] 633, Alexa Fluor[®] 647, Alexa Fluor[®] 660, Alexa Fluor[®] 680, alofocianina, aminometilcumarina ácido acético, Cy2[®], Cy 5.1[®], Cy 5[®], Cy 5.5[®], diclorofluoresceína (DCFH), dihidrorrodamina (DHR), "GFP mejorada" (EGFP), Fluo-3, FluorX[®], fluoresceína, 5-maleimida-fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), PerCP, r-Ficoeritrina (PE), el tándem r-Ficoeritrina-Cianina 5 o SpectralRed[®] o CyChrome[®], r-Ficoeritrina-Cianina 5.5 (PE-CY 5.5[®]), r-Ficoeritrina-Cianina 7 (PE-CY 7[®]), r-Ficoeritrina-Texas Red-x[®], Red 613[®], Rodamina 110, Rodamina 123, S65L, S65T, isotiocianato de tetrametilrodamina, Texas-Red-x[®], TruRed[®], indo 1, los nanocristales (Quantum Dots), Fura 2, Fura 3, quin, DS Red así como los marcadores específicos especialmente los ácidos nucleicos (ya estén bajo la forma de ADN o de ARN), como por ejemplo los colorantes intercalantes u otros colorantes de viabilidad celular tales como el bromuro de etidio o también el naranja de tiazol, el azul de tiazol y sus derivados, la tioflavina S, la tioflavina T, la tioflavina TCN[®], el yoduro de dietil-quinoliltiocianina (DEQTC), TOTO-1[®], TO-PRO-1[®], o también YOYO-1[®], Hoechst[®] 33258, Hoechst[®] 33342, Hoechst[®] 34580, el diamidino-fenilindol (DAPI), el yoduro de propidio, la pironina Y, la 7-Aminoactinomicina D (7AAD), el naranja de acridina, la auramina O, la calceína, el nuevo azul de metileno, olamina-O, Oxazina 750, el azul astra, verde SYTOX[®], SYTO 11[®], SYTO 12[®], SYTO 13[®], SYTO 16[®], SYTO 18[®], SYTO 80[®], SYTO 81[®]

En una forma particular de realización de la invención, cuando las características celulares, por ejemplo los antígenos, son reconocidas por sondas que se han hecho detectables mediante marcadores solapantes, se puede elegir una primera característica celular denominada genérica, es decir presente y característica de todos los elementos biológicos considerados. Siendo la expresión de esta característica celular normalmente elevada en los elementos biológicos, el marcador que será injertado en la sonda que la reconoce podrá ser aquel que responda más débilmente en la banda de detección común a los dos marcadores solapantes (MC). Tal sonda permite verificar que se interesa por las buenas poblaciones celulares.

La segunda característica celular reconocida por una sonda hecha detectable por el otro marcador solapante, podrá ser una característica celular menos expresada sobre una población solamente de los elementos biológicos estudiados. El marcador que será injertado en dicha sonda deberá ser un marcador que responda más fuertemente en la banda de detección común a los dos marcadores solapantes (MC).

A la tercera característica celular estudiada, corresponde una sonda marcada por un tercer marcador que no es solapante (MnC) y que será detectado en una segunda banda de detección, diferente de la primera.

El método según la invención puede ser realizado en cualquier aparato que permita la detección de los marcadores. Se citará a este respecto a título de ejemplo la detección de fluorescencia cuando sea emitida por un colorante conjugado a una sonda molecular tal como un anticuerpo o directamente por un colorante supravital fluorescente tal como un colorante intercalante o no, específico de los ácidos nucleicos, o también la detección de absorbancia o de difusión luminosa especialmente a una gama de longitudes de onda definida del espectro, cuando estas medidas se hagan por extinción o difusión de la gama de longitudes de onda o por espectrometría de una banda elegida de ultravioleta a infrarrojo. Esta absorbancia puede ser aquella generada o por un colorante conjugado a una sonda molecular tal como un anticuerpo o directamente por un colorante supravital tal como un colorante intercalante o no, específico de los ácidos nucleicos.

La invención tiene también por objeto la utilización del método descrito precedentemente para discriminar al menos dos poblaciones celulares portadoras de características específicas y eventualmente presentes en una muestra. Una aplicación del método puede ser considerada para el diagnóstico médico, como por ejemplo en el campo de las leucemias linfoides crónicas (LLC) y de las leucemias agudas (LA) con ayuda de anticuerpos anti-CD45, anti-CD19 y anti-CD5; en el campo de la detección de la enfermedad residual (enfermedad residual mínima, MRD) y de la diferenciación leucocitaria con ayuda de anticuerpos anti-CD45, anti-CD16 y anti-CD11b; en el campo de los progenitores hematopoyéticos con ayuda de anticuerpos anti-CD45, anti-CD34, anti-CD33 y 7-AAD o DAPI u otro marcador de viabilidad; en el campo de la inflamación y de la activación celular con ayuda de anticuerpos anti-CD45, anti-CD64 y anti-CD163; en el campo de la detección o del seguimiento de la infección de virus VIH con ayuda de anticuerpos anti-CD45, anti-CD8 o anti-CD4 y anti-CD3; en el campo de la leucemia aguda linfoblástica de tipo b (LALb) del niño; en el campo de la observación de la médula ósea con ayuda de anticuerpos anti-CD45, anti-CD19 y anti-CD10 o también en el campo de la diferenciación de los precursores de los linfocitos B (hematogones) con ayuda de anticuerpos anti-CD19, anti-CD10 y anti-CD38. Estas descripciones no son ni exhaustivas ni limitativas dado el estado actual de los conocimientos médicos.

Otras características de la invención aparecerán después de la lectura de las figuras y de los ejemplos que siguen y que no se dan más que a título ilustrativo sin limitación de la invención.

Así la Figura 1 es una representación esquemática de fenotipos de elementos biológicos en la que A y B son marcadores solapantes y C es un marcador no solapante, que corresponden respectivamente a las sondas (SA, SB y SC), hechas detectables que reconocen las características particulares (CPA, CPB y CPC) de los elementos biológicos considerados.

La parte 1A muestra una representación gráfica clásica en citometría de flujo de la fluorescencia de A+B (qMC) en función de la fluorescencia de C (qMnC).

La parte 1B muestra una representación gráfica obtenida según la invención en citometría de flujo de la relación de la fluorescencia de C (qMnC) con respecto a la fluorescencia total de A+B (qMC) [qMnC/qMC] en función de la fluorescencia total de A+B (qMC) [qMnC/qMC = f(qMC)].

La realización de la invención permite una distinción sobre un mismo eje de fluorescencia (el eje de las abscisas) entre los elementos biológicos que expresan (A+B+) de una primera parte, (A-B-) de una segunda parte, y (A+B-) o (A-B+) de una tercera parte.

La Figura 2 presenta el método según la invención aplicado al análisis de los leucocitos sanguíneos en una muestra de sangre normal (2a) y en una muestra de sangre de un paciente afectado de leucemia aguda (2b) después de marcaje con un anticuerpo anti-CD45 acoplado a la r-ficoeritina (PE),

un anticuerpo anti-CD5 acoplado a la ficoeritrina-cianina 5 (PC5) y un anticuerpo anti-CD19 acoplado a la FITC. La expresión del CD45 solo permite identificar los blastocitos presentes en esta patología.

5 La Figura 3 representa muestras de sangre normal y de sangre de un enfermo afectado de leucemia linfóide crónica (A2 y B2). Las Figuras 3A1 y 3A2 presentan los resultados del análisis por citometría de flujo, las Figuras 3B1 y 3B2 presentan los mismos resultados después de la aplicación del método según la invención.

10 La Figura 4 presenta el método según la invención aplicado al análisis de los linfocitos T sanguíneos después de marcaje con un anticuerpo anti-CD45 acoplado a la PE, un anticuerpo anti-CD3 acoplado al PC5 y un anticuerpo anti-CD8 acoplado a la FITC. La Figura 3A presenta los resultados del análisis por citometría de flujo, la Figura 3B presenta los mismos resultados después de la aplicación del método según la invención.

Ejemplo 1:

15 Las patologías más frecuentes en onco-hematología son los diferentes tipos de leucemias agudas (LA) y las hemopatías linfoides B en las que la leucemia linfóide crónica (LLC) presenta una incidencia en constante progresión (30/10⁶).

La leucemia aguda (LA) se puede caracterizar por una invasión medular por la proliferación de células hematopoyéticas malignas.

La leucemia linfóide crónica (LLC) se puede caracterizar por una proliferación de células linfocitarias monoclonales, células linfoides de la línea B atípicas.

20 Los blastocitos leucémicos de las LA se caracterizan por una expresión moderada del CD45 en comparación con la de los linfocitos y monocitos normales de la sangre.

Los linfocitos anormales de la LLC de tipo B se caracterizan por la co-expresión aberrante de los antígenos CD5 y CD19 sobre la misma célula mientras que los linfocitos normales expresan o bien el CD5 (linfocitos de la línea T) o bien el CD19 (linfocitos de la línea B).

25 Los fenotipos de estas células se pueden resumir en la tabla que sigue:

Antígenos	CD19	CD45	CD5
Linfocitos T normales	-	++	++
Linfocitos B normales	+	++	-
Blastocitos de LA		+/-	
Linfocitos B de LLC	+	++	+

30 Hasta ahora, el análisis y la identificación de estas diferentes poblaciones en una muestra sanguínea por citometría de flujo necesitan el empleo de tres anticuerpos diferentes dirigidos contra los tres antígenos CD5, CD19 y CD45 y la difusión ortogonal SSC. Para este análisis, cada anticuerpo se acopla a un fluorocromo diferente y cada expresión se mide a una longitud de onda diferente con ayuda de fotomultiplicadores diferentes.

35 La aplicación del método según la invención permite proponer un sistema de marcaje y de análisis por citometría que permite detectar y cuantificar en una misma muestra de sangre y durante una misma medida, la presencia eventual de células leucémicas con ayuda de dos fotomultiplicadores solamente y de la difusión ortogonal SSC.

40 Sobre un citómetro de flujo, el sistema de filtración óptico de las señales luminosas se optimiza para un fluorocromo dado de manera que se mida su fluorescencia en una banda de longitudes de onda centrada sobre su máximo de emisión: la fluoresceína (FITC) se analiza generalmente a 525 nm, la r-ficoeritrina (PE) a 575 nm y el tándem r-ficoeritrina-cianina 5 (PC5) a 675 nm, esto para amplitudes de banda de aproximadamente 30 nm.

45 Los espectros de emisión de PE y de PC5 son solapantes. Tienen por ejemplo en común la longitud de onda 675 nm a la cual la PE tiene un rendimiento de fluorescencia mucho más débil que el PC5. Una de las originalidades del método según la invención reside en la medida de la fluorescencia de uno de los fluorocromos (PE) a una longitud de onda diferente de la de su máximo de emisión, aquí la medida de PE a 675 nm. Así, a esta longitud de onda, actuando sobre eficacias diferentes del sistema de

medida frente a dos fluorocromos elegidos a este efecto, se hace posible compensar diferencias importantes en la expresión de los antígenos analizados.

5 Este principio se aplica al análisis de los leucocitos sanguíneos después del marcaje con un anticuerpo anti-CD45 acoplado a la PE ($\lambda_{max} = 575 \text{ nm}$), un anticuerpo anti-CD5 acoplado al PC5 ($\lambda_{max} = 675 \text{ nm}$) y un anticuerpo anti-CD19 acoplado a la FITC ($\lambda_{max} = 525 \text{ nm}$).

Estos marcajes se analizan en una primera banda de detección centrada a 675 nm que es la longitud de onda de emisión máxima de PC5. El espectro de la PE solapa el de PC5. El análisis a 675 nm determinará por tanto la cantidad total de fluorescencia emitida por PC5 y PE (qMC).

10 Por otra parte, se analiza la cantidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo anti-CD19 acoplado a la FITC a 525 nm (qMnC).

Los polinucleares y los monocitos se excluyen del análisis por el sistema de ventana sobre sus propiedades de difusión luminosa.

Protocolo:

15 1) En una muestra de sangre total periférica, se toma una alícuota de sangre de unos microlitros (5 a 50) que se mezcla con una alícuota de unos microlitros (3 a 50) de la solución de los tres anticuerpos conjugados descritos anteriormente.

2) Se pone en incubación la mezcla a temperatura ambiente o a temperatura regulada, al abrigo de la luz, durante un período de unos minutos (1 a 30).

20 3) Después del período de incubación, se añade a la mezcla un reactivo de lisis de los glóbulos rojos, para obtener una solución final de sangre a una concentración específica deseada (1/40, 1/80, 1/100, etc.).

4) La solución de sangre lisada obtenida de esta manera se deja incubar durante unos segundos dependiendo del reactivo de lisis y de la temperatura de incubación (típicamente 15 a 30 segundos).

25 5) Después se inyecta la solución en un conjunto de medida del tipo citómetro de flujo para medir sobre cada célula por la que atraviesa un haz óptico (lo más a menudo un láser de 488 nm para los colorantes especificados), los parámetros de difusión en el eje FSC, difusión ortogonal SSC, fluorescencia verde a 525 nm (FL1) y fluorescencia roja a 675 nm (FL2). Las etapas 3 a 5 se pueden realizar automáticamente sobre un aparato semiautomático de citometría de flujo o un autómata de hematología especialmente concebido y las etapas 1 a 5 pueden ser automatizadas sobre un aparato automático de citometría de flujo especialmente concebido.

El análisis de la fluorescencia a 675 nm (FL1) en función de la difusión ortogonal SSC (véase la Figura 2 A) permite discriminar:

- una población muy poco fluorescente que corresponde a los blastocitos de LA que expresan poco el CD45,
- 35 • una población de una fluorescencia intermedia que corresponde a los linfocitos que expresan el CD45 pero que no expresan el CD5 (linfocitos B y células NK) y
- una población muy fluorescente que corresponde a los linfocitos que expresan además el CD5 (linfocitos T y células de LLC).

40 En esta última población, el análisis de la fluorescencia a 525 nm permite identificar las células de LLC que expresan también el CD19.

La aplicación del método según la invención permite discriminar los linfocitos no T, los linfocitos T y las células de LLC teniendo en cuenta, para cada célula, la relación de la fluorescencia a 525 nm sobre la fluorescencia a 675 nm (qMnC/qMC). Esta relación se expresa según la tabla de verdad que sigue:

CD19	CD45	CD5	Relación CD19/CD45+CD5 (qMnC/qMC)
-	++	++	-
+	++	-	++
+	++	+	+/-

El histograma de distribución obtenido según la invención $[(qMnC) / (qMC) = f(qMQ)]$ (véase la Figura 2C) permite identificar, separar y cuantificar tres poblaciones muy claramente separadas.

- 5 • Los linfocitos T normales (L.T.) no presentan fluorescencia a 525 nm pero presentan mucha fluorescencia a 675 nm, presentan por tanto una relación muy débil.
- Los linfocitos B normales (L.B.) presentan fluorescencia a 525 nm con una fluorescencia intermedia a 675 nm, tienen por tanto una relación elevada.
- Las células de LLC expresan a la vez el CD5, el CD45 y el CD19, presentan fluorescencia a 525 nm y a 675 nm y su relación es por tanto intermedia (Figura 2).
- 10 • Las células NK que no expresan ni el CD5 ni el CD19 se excluyen del análisis sobre la base de su fluorescencia a 675 nm (CD45+, CD5- y CD19-).

Así a partir de una muestra de sangre, después de marcaje por tres anticuerpos fluorescentes y lisis de los hematíes, es posible, en un solo análisis, discriminar y contar los linfocitos T, los linfocitos B, y las células NK por la medida a dos longitudes de onda de las fluorescencias solamente.

- 15 La aplicación del método según la invención permite discriminar los linfocitos T y las células LLC (figura 2B) que aparecen bajo la forma de una sola nube en el diagrama obtenido según un análisis convencional (figura 2A). Es lo mismo para los linfocitos B y las células NK.

Además, se puede detectar la presencia eventual de blastocitos de leucemia aguda o de células de leucemia linfóide crónica y se pueden contar estas células.

- 20 La utilización del método según la invención se puede aplicar al diagnóstico y al seguimiento de las patologías linfoides crónicas B, de las leucemias agudas, y al seguimiento de la enfermedad residual a lo largo del tratamiento.

Ejemplo 2:

- 25 El método según la invención se puede aplicar también al análisis de los linfocitos T sanguíneos después de marcaje con un anti-CD45 acoplado a la PE, un anti-CD3 acoplado al PC5 y un anti-CD8 acoplado a la FITC. (Figura 3).

1) En una muestra de sangre total periférica, se toma una alícuota de sangre de unos microlitros (5 a 50) que se mezcla con una alícuota de unos microlitros (3 a 50) de la solución de los tres anticuerpos conjugados descritos anteriormente.

- 30 2) Se pone en incubación la mezcla a temperatura ambiente o a temperatura regulada, al abrigo de la luz, durante un período de unos minutos (1 a 30).

3) Después del período de incubación, se añade a la mezcla un reactivo de lisis de los glóbulos rojos, para obtener una solución final de sangre a una concentración específica deseada (1/40, 1/80, 1/100, etc.).

- 35 4) La solución así obtenida se deja incubar durante unos segundos dependiendo del reactivo de lisis y de la temperatura de incubación (típicamente 15 a 30 segundos).

- 40 5) Después se inyecta la solución en un conjunto de medida del tipo citómetro de flujo para medir sobre cada célula por la que atraviesa un haz óptico (lo más a menudo un láser de 488 nm para los colorantes especificados), los parámetros de difusión en el eje FSC, difusión lateral SSC, fluorescencia verde a 525 nm (FL1) y fluorescencia roja a 675 nm (FL2).

Las etapas 3 a 5 se pueden realizar automáticamente sobre un aparato semiautomático de citometría de flujo o un autómata de hematología especialmente concebido y las etapas 1 a 5 pueden ser automatizadas sobre un aparato automático de citometría de flujo especialmente concebido.

- 45 Los marcajes de la PE y PC5 se analizan a 675 nm (qMC). El marcaje con la FITC se analiza a 525 nm (qMnC).

Los polinucleares y los monocitos se excluyen del análisis por sus propiedades de difusión ortogonal SSC.

El diagrama obtenido según los métodos clásicos (Figura 3A) de la fluorescencia a 675 nm en función de la difusión ortogonal SSC permite poner en evidencia una nube que representa las poblaciones

medianamente fluorescentes de linfocitos que expresan el CD45 pero que no expresan el CD3 (linfocitos B y células NK) y una población muy fluorescente que corresponde a los linfocitos que expresan además el CD3 (linfocitos T).

5 La aplicación del método según la invención permite discriminar perfectamente las diferentes poblaciones (Figura 3 B).

En particular esto permite identificar, en la población muy fluorescente que corresponde a los linfocitos que expresan además el CD3, los linfocitos CD8+.

Los linfocitos T CD4+ no presentan fluorescencia a 525 nm pero presentan mucha fluorescencia a 675 nm y no presentan más que una relación 525/675 muy débil.

10 Los linfocitos T CD8+ presentan fluorescencia a 525 nm y a 675 nm, tienen por tanto una relación más elevada.

Las células NK y las células B que no expresan el CD3 se identifican sobre la base de su fluorescencia moderada a 675 nm (No T).

REIVINDICACIONES

1.) Un método de discriminación y de recuento de al menos dos poblaciones de elementos biológicos portadores de características biológicas específicas, eventualmente presentes en una muestra, que comprende

- 5 - el marcaje simultáneo de dichas poblaciones de elementos biológicos por tres sondas diferentes, detectables o convertidas en detectables por tres marcadores diferentes, de los cuales dos de dichos marcadores (marcadores solapantes o MC) presentan cada uno un espectro de emisión, dichos espectros de emisión se solapan y el tercero (marcador no solapante o MnC) presenta un espectro de emisión que no solapa los espectros de los otros dos marcadores (espectro de emisión no solapante);
- 10 - la medida por todos los medios apropiados, de la cantidad total de marcador no solapante (qMnC), en una banda de detección elegida en el espectro de emisión de dicho marcador no solapante;
- la medida por todos los medios apropiados, de la cantidad total de marcadores solapantes (qMC) en una banda de detección común a los espectros de emisión de dichos marcadores solapantes,
- 15 - el establecimiento de la relación (R) de la cantidad total de marcadores no solapantes con respecto a la cantidad total de marcadores solapantes [$R = (qMnC) / (qMC)$]
- el establecimiento por todos los medios de un diagrama que presenta la relación (R) en función de la cantidad de elementos biológicos marcados por el marcador solapante [$R = f(qMC)$].

2.) El método según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además, una última etapa de cuantificación por todos los medios de las poblaciones de los elementos biológicos presentes sobre dicho diagrama.

3.) El método según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el líquido biológico natural es la sangre, la orina, un tejido disociado, la médula ósea, el líquido céfalo-raquídeo, el líquido pleural, el líquido sinovial, el producto resultante de un procedimiento de aféresis.

4.) El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los elementos biológicos eventualmente presentes en el líquido son células eucariotas o células procariotas, o una mezcla de las dos, o fragmentos de dichas células.

5.) El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las sondas, idénticas o diferentes, son anticuerpos o ácidos nucleicos (ADN o ARN), o colorantes específicos de los ácidos nucleicos o sustratos enzimáticos o incluso marcadores específicos de proteínas, ligandos de receptores o marcadores sensibles al entorno iónico o cualquier otra molécula característica del elemento biológico deseado.

6.) El método según la reivindicación 5, caracterizado porque los anticuerpos son anticuerpos monoclonales o policlonales, naturales o recombinantes, humanos o animales.

7.) El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque los marcadores que sirven para hacer detectable la sonda, son marcadores, intercalantes o no, de los ácidos nucleicos, o también marcadores específicos de las proteínas o cualquier otra molécula característica del elemento biológico deseado.

8.) El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque los marcadores son marcadores fluorescentes o no.

9.) El método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque el marcador se elige entre Alexa Fluor[®] 350, Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 532, Alexa Fluor[®] 633, Alexa Fluor[®] 647, Alexa Fluor[®] 660, Alexa Fluor[®] 680, alofocianina, aminometilcumarina ácido acético, Cy2[®], Cy 5.1[®], Cy 5[®], Cy 5.5[®], diclorofluoresceína (DCFH), dihidrorrodamina (DHR), "GFP mejorada" (EGFP), Fluo-3, FluorX[®], fluoresceína, 5-maleimida-fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), PerCP, r-Ficoeritrina (PE), el tándem r-Ficoeritrina-Cianina 5 o SpectralRed[®] o CyChrome[®], r-Ficoeritrina-Cianina 5.5 (PE-CY 5.5[®]), r-Ficoeritrina-Cianina 7 (PE-CY 7[®]), r-Ficoeritrina-Texas Red-x[®], Red 613[®], Rodamina 110, Rodamina 123, S65L, S65T, isotiocianato de tetrametilrodamina, Texas-Red-x[®], TruRed[®], indo 1, los nanocristales (Quantum Dots), Fura 2, Fura 3, quin, DS Red, los compuestos intercalantes tal como el bromuro de etidio o también el naranja de tiazol, el azul de tiazol, la tioflavina S, la tioflavina T, la tioflavina TCN[®], el yoduro de dietil-quinoliltiocianina (DEQTC), TOTO-1[®], TO-PRO-1[®], o también YOYO-1[®], Hoechst[®] 33258, Hoechst[®] 33342, Hoechst[®] 34580, el diamidino-fenilindol (DAPI), el yoduro de propidio, la pironina Y, la 7-Aminoactinomicina D (7AAD), el naranja de acridina, la auramina O, la calceína, el nuevo azul de metileno, olamina-O, Oxazina 750, el azul astra, verde SYTOX[®], SYTO 11[®], SYTO 12[®], SYTO 13[®], SYTO 16[®], SYTO 18[®], SYTO 80[®], SYTO 81[®].

10.) La utilización del método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para discriminar al menos dos poblaciones de elementos biológicos portadores de características específicas y eventualmente presentes en una muestra.

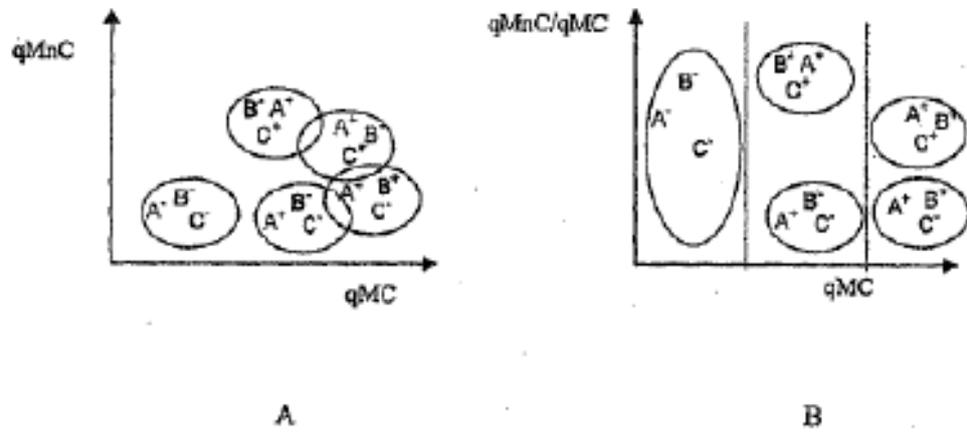


Figura 1

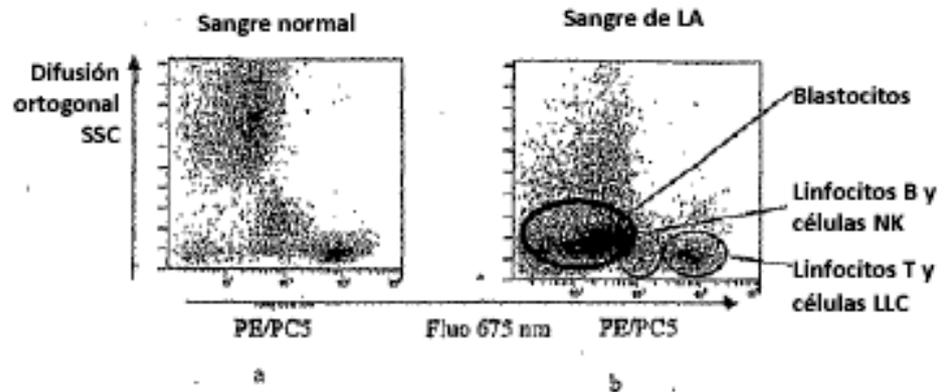


Figura 2

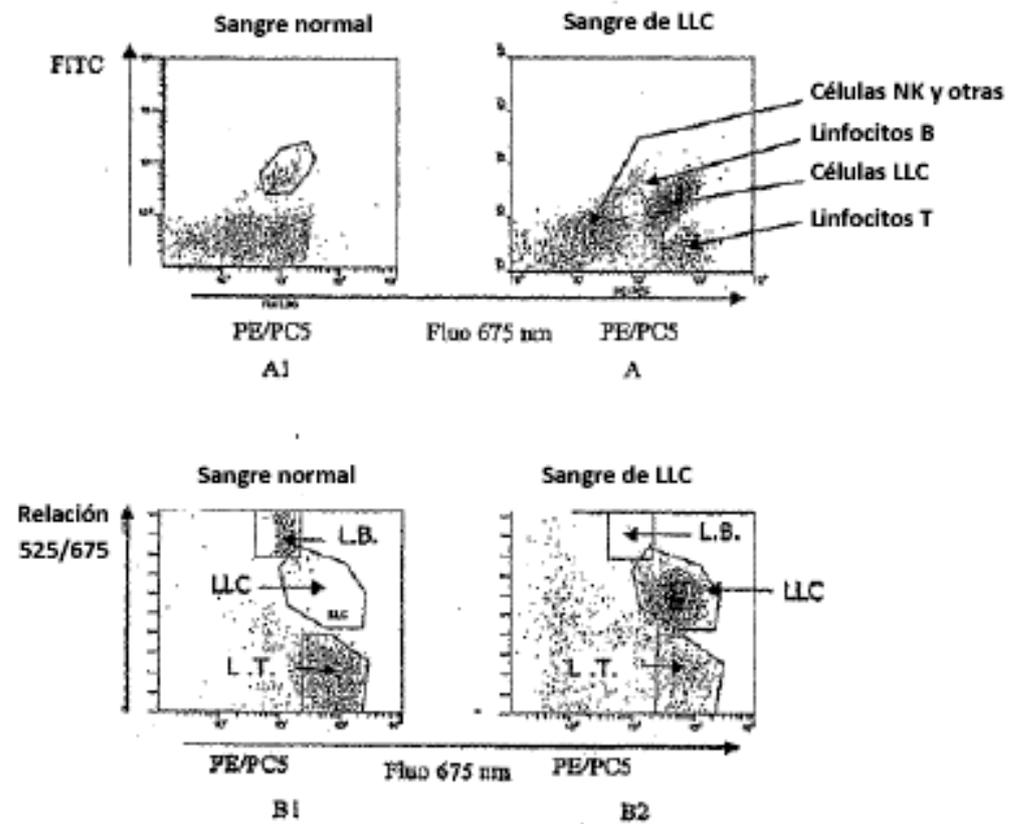


Figura 3

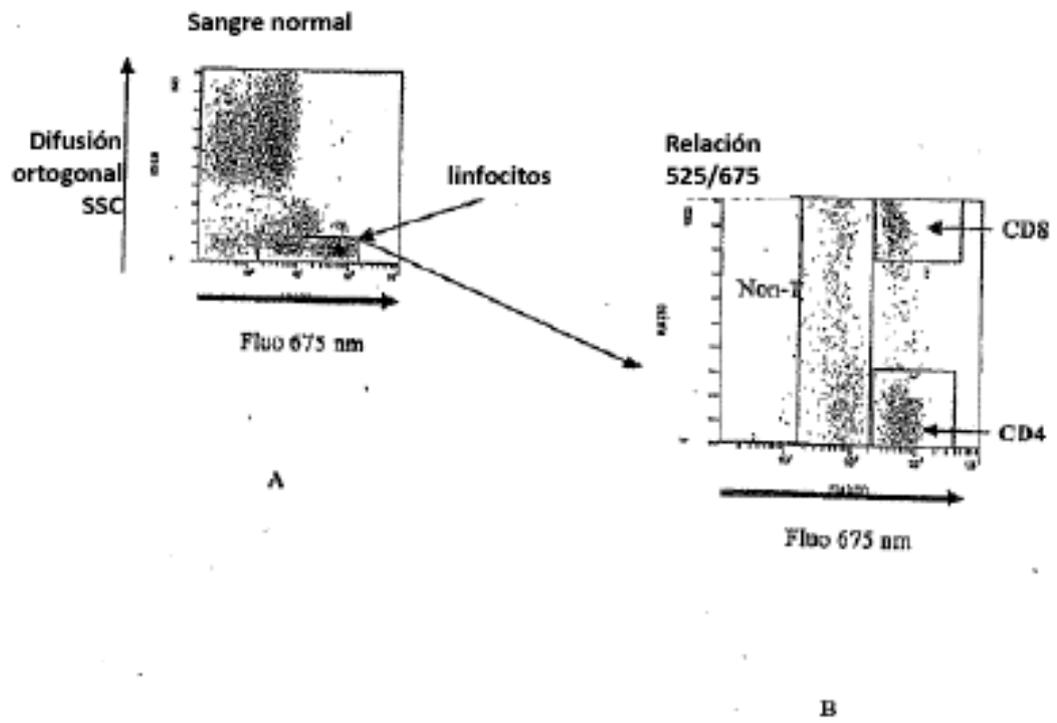


Figura 4