



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 524**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02290387 .6**

96 Fecha de presentación : **18.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1239283**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54 Título: **Procedimiento para la identificación y el recuento de células biológicas.**

30 Prioridad: **23.02.2001 FR 01 02489**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es: **ABX**
Parc Euromedécine
128, rue du Caducée, B.P. 7290
34181 Montpellier Cédex 4, FR

72 Inventor/es: **Lefevre, Didier;**
Veriac, Sylvie y
Champseix, Henri

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 524 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).

DESCRIPCION

La invención se refiere a los análisis biológicos y especialmente a los análisis de sangre.

Se refiere más particularmente a un reactivo y a un procedimiento para la identificación y el recuento de células biológicas en una muestra, en particular en una muestra de sangre.

5 La muestra biológica puede ser de sangre humana o animal, o también cualquier otro líquido biológico o preparación biológica.

10 En el campo de los análisis biológicos, la importancia del diagnóstico de la determinación y del recuento preciso de diferentes poblaciones celulares ha sido reconocida desde hace mucho tiempo. En efecto, la aparición de relaciones de equilibrio anormales entre poblaciones celulares normales de la sangre puede estar correlacionada con la aparición de ciertas enfermedades, por ejemplo reacciones inmunitarias, inflamatorias, etc. De la misma manera, la aparición de poblaciones celulares anormales puede estar correlacionada con la aparición de otras enfermedades, tales como las leucemias, etc.

15 Los métodos tradicionales de análisis citológico pueden ser variados y comprenden la observación microscópica después de coloración, y eventualmente sedimentación o agregación. La determinación automática de las células sanguíneas ha comenzado a principio de los años 1960 por la separación de las principales poblaciones leucocitarias normales; véase la referencia bibliográfica siguiente: (1) Hallerman L., Thom R., Gerhartz H.: "Elektronische Differentialzählung von Granulocyten und Lymphocyten nach intervaller Fluochromierung mit Acridinorange". Verh Deutsch Ges Inn Med 70: 217, 1964.

20 La separación de los leucocitos se ha realizado en citometría de flujo mediante la utilización de múltiples principios que implican las propiedades ópticas y químicas de las células. Se han fabricado varios autómatas de hematología, utilizando técnicas variadas, como el principio de Coulter para la determinación de los volúmenes, la medida de la luz difractada para la estimación de los tamaños, la medida de la luz difusa a 90° para la determinación de las estructuras internas de las células, y las medidas de fluorescencia o de absorción para la determinación de las afinidades celulares para diversos colorantes; véanse las referencias bibliográficas 2 a 5 siguientes:

25 (2) Adams L. R., Kamensky L. A.: "Fluorometric Characterization of Six Classes of Human Leukocytes". Acta Cytol 18: 389, 1974;

(3) Shapiro H. M. et al. "Combined Blood Cell Counting and Classification with Fluorochrome Stains and Flow Instrumentation" J. Histochem Cytochem 24. 396-411, 1976;

30 (4) Terstappen L. W. et al. "Multidimensional Flow Cytometric Blood Cell Differentiation Without Erythrocyte Lysis". Blood Cells 17: 585-602, 1991;

(5) Terstappen L. W., Levin J. "Bone marrow cell differential counts obtained by multidimensional flow cytometry" Blood Cells 18 (2): 311-30, 1992.

35 La caracterización de las células en las fases precoces del ciclo celular ha interesado desde hace mucho tiempo a los científicos y la cuantificación del contenido de ARN en cada célula se reconoce desde hace mucho tiempo como un parámetro representativo de este ciclo; véanse las referencias bibliográficas 2 a 5 anteriores y las referencias bibliográficas 6 y 7 siguientes:

(6) Traganos F., Darzynkiewickz Z., Sharpless T., Melamed M. R. "Simultaneous Staining of Ribonucleic and Deoxyribonucleic Acids in Unfixed Cells Using Acridine Orange in a Flow Cytofluorometric System" J. Histochem Cytochem 25: 46, 1997;

40 (7) Pollack A. et al. "Flow Cytometric Analysis of RNA Content in Different Cell Populations Using Pyronin Y and Methyl Green" Citometry, vol. 3, nº 1, pages 28-35, 1982.

En su patente francesa nº 97 01090 del 31 de enero de 1997, el solicitante ha descrito ya una composición, y más particularmente un reactivo de coloración, que permite este tipo de análisis.

45 Para automatizar tales técnicas, es necesario resolver previamente múltiples problemas como, especialmente, la reducción de los tiempos y del coste de tratamiento de las muestras. Esta reducción puede ser abordada de diferentes maneras, siendo la más evidente la reducción del número de canales para no efectuar más que una sola preparación celular a la vez. Este tipo de técnica ha sido descrita previamente por Léon W. Terstappen (referencia 4 anterior), pero necesita un tiempo de tratamiento y de análisis importante, especialmente para el recuento preciso de las células nucleadas cuya cantidad es normalmente mil veces más pequeña que la de las células eritrocitarias.

50 Normalmente, para paliar esto, la muestra biológica se divide frecuentemente al menos en dos alícuotas, de las cuales una se prepara a una cierta concentración que permita el estudio de las células eritrocitarias y de las plaquetas, y la otra se prepara a una concentración más alta para el análisis de las células nucleadas.

Estas técnicas conocidas presentan diferentes inconvenientes.

5 Previamente al análisis, el tratamiento de esta alícuota comprende frecuentemente la destrucción específica de las células eritrocitarias para facilitar la medida de las células restantes. Este método permite obtener más rápidamente los resultados de las observaciones, pero es frenado sin embargo por los tiempos de reacción, de transferencia y de coloración para obtener la preparación deseada.

El tiempo de incubación de una suspensión celular en una solución reactiva está especialmente ligado al tiempo que necesitan los principios activos para penetrar en el interior de las células. En la patente francesa 9701090 ya citada, el solicitante ha descrito medios para acelerar esta penetración gracias a la utilización de un aditivo, especialmente de un aditivo del tipo ionóforo, para ayudar a la penetración celular.

10 El documento EP0343380 utiliza dos colorantes para el recuento de las células biológicas nucleadas.

El tiempo de tratamiento varía igualmente en función del número de etapas sucesivas de deberá sufrir la alícuota. La lisis y la coloración de las células se llevan a cabo normalmente en dos etapas sucesivas, en un orden o en otro (véase la patente US 6.004.816).

15 Estas dos etapas de dilución implican un coste no despreciable en material, asociado con un tiempo de tratamiento mínimo importante.

El documento US5232857 utiliza un colorante que no colorea los ácidos nucleicos.

En consecuencia es un objetivo proponer un reactivo para la identificación y el recuento de las células biológicas que supere los inconvenientes citados anteriormente.

20 En particular es un objetivo proporcionar un reactivo semejante que permita efectuar simultáneamente la lisis de ciertas células, en particular de células eritrocitarias, la fijación de las células nucleadas y la coloración del material intracelular.

Igualmente es un objetivo proporcionar un reactivo semejante que permita realizar estas operaciones en un tiempo restringido para reducir de forma importante los costes y los tiempos de análisis, y el número de reactivos.

25 Se propone a este efecto un reactivo para la identificación y el recuento de las células biológicas en una muestra, que comprende:

- un agente de lisis celular elegido entre al menos un detergente en una concentración eficaz para lisar específicamente un tipo dado de células de la muestra, y

- un colorante apropiado para marcar los ácidos nucleicos intracelulares de las células restantes no lisadas.

30 Se proporciona así un reactivo de lisis y de coloración simultánea de una muestra biológica, lo que permite obtener en una sola etapa una solución de células que pueda ser analizada, por ejemplo por un sistema de citometría de flujo. Este análisis permite obtener una clasificación y un recuento de las células así tratadas.

De este modo, el reactivo combina una solución reactiva del tipo descrito en la patente francesa 97 01090 con un agente de lisis celular que permite lisar específicamente un tipo dado de células de la muestra, en particular las células eritrocitarias.

35 La solución reactiva colorante por sí misma, descrita en la patente francesa 97 01090, permite acelerar la permeación a través de la membrana para la coloración de las células biológicas de la muestra. Esta solución colorante se puede utilizar también tanto antes como después de la lisis de los hematíes según los tipos celulares a estudiar. De este modo, el principio reactivo de esta solución colorante se ha conservado y transportado al seno de una solución lítica, lo que permite una destrucción de los hematíes y una coloración de las células restantes previamente a la medida.

40 El agente de lisis celular comprende de forma ventajosa al menos un detergente iónico y/o no iónico en una concentración apropiada para lisar los eritrocitos.

El detergente de la invención se elige de forma ventajosa entre:

- las aminas primarias, los acetatos y los hidroclouros de aminas, las sales de amonio cuaternario y el bromuro de trimetilcetil-amonio;

45 - las amidas de diaminas sustituidas, la dietanolaminopropilamina o la dietilamino-propilamida, las amidas de dietilentriamina cicladas;

- los alquilaril-sulfonatos, sulfonatos de petróleo, glicéridos sulfonados;

- las colamidas, las sulfobetaínas;

- los alquil-glucósidos, las saponinas;
- los éteres de polioxietileno y sorbitanes, y los éteres de poliglicol.

En un ejemplo de realización, este detergente comprende una mezcla de Triton X100 a una concentración de 0,05 % (p/v) y de Tween 20 a una concentración de 0,0001 % (p/v).

5 En toda la descripción, la expresión "p/v" significa "peso/volumen" y la expresión "v/v" significa "volumen/volumen".

El colorante utilizado es de forma ventajosa de tipo fluorescente.

De forma ventajosa, se elige un colorante que es apropiado para asociarse específicamente con el ácido ribonucleico intracelular y para aumentar su fluorescencia, una vez asociado al mismo.

10 El colorante de la invención se puede elegir especialmente entre los siguientes colorantes:

- naranja de tiazol o p-tosilato de 1-metil-4-[(3-metil-2-(3H)-benzotiazoliliden)metil]quinolinio,
- azul de tiazol,
- diyoduro de 4-[(3-metil-2-(3H)-benzotiazoliliden)metil]-1-[3-(trimetilamonio)propil]quinolinio,
- yoduro de 3,3'-dimetiloxacarbocianina o yoduro de 3-metil-2-[3-(3-metil-2-(3H)-benzoxazoliliden)-1-propenil]benzoxazolío,
- 15 - tioflavina T,
- los colorantes SYTO® y TOTO® (TM Molecular Probes),
- bromuro de etidio,
- yoduro de propidio,
- 20 - naranja de acridina,
- corifosfina O,
- auramina O,
- los colorantes HOECHST 33258 y HOECHST 33342,
- 4',6-diamino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI),
- 25 - 4',6-(diimidazolin-2-il)-2-fenilindol, dihidrocloruro (DIP1),
- 7-aminoactinomicina D,
- actinomicina D, y
- LDS 751.

30 En una forma de realización preferida de la invención, el reactivo comprende además al menos un agente de penetración a través de la membrana apropiado para favorecer la penetración del colorante en las células a marcar.

El agente que favorece la penetración a través de la membrana es de forma ventajosa un compuesto ionóforo de tipo protonóforo y/o antibiótico.

Este agente está generalmente presente a una concentración inferior a 0,005 % (p/v). Un ejemplo de antibiótico utilizable es la valinomicina.

35 Es ventajoso que el reactivo comprenda además, al menos un agente de fijación en la membrana presente a una concentración de 0,1 % a 10 % (p/v). Este agente de fijación comprende, con preferencia, al menos un alcohol y/o un aldehído. Para este fin, se prefiere utilizar, por ejemplo, el paraformaldehído o el glutaraldehído.

Entra igualmente en el marco de la invención el prever otros aditivos o componentes en el reactivo.

40 De este modo, el reactivo puede comprender, además, al menos un compuesto elegido entre un agente complejante, una sal inorgánica y un sistema tampón.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la identificación y el recuento de células biológicas en una muestra, en particular en una muestra de sangre, el cual comprende las siguientes operaciones:

- 5 - mezclar e incubar la muestra con un reactivo tal como se ha definido antes para realizar, en una sola etapa, la lisis de células de un tipo dado, en particular de células eritrocitarias, la coloración de los ácidos nucleicos intracelulares y la fijación de las células nucleadas;
- medir la solución resultante en citometría de flujo con al menos dos parámetros de medida elegidos entre el volumen resistivo, la difracción luminosa en el eje, la transmisión luminosa en el eje, la difusión luminosa ortogonal y la fluorescencia; y
- 10 - clasificar y contar las células nucleadas en poblaciones, por medio de los parámetros medidos.

10 En la medida en citometría de flujo, el parámetro de difracción luminosa en el eje es al menos un parámetro elegido entre la difracción de ángulos pequeños y la difracción de ángulos grandes.

15 Esta medida se puede realizar por medio de un citómetro de flujo que tiene parámetros convencionales tales como la difracción en el eje o "FSC" (dispersión frontal), la difusión ortogonal o "SSC" (dispersión lateral), la fluorescencia ya sea ortogonal (FLI), ya sea en el eje, ya sea en epi-fluorescencia, toda polarizada o despolarizada, pero igualmente parámetros de medida adicionales tales como la medida de luz transmitida o la volumetría por resistividad, tales como las descritas en la patente francesa 89 14120 del 27 de octubre de 1989.

La resistividad se puede medir por medio de una corriente continua (DC) con el fin de expresar el volumen de los elementos y/o por medio de una corriente de pulsos o alternativa (RF) con el fin de expresar las diferencias densimétricas internas acercándose a la determinación de la estructura.

20 De estos parámetros, se pueden extraer conjuntos de informaciones multiparamétricas para cada una de las células analizadas, lo que permite su clasificación. La clasificación será por tanto más precisa cuando los parámetros que definen las células sean pertinentes y numerosos. Este tipo de estudio multiparamétrico ha sido descrito ya precedentemente (véanse las referencias bibliográficas 4 y 5 citadas anteriormente).

25 En el marco de la invención, las células nucleadas clasificadas son indiferentemente células maduras o inmaduras, normales o anormales.

La clasificación de las células nucleadas se efectúa por procedimientos conocidos. Se puede realizar por un programa de análisis multidimensional con o sin el recurso a una técnica neuronal programada o no.

En el marco de la invención, la muestra biológica puede ser una muestra de sangre humana o animal, o incluso una muestra de líquido biológico o una suspensión de células, de origen humano o animal.

30 Esta muestra se mezcla con la solución reactiva en condiciones de temperatura definidas. La cinética de la reacción hace que las células eritrocitarias se destruyen en primer lugar, que se ayude a la penetración del colorante en paralelo a la fijación de las células que se hace más lentamente.

La invención será descrita ahora en referencia al siguiente ejemplo:

Ejemplo

35 En el marco de este ejemplo, se utiliza un reactivo que tiene la siguiente composición:

Agente complejante	EDTA	0,02 %	(p/v)
Sal inorgánica	NaCl	0,85 %	(p/v)
Sistema tampón	Fosfatos	0,5 %	(p/v)
Detergentes	Tritón X100	0,05 %	(p/v)
	Tween 20	0,0001 %	(p/v)
Ionóforo	Valinomicina	0,003 %	(p/v)
Colorante	Naranja de tiazol	0,005 %	(p/v)
Aldehído	Paraformaldehído	1 %	(p/v)

Una muestra de sangre total se mezcla con la solución reactiva anterior. Después de una incubación de algunos segundos (típicamente del orden de 15 a 30 segundos), se analiza la solución por medio de un conjunto de

citometría de flujo que comprende al menos los siguientes parámetros: difracción en el eje (FSC) que da una interpretación del tamaño, difusión ortogonal (SSC) que expresa la estructura de los elementos observados y fluorescencia ortogonal (FLI) que permite medir la expresión del ácido ribonucleico intracelular.

5 Los resultados obtenidos de esta manera se observan en modo multidimensional, con el fin de determinar las inter-relaciones de las diferentes poblaciones entre cada parámetro.

Se refiere ahora a las Figuras 1 a 4 que representan los resultados obtenidos con una muestra de sangre humana normal.

10 La Figura 1 representa la matriz obtenida por medio de los dos parámetros de difracción en el eje (FSC) y de difusión ortogonal (SSC). Se separan claramente cuatro poblaciones: L que representa los linfocitos, M que representa los monocitos, N que representa los neutrófilos polinucleares y E que representa los eosinófilos polinucleares. Se indican las poblaciones IG para los granulocitos inmaduros, BL para los blastos, B para los basófilos polinucleares y ErB para los eritoblastos, pero no son dissociables en sólo dos dimensiones.

15 La Figura 2 representa la matriz formada por los parámetros de difracción en el eje (FSC) y de fluorescencia (FLI). Se encuentran las mismas cuatro poblaciones representadas en la Figura 1, pero organizadas de forma diferente. Las células mononucleadas L y M forman el grupo superior de fluorescencia media y las células polimorfonucleadas N, E y B forman el grupo inferior de fluorescencia débil. La población ErB de los eritoblastos está claramente separada en la punta de los dos grupos así formados. Se indican los emplazamientos normales de las poblaciones BL e IG.

20 La Figura 3 representa la matriz formada por los parámetros de difusión ortogonal (SSC) y de fluorescencia (FLI). Se encuentran las mismas poblaciones organizadas de forma diferente pero que permiten aislar las poblaciones IG y BL (en muy pequeñas cantidades en una muestra normal).

La Figura 4 representa una visión tridimensional de las poblaciones obtenidas.

Las Figuras 5 a 8 representan los mismos tipos de resultados que las Figuras 1 a 4 respectivamente, pero obtenidos con una muestra que presenta células blásticas (B1) y que ha sido tratada de acuerdo con la invención.

25 Las Figuras 9 a 12 representan los mismos tipos de resultados que las Figuras 1 a 4 respectivamente, pero obtenidos con una muestra que presenta células granulocitarias inmaduras (IG) y que ha sido tratada de acuerdo con la invención.

El reactivo y el procedimiento de la invención permiten de este modo, en una sola etapa, realizar una lisis específica y una coloración simultánea de las células biológicas en una muestra, en particular en una muestra de sangre humana o animal.

30 Se puede obtener así rápidamente una identificación y un recuento de células a partir de un autómata de análisis basado en la citometría de flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la identificación y el recuento de células biológicas en una muestra, en particular en una muestra de sangre, caracterizado porque comprende las siguientes operaciones:

- 5 - mezclar e incubar la muestra con un reactivo que comprende 1) un agente de lisis celular elegido entre al menos un detergente iónico y/o no iónico en una concentración apropiada para lisar los eritrocitos, elegido entre las aminas primarias, los acetatos e hidroclouros de aminas, las sales de amonio cuaternario y el bromuro de trimetilcetil-amonio; las amidas de diaminas sustituidas, la dietanolaminopropilamina o la dietilamino-propilamida, las amidas de dietilentriamina cicladas, los glicéridos sulfonados; las saponinas, y 2) un colorante apropiado para marcar los ácidos nucleicos intracelulares de las células restantes no lisadas, para realizar, en una sola etapa, la lisis de células de un tipo dado, en particular de células eritrocitarias, la coloración de los ácidos nucleicos intracelulares y la fijación de las células nucleadas;
- 10 - medir la solución resultante en citometría de flujo con al menos dos parámetros de medida elegidos entre el volumen resistivo, la difracción luminosa en el eje, la transmisión luminosa en el eje, la difusión luminosa ortogonal y la fluorescencia; y
- 15 - clasificar y contar las células nucleadas en poblaciones, por medio de los parámetros medidos.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el colorante es de tipo fluorescente.

3. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque el colorante es apropiado para asociarse específicamente con el ácido ribonucleico intracelular y aumentar su fluorescencia, una vez asociado al mismo.

- 20 4. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el colorante se elige entre:

naranja de tiazol o p-tosilato de 1-metil-4-[(3-metil-2-(3H)-benzotiazoliliden)metil]quinolinio,

azul de tiazol,

diyoduro de 4-[(3-metil-2-(3H)-benzotiazoliliden)metil]-1-[3-(trimetilamonio)propil] quinolinio

- 25 yoduro de 3,3'-dimetiloxacarbocianina o yoduro de 3-metil-2-[3-(3-metil-2-(3H)-benzoxazoliliden)-1-propenil]benzoxazolío,

tioflavina T,

los colorantes SYTO® y TOTO® (TM Molecular Probes),

bromuro de etidio,

yoduro de propidio,

- 30 naranja de acridina,

corifosfina O,

auramina O,

los colorantes HOECHST 33258 y HOECHST 33342,

4',6-diamino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI),

- 35 4',6-(diimidazolin-2-il)-2-fenilindol, dihidrocloruro (DIP1),

7-aminoactinomicina D,

actinomicina D, y

LDS 751.

- 40 5. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el reactivo comprende además, al menos un agente de penetración a través de la membrana apropiado para favorecer la penetración del colorante en las células a marcar.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el agente que favorece la penetración a través de la membrana es un compuesto ionóforo de tipo protonóforo y/o antibiótico.

7. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el reactivo comprende además, al menos un agente de fijación en la membrana presente a una concentración de 0,1 % a 10 % (p/v).
8. El procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el agente de fijación en la membrana comprende al menos un alcohol y/o un aldehído elegido entre el paraformaldehído y el glutaraldehído.
- 5 9. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el reactivo comprende además, al menos un compuesto elegido entre un agente complejante, una sal inorgánica y un sistema tampón.
10. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la medida de resistividad se efectúa por medio de al menos una corriente elegida entre una corriente continua (DC) y una corriente de pulsos o alternativa (RF).
- 10 11. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el parámetro de difracción luminosa en el eje es al menos un parámetro elegido entre la difracción de ángulos pequeños y la difracción de ángulos grandes.
12. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque las células nucleadas clasificadas son indiferentemente células maduras o inmaduras, normales o anormales.
- 15 13. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque la calificación de las células nucleadas se realiza mediante un programa de análisis multidimensional con o sin el recurso a una técnica neuronal programada o no.
14. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la muestra es una muestra de sangre humana o animal.
- 20 15. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque la muestra es una muestra de líquido biológico o una suspensión de células, de origen humano o animal.

FIG. 1

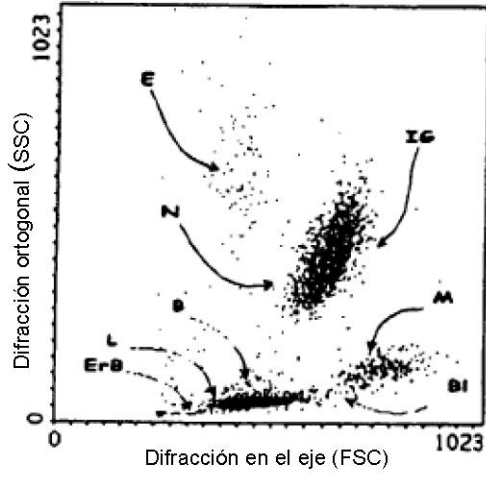


FIG. 2

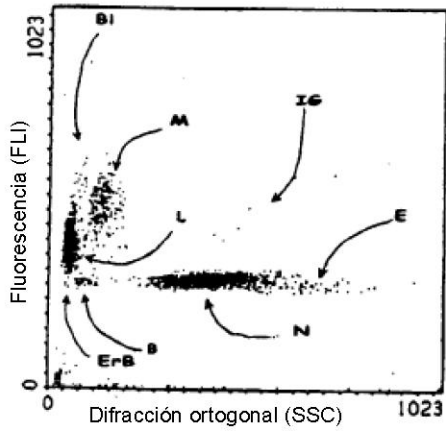
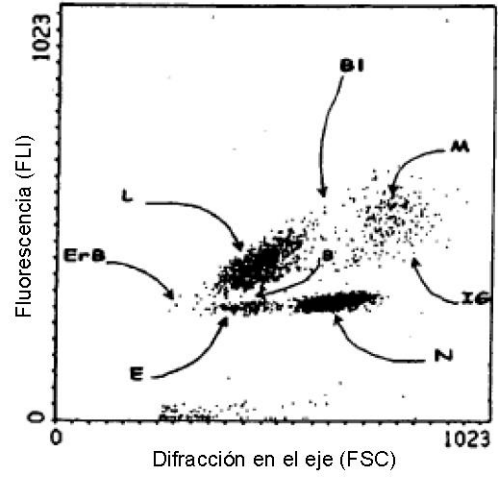


FIG. 3

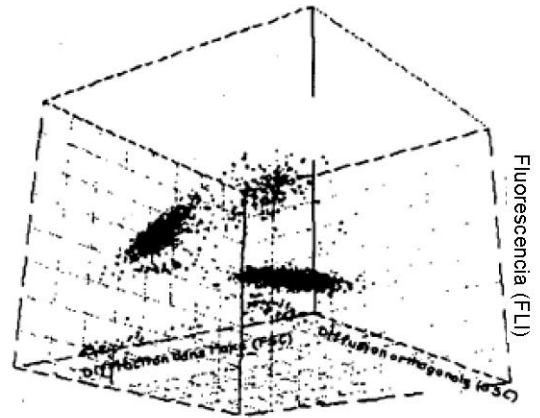


FIG. 4

FIG. 5

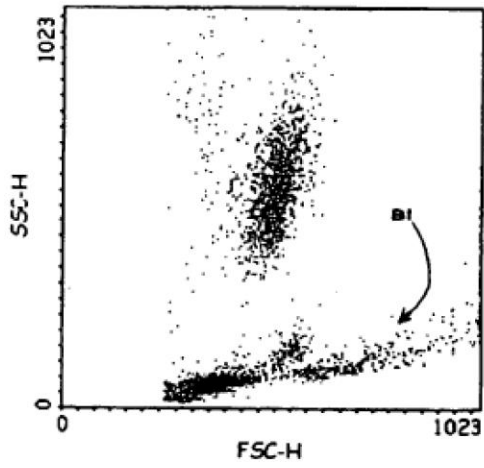


FIG. 6

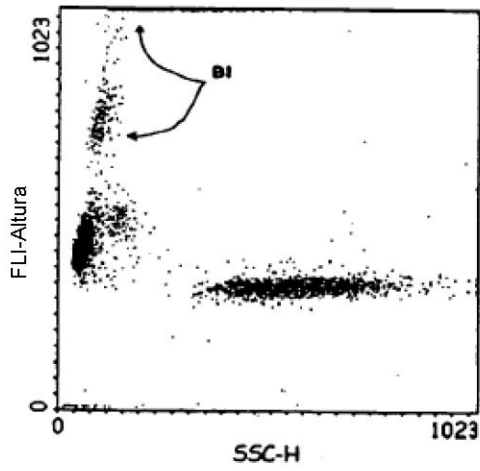
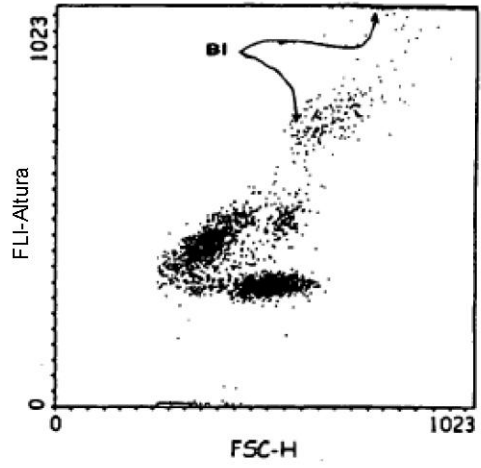


FIG. 7

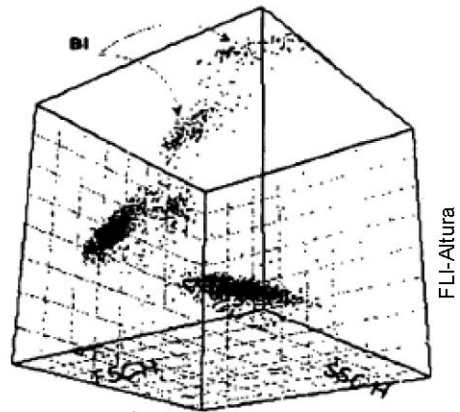


FIG. 8

FIG. 9

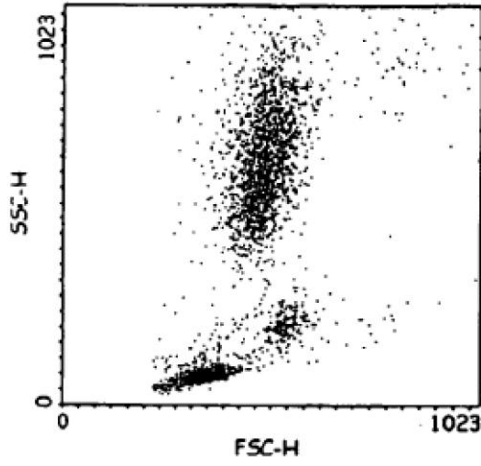


FIG. 10

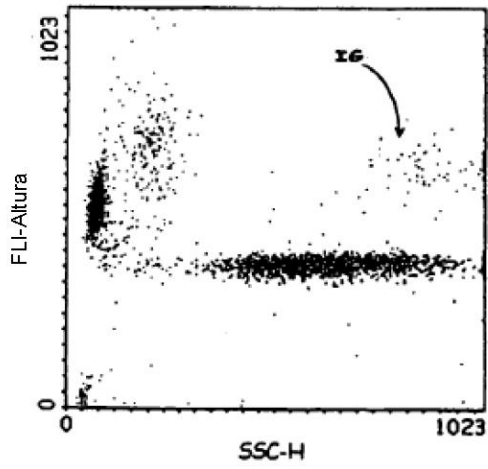
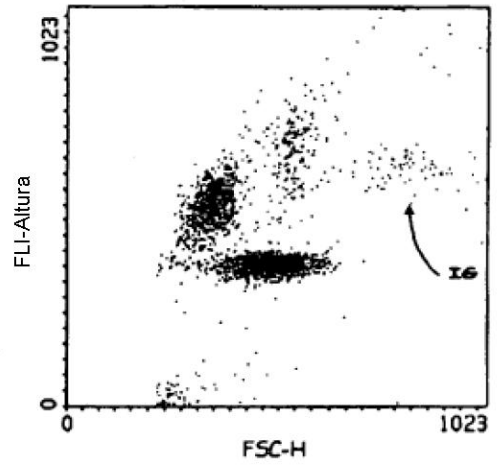


FIG. 11

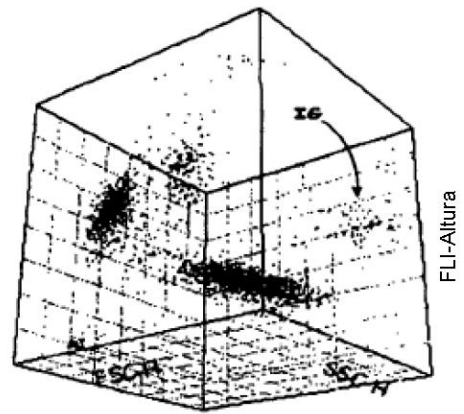


FIG. 12