

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 194**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2007 E 07762764 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 1982193**

54 Título: **Sistema de clasificación de células**

30 Prioridad:

31.01.2006 US 763962 P

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

29.08.2013

73 Titular/es:

**POINT CARE TECHNOLOGIES (100.0%)
181 CEDAR HILL STREET
MARLBOROUGH, MA 01752, US**

72 Inventor/es:

HANSEN, W., PETER

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 421 194 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

Sistema de clasificación de células

5 **Referencia cruzada con la solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos número 60/763.926, presentada el 31 de enero del 2006.

10 **Campo de la invención:**

La descripción se refiere al campo de ensayos biológicos donde las células pueden clasificarse y cuantificarse usando citometría de flujo y otros equipos ópticos. Más específicamente, la descripción se refiere al campo de control de calidad del recuento de subpoblaciones de células sanguíneas por citometría de flujo cuando las subpoblaciones de células sanguíneas se identifican uniéndose a anticuerpos marcados a antígenos de superficie celular. Estos resultados denominados "inmunoematológicos" se usan más frecuentemente para tratar el VIH/SIDA y prescribir su farmacoterapia. El alcance de protección se define en las reivindicaciones.

20 **Antecedentes:**

En el momento de la presente invención, aproximadamente 50 millones de personas en todo el mundo están infectadas por el VIH, muchas de las cuales están en una fase de su enfermedad en la que desde el punto de vista médico se ha indicado farmacoterapia antirretroviral. La estadificación de la enfermedad del VIH se realiza contando células inmunes específicas en sangre varias veces al año. El número de estas células disminuye progresivamente en un lapso de muchos años hasta un nivel donde la inmunidad se deteriora y se producen infecciones oportunistas letales. Desde el punto de vista médico a esta afección se la conoce como SIDA.

Cuando para comprobar células inmunes específicas en sangre se usa recuento celular y los resultados se usan para medir el tiempo de la administración de la terapia antirretroviral, el procedimiento es 90% satisfactorio el establecer una remisión que dura varios años. Sin embargo esta tasa de remisión solo es de aproximadamente el 20%. Ahora se trata de un axioma incuestionable de que el recuento de células inmunitarias debe dirigir la terapia antirretroviral en el tratamiento del VIH.

Se calcula que el 95% de los individuos infectados por el VIH viven en regiones en las que no existe personal de laboratorio cualificado. Se requiere utilizar "citómetros de flujo" que son equipos usados para realizar el recuento de las células inmunitarias. Las agencias reguladoras clasifican a los citómetros de flujo como sistemas muy complejos porque requieren muchas etapas manuales cualificadas para preparar las muestras de sangre de los pacientes y son mecánica y electrónicamente inestables, lo que precisa un ajuste minucioso a lo largo del día. El tiempo de formación de un técnico de citometría de flujo se mide en años. La tasa a la cual la epidemia infecciosa del VIH ha desarrollado y establecido un índice de mortalidad que se calcula ahora que es de 6.000 al día, ha sobrepasado todos los esfuerzos para crear el suficiente número de técnicos y centros de citometría de flujo en las zonas del mundo menos desarrolladas.

La automatización con comprobaciones hardware y software internas, tales como las desarrolladas por el sistema PointCare AuRICA (PointCare Technologies, Inc., Marlborough, MA Estados Unidos), ha eliminado todas las etapas manuales necesarias para preparar muestras de análisis de citometría de flujo. Esto tendría un mayor impacto a formativo necesario utilizar citómetros de flujo si no fuese por otros dos problemas complicados. El primero es la formación de técnicos para usar materiales denominados de control externo (muestras de sangre artificial o sustitutiva analizadas) para verificar que el citómetro de flujo está funcionando realmente dentro de las especificaciones al principio y/o al final de cada día. El segundo es que estos materiales de control externo requieren una "cadena de frío" interrumpida durante su envío y conservación. El mantenimiento de una cadena de frío requiere formación e infraestructura de equipos de refrigeración que generalmente no existen en las zonas rurales en desarrollo. El camino crítico para desarrollar un citómetro de flujo que pueda usar el personal con una mínima formación en zonas con escasos recursos radica en la eliminación de materiales de control externos.

En ensayos de estado inmunitario, el papel principal de los materiales de control externos es garantizar que los anticuerpos, inestables, sensibles a la temperatura, que se usan como reactivos que se unen a antígenos de superficie celular y que clasifican células para el recuento, hayan conservado su capacidad de unión química. No basta con saber que se usa la concentración correcta del anticuerpo como reactivo. De hecho, tanto la concentración como la actividad de unión deben garantizarse para este reactivo clave. Los anticuerpos son proteínas termolábiles fácilmente vulnerables después de algunas horas en un laboratorio sin aire acondicionado. Cuando esto sucede, los recuentos celulares por citometría de flujo resultarán ser erróneos.

El principal problema con los controles externos en gran parte del mundo es que, al igual que los anticuerpos, son sensibles a la temperatura. Requieren distribuirse en condiciones de refrigeración y rara vez duran más de un mes, incluso en condiciones de refrigeración, una vez que se ha abierto el envase. No siempre se dispone de refrigeración fiable y esto crea problemas logísticos en clínicas lejanas y se requiere personal logístico bien formado en la clínica.

En segundo lugar, los controles externos son costosos. Algunas pequeñas clínicas necesitan invertir más dinero para ejecutar controles externos que para ejecutar muestras de pacientes. En tercer lugar, la calidad solo se garantiza en muestras de pacientes ejecutadas durante un tiempo específico después de ejecutar una muestra de control externo. Sería ventajoso si se garantizase la calidad en cualquier muestra del paciente independientemente de cuando se realice su ejecución.

El objeto de la presente descripción es un método y un equipo que usa las células sanguíneas del propio paciente durante la ejecución de la muestra en lugar de materiales de control externos, sustitutivos, para comprobar la concentración y actividad de los anticuerpos.

Las células sanguíneas que se usan como un "control interno" no son las que se reducen en número durante el avance de la enfermedad del VIH. Las células de control interno son una clase de células inmunitarias que incluyen los mismos sitios de unión para los anticuerpos que los de la clase de células inmunitarias cuya población está afectada por el VIH. Estas células proporcionan un medio para comprobar la concentración y actividad de los anticuerpos que es independiente de la enfermedad y evita el coste de materiales de control externos. Adicionalmente ofrece la ventaja de proporcionar una comprobación de "material de control interno" simultánea, durante cada ejecución de la muestra de un paciente; una opción que no es factible ni desde el punto de vista económico ni desde el punto de vista técnico con materiales de control externo.

Sumario de la invención

Las clases principales de leucocitos circulantes son linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Cada una de ellas participa en diversos mecanismos complejos de defensa de enfermedades, y las desviaciones, desde una afección sin enfermedad o normal, en cuanto a la relación de números relativos entre los subconjuntos está muy correlacionada con patologías específicas. Durante la evolución del avance del VIH a SIDA declarado, se destruye una subclase de linfocitos creando eventualmente un estado inmunocomprometido donde el paciente es vulnerable a diversas infecciones oportunistas y a cáncer que se demuestra que es letal.

La subclase de linfocitos destruida por infección del VIH es una que incluye 94.000 ± 28.000 receptores de superficie por célula, conocida como receptor CD4 (Bikoue, A., et al, Cytometry 1996; 26: 137). Con esta subclase se han relacionado diversos nombres siendo el más común el de la subclase de "linfocitos T auxiliares" y el de la subclase de "linfocitos CD4+". En el momento de la presente invención, un paciente infectado por VIH pasa al estado clínico de "SIDA declarado" cuando el recuento de linfocitos T auxiliares desciende a $200/\mu\text{l}$. Después de esto la defensa inmunitaria del paciente está casi perdida y sobreviene la muerte a partir de una infección oportunista irreversible (por ejemplo tuberculosis) o cáncer (sarcoma de Kaposi).

Sin embargo, la clase de leucocitos circulantes realmente infectada por el virus (VIH) real, son los monocitos y no los linfocitos. Las rutas indirectas de señalización intercelular que actúan entre monocitos infectados y linfocitos T auxiliares ocasionan la destrucción de los linfocitos T auxiliares (Fantuzzi, L., Leuk. Biol. 2003; 74: 719). Aunque los monocitos pueden contener el virus, sus números no están afectados por el virus.

Dos hechos son importantes para la presente descripción. En primer lugar, todos los monocitos incluyen el mismo receptor de superficie CD4 que el de los linfocitos T auxiliares. Un hecho secundario es que en los monocitos el número de receptores CD4 es de 34.000 ± 10.000 por célula (Bikoue, A., et al, Cytometry 1996; 26: 137) que es menor que el de los linfocitos. En segundo lugar, el número de monocitos permanece esencialmente constante y el número de receptores CD4 en los monocitos también permanece esencialmente constante durante la evolución de la infección por el VIH.

La presente divulgación implica la reacción de un inmunoconjugado CD4 con una muestra de sangre entera del paciente. El inmunoconjugado CD4 consiste en uno o más anticuerpos con especificidad por el receptor de superficie CD4 acoplado a un resto de señal, o "marcador", que es detectable por un citómetro de flujo. Dichos marcadores pueden generar una señal a través de medios tales como propiedades de fluorescencia, propiedades de dispersión de luz, propiedades electrónicas o propiedades magnéticas. El inmunoconjugado CD4 se une a los linfocitos CD4 positivos (linfocitos T auxiliares) y a todos los monocitos. Se emplean medios de detección diferenciales para contar linfocitos T auxiliares marcados con inmunoconjugado. La presente descripción se diferencia por sí misma midiendo simultáneamente el nivel de señal a partir de monocitos como un medio para verificar una actividad suficiente del anticuerpo anti-CD4.

Descripción detalla de la invención y ejemplos.

Dado que se seleccionan entidades individuales de inmunoconjugados (anticuerpos más marcador) a partir de la mezcla de reacción por un proceso de difusión, éstas se unen al azar a linfocitos o monocitos. Esto significa que no hay una diana de unión preferida y que puede usarse un muestreo de la eficacia de unión de anticuerpos a monocitos como un indicador objetivo para inferir en la eficacia de unión de anticuerpos a linfocitos cuando ambas rutas de unión se producen simultáneamente en la misma mezcla de reacción.

En la Figura 1ab se ilustra un ejemplo de este método. Se estableció una citometría de flujo de búsqueda

convencional (Beckman Coulter Epics) y se usó de la siguiente manera. Se dejó que los detectores de dispersión lumínica detectasen la dispersión a un ángulo directo bajo (cono estrecho de luz centrado a ~2 grados del eje) y a un ángulo sustancialmente recto (cono ancho de luz centrado a 90 grados del eje). Se usó una presentación de datos de "diagrama de puntos" de citometría de flujo, de dos parámetros, convencional para interpretar y analizar los datos (Figura 1ab). La fuerza de la señal de dispersión directa (FS, *Forward Scatter*) de cada célula se registró en el eje Y de la Figura 1ab y la fuerza de la señal de dispersión en ángulo recto (SS, *Side Scatter*) de cada célula se registró en el eje X. Los puntos en el diagrama gráfica son las coordenadas X-Y de la fuerza de la señal de cada célula.

El ejemplo de la Figura 1ab se usó una muestra de sangre entera de un donante humano sano. En la Figura 1a, los eritrocitos se eliminaron por lisis y la muestra se ejecutó sin inmunoconjugado. La siguiente interpretación es muy conocida en la técnica (Shapiro, H.; *Practical Flow Cytometry*, Ed. 4, Wiley-Liss, pág. 483). Se observan tres grupos de puntos (señales de células). El grupo ovalado, aproximadamente vertical en la parte izquierda inferior solo contiene linfocitos. El grupo difuso y menos denso en la parte superior derecha de los linfocitos solo contiene monocitos. El grupo ovalado aproximadamente horizontal solo contiene granulocitos.

En la Figura 1b, se ejecutó de nuevo la misma muestra, pero esta vez después de reaccionar con un "inmunoconjugado con oro". Este conjugado consiste en partículas de oro coloidales de un diámetro de aproximadamente 80 nm cubiertas con anticuerpos monoclonales de ratón específicos contra el receptor CD4. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Número 20040246480 describe el uso de estos conjugados para la detección y recuento de linfocitos T auxiliares. Como se ha explicado en esta solicitud de patente, se crea un segundo grupo ovalado por estos linfocitos que tienen unido el inmunoconjugado de oro a la superficie celular. Dicha unión crea una dispersión en ángulo recto (SS) sustancialmente aumentada y un cambio más pequeño de dispersión directa (FS). *Janossy et. Al. 2002 divulgan recuentos de células CD4 usando controles externos.

También haciendo referencia a la Figura 1b, es evidente que todos los monocitos también se han unido al inmunoconjugado de oro lo cual se pone de manifiesto por el hecho de que todo el grupo de monocitos se ha desplazado hacia la derecha a lo largo del eje SS. La posición del eje X original del grupo de monocitos no marcado fue $X = 260$, y la posición desplazada fue $X = 450$. La relación de posiciones X fue por lo tanto $(450/260) = 1,73$.

Por comparación, el grupo de linfocitos se desplazó de $X=108$ a $X=428$. La proporción de posiciones X fue por lo tanto $(428/108) = 3,96$.

Por último, se observa que la proporción del desplazamiento de monocitos con respecto al desplazamiento de linfocitos que es $(1,73/3,96) = 0,44$ se compara favorablemente con la proporción de receptores CD4 en monocitos con respecto a linfocitos $(34.000/94.000) = 0,36 \pm 0,15$ (El error típico de esta proporción se calculó distribuyendo los errores independientes en las mediciones indicadas anteriormente de números de antígenos CD4 para linfocitos y monocitos en la bibliografía). Esto indica que el grado de desplazamiento está relacionado con el número de sitios de unión al antígeno de estas dos poblaciones celulares.

Este ejemplo ilustra el desplazamiento en el grupo de monocitos producido por la unión de conjugados de anticuerpo anti-CD4. Adicionalmente la magnitud de desplazamiento del grupo de monocitos con respecto al desplazamiento de linfocitos se compara bien con la proporción del número de inmunoconjugados de oro calculado a partir de la bibliografía para unirse a monocitos y linfocitos respectivamente.

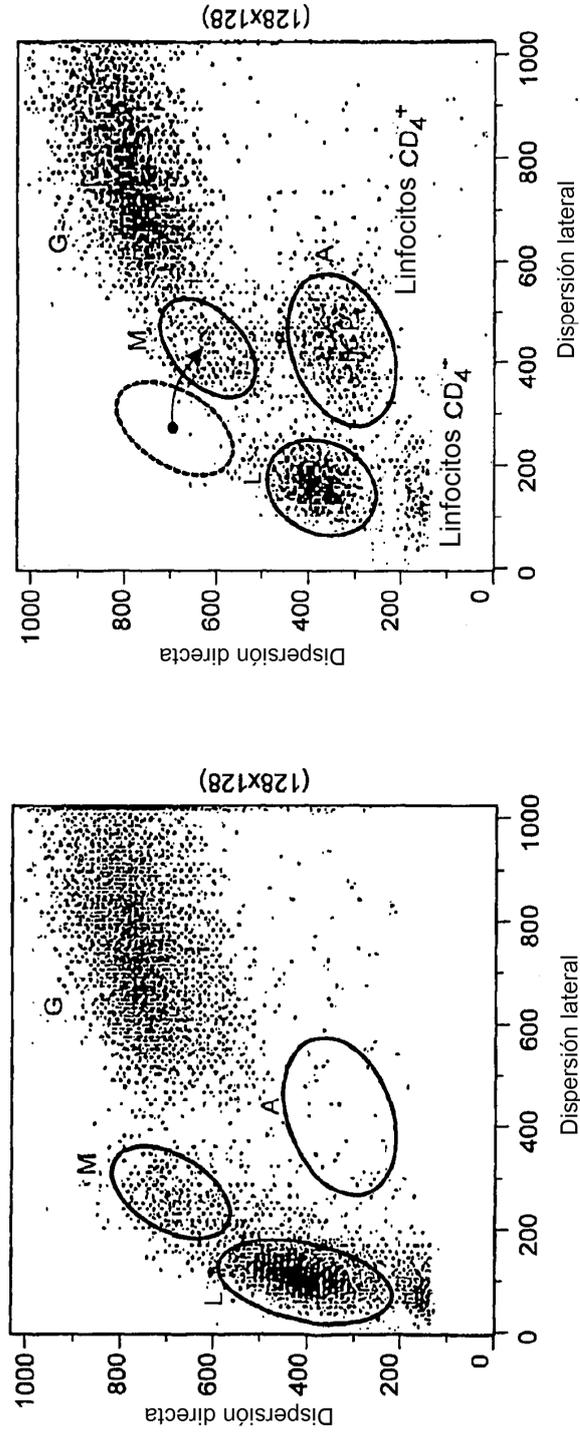
También es posible usar la posición relativa (en lugar de la posición absoluta) del grupo de monocitos con respecto a otros grupos como un medio para comprobar la unión de anticuerpos anti-CD4 a monocitos. En el ejemplo anterior y con referencia a la Figura 1, la posición del grupo de monocitos con respecto al de granulocitos (neutrófilos) cambia cuando los anticuerpos anti-CD4 se unen a los monocitos. La posición del grupo de granulocitos no está en sí misma afectada por la presencia de anticuerpos anti-CD4. Esto se debe a que prácticamente ningún granulocito (neutrófilo) incluye el receptor CD4. Por lo tanto la referencia para el grupo de monocitos puede ser el grupo de granulocitos invariable que obvia la necesidad de una medición de referencia sin anticuerpo anti-CD4. Este modo preferido ahorra tiempo para producir un resultado para el paciente.

Cabe destacar que estas observaciones pueden emplearse para comprobar la calidad de unión de los anticuerpos en un porcentaje muy elevado de muestras de pacientes incluso cuando los linfocitos T auxiliares se han eliminado completamente de la circulación en el SIDA avanzado. Los monocitos y granulocitos (neutrófilos) continúan circulando durante la evolución del SIDA y en la ilustración anterior es un ejemplo de cómo puede usarse como "detectores" para inmunoactividad con reactivo CD4.

Los ejemplos anteriores ilustran que el desplazamiento del grupo de monocitos con respecto a una referencia puede usarse como un control interno sin coste ni formación añadidos para comprobar la actividad del conjugado anticuerpo anti-CD4, prácticamente en cada muestra del paciente que se ejecuta. Esto es una mejora significativa sobre el uso de materiales de control externo que se ejecutan convencionalmente solo una vez al día. Los materiales de control externo son costosos y su ejecución más frecuente que una vez al día es económicamente prohibitiva en entornos con escasos (y ricos) recursos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de control de calidad interno para comprobar la calidad de unión de anticuerpos cuando el recuento de linfocitos CD4+ en una muestra biológica contiene dichos linfocitos CD4+, monocitos y granulocitos, comprendiendo el método las etapas de:
- 10 a) hacer reaccionar un reactivo que consiste al menos en un anticuerpo marcado específico contra los antígenos de superficie celular CD4 con una primera parte de la muestra;
- 10 b) analizar las primeras señales en forma de un primer diagrama de puntos de dichos anticuerpos marcados que ha reaccionado con los antígenos de superficie celular CD4 sobre los monocitos y linfocitos y determinar en su interior la posición de un grupo de monocitos marcado;
- 15 c) analizar las señales secundarias en forma de un segundo diagrama de puntos de una segunda parte no marcada de la muestra y determinar en su interior la posición de un grupo de monocitos no marcados y
- 15 d) determinar un desplazamiento de la posición del grupo de monocitos marcados con respecto a la posición del grupo de monocitos no marcados y de este modo comprobar la calidad de unión de los anticuerpos del anticuerpo marcado sin necesidad de un control externo.
- 20 2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, donde también se determina la posición de un grupo de granulocitos en dicho primer y segundo diagrama de puntos.
- 25 3. Un método como se reivindica en la reivindicación 2, donde el desplazamiento de la posición del grupo de monocitos marcados a partir de la posición del grupo de monocitos no marcados se determina con respecto a la posición del grupo de granulocitos.
- 30 4. Un método como se reivindica en la reivindicación 2, donde el desplazamiento de la posición del grupo de monocitos marcados a partir de la posición del grupo de monocitos no marcados se determina a partir de las posiciones X-Y respectivas de dichos grupos en el primer y segundo diagrama de puntos.
5. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, donde el marcador emite luz fluorescente o luz dispersa.
6. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, donde un citómetro de flujo proporciona la primera y segunda señal.



Muestra de sangre en la que los eritrocitos se han eliminado por lisis. Se observan grupos de Linfocitos (L), Monocitos (M), y Granulocitos (G). No se usó inmunocorjugado con oro.

FIG. 1A

Misma muestra de sangre que la de la FIG. 1A pero usando inmunocorjugado con oro para marcar receptores de superficie celular CD4. Los grupos de linfocitos se separan en linfocitos CD4⁻ y CD4⁺. Todo el grupo de monocitos está marcado y desplazado hacia la derecha (flecha).

FIG. 1B