

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 334**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2006 E 06710571 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1851545**

54 Título: **Recuento celular**

30 Prioridad:

25.02.2005 GB 0503941
25.02.2005 US 656267 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2015

73 Titular/es:

DAKO DENMARK A/S (100.0%)
PRODUKTIONSVEJ 42
2600 GLOSTRUP, DK

72 Inventor/es:

CHRISTENSEN, NANNA K.;
LAURSEN, JESPER y
WINTHER, LARS

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 533 334 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

Recuento celular

Campo

5 Esta invención se refiere a los campos de diagnóstico, ensayos, normalización y enumeración de partículas, en particular células. En particular, la invención se refiere a métodos y composiciones para identificar la concentración o el "recuento absoluto" (células por volumen unitario) de uno o más tipos celulares en una muestra.

Antecedentes

10 El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) infecta a células que expresan el receptor CD4 (De Wolf *et al.*, 1988, AIDS Res Hum Retroviruses 1988; 4:433-440) y, como resultado, reduce el número de linfocitos CD4 del huésped (Lang *et al.*, 1989, J Acquir Immune Defic Syndr 1989; 2:63-69). Esta reducción de linfocitos T CD4 se ha vinculado a la inmunopatogénesis de la infección por VIH y a la progresión de la enfermedad (Fahey *et al.*, 1990, N Engl J Med 1990; 322:166-172; Masur, 1989, Ann Intern Med 1989; 111:223-231).

15 Se ha incluido un recuento de CD4 \leq 200 células/ μ l como acontecimiento definitorio de SIDA (Centers for Disease Control. 1992B, Morbid Mortal Weekly Rep 1992; 41(RR-17):1-35), ya que estas mediciones son factores de pronóstico útiles para la aparición de enfermedades oportunistas tales como neumonía por *Pneumocystis carinii* (Centers for Disease Control. 1992A, Morbid Mortal Weekly Rep 1992; 41(RR-4):1-11). Con la llegada de la terapia antirretroviral altamente activa, se han usado las mediciones de linfocitos T CD4 para monitorizar la reconstitución inmunitaria (Autran *et al.*, 1997, Science 1997; 277:112-116).

20 La metodología propuesta actual para determinar los recuentos absolutos de linfocitos T CD4 depende de la identificación inmunofenotípica de células con anticuerpos monoclonales marcados fluorescentemente dirigidos contra el antígeno CD4. Se determinan los porcentajes relativos de células T CD4 con un citómetro de flujo. Se obtiene un recuento absoluto de CD4 multiplicando el porcentaje de linfocitos que son CD3+ CD4+ por el recuento absoluto de linfocitos determinado con un instrumento de hematología.

25 Sin embargo, el envío durante la noche de la sangre puede dar como resultado un aumento de la variabilidad intrínseca en el recuento absoluto de linfocitos dependiendo del instrumento de hematología que se use (Koepke y Landay 1989, Clin Immunol Immunopathol 1989; 52:19-2; Paxton *et al.*, 1993, Ann N Y Acad Sci 1993; 677:440-443). Por tanto, el recuento absoluto de CD4 en muestras durante la noche puede tener una variabilidad aumentada debido únicamente a los determinantes hematológicos.

30 Por tanto, la determinación del "recuento absoluto" de un tipo celular, es decir, el número de células en un volumen dado (concentración), es una consideración importante en el campo general de la citometría y en el campo del diagnóstico y la monitorización de VIH en particular.

35 La patente estadounidense número 4.110.604 describe un método y un aparato para determinar la concentración de partículas en un fluido, por ejemplo, plaquetas, a través del uso de una segunda partícula de "referencia" suspendida en el fluido (por ejemplo, glóbulos rojos). La partícula de "referencia" difiere en una característica física, por ejemplo, impedancia eléctrica, de la partícula de interés y está presente a una concentración o densidad predeterminada o determinable. Se cuenta el número de glóbulos rojos, así como el número de plaquetas. Entonces, conociendo o determinando el número de glóbulos rojos en una unidad de volumen dada, puede usarse una ecuación para llegar al número de plaquetas en el mismo volumen unitario. Alternativamente, podría incluirse una partícula de referencia en la muestra a una concentración conocida, y entonces se cuenta la partícula de referencia junto con las plaquetas.

40 Conociendo la concentración de las partículas de referencia, es posible determinar la concentración de plaquetas.

45 Un sistema de este tipo tal como se describe en el documento US 4.110.604 distingue entre las partículas basándose en sus características físicas, y no es susceptible de usarse para distinguir entre dos subpoblaciones del mismo tipo celular, por ejemplo células CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺. El uso de citometría de flujo y agentes de unión a células (que pueden unirse a marcadores celulares) supera parcialmente este problema. Por tanto, la necesidad de una monitorización precisa y reproducible de los niveles de linfocitos T CD4 en pacientes infectados con VIH ha conducido a varias compañías a desarrollar métodos más sencillos para medir los recuentos absolutos de linfocitos T CD4 y CD8 (Bene *et al.*, 1998; Denny *et al.*, 1995; Nicholson *et al.*, 1994; O'Gorman, *et al.*, 1997; Paxton, *et al.*, 1995).

50 La patente europea EP 0470810 describe un método para determinar los recuentos absolutos de una población de células dentro de una muestra por medio de citometría de flujo. El método hace uso de un tubo. El tubo puede comprender un diluyente, y la muestra se añade al tubo que contiene el diluyente. Se dice que el diluyente comprende una disolución de tampón isotónico tal como solución salina tamponada con fosfato, uno o más marcadores celulares que pueden marcar células en la población de interés, un fijador tal como paraformaldehído y un número conocido de micropartículas fluorescentes.

55 La memoria descriptiva del documento EP 0470810 prevé específicamente que el tubo pueda estar recubierto con

agentes de bloqueo tales como albúmina sérica bovina, caseína o gelatina para impedir la adhesión de los componentes del diluyente a las paredes del tubo, y que estos agentes de bloqueo puedan recubrirse sobre y secarse en el tubo usando un conservante tal como trehalosa.

5 En el método descrito en el documento EP 0470810, la muestra se añade al tubo, y se permite que las células se marquen con los marcadores celulares. Se fija un activador de fluorescencia para incluir esencialmente todas las micropartículas y células, y se fijan una o más compuertas de fluorescencia para distinguir entre ellas. Se cuenta el número de células que coinciden con o superan el activador de fluorescencia, y se multiplica el número de células por micropartícula para cada compuerta de fluorescencia por la concentración conocida de micropartículas para llegar al recuento absoluto de células por volumen unitario. Por tanto, el conocimiento del número de células para cualquier población y número de micropartículas proporciona una razón. Conocer el número de micropartículas por volumen unitario y luego multiplicar por la primera razón proporciona el número de células en una población por volumen unitario, es decir, el recuento absoluto de las células.

15 Sin embargo, el método descrito en EP 0470810 hace uso de tubos que contienen un gran volumen de diluyente, lo que da como resultado determinadas desventajas. El diluyente presente en los tubos descritos en el documento EP 0470810 necesita un tiempo de incubación prolongado y cantidades superiores de los agentes de unión a células (y por tanto un coste superior). Además, la presencia del diluyente impide una lisis eficaz de los eritrocitos. La lisis de los eritrocitos es un procedimiento recomendado por los Centres for Disease Control and Prevention (CDC), The European Working Group on Clinical Cell Analysis (EWGCCA) y The British Committee for Standards in Haematology (BCSH) para la enumeración de células positivas para CC3-CD4.

20 El porcentaje de células CD4⁺ con respecto a la población de linfocitos total no puede determinarse usando el método descrito en el documento EP 0470810 puesto que no hay ningún marcador incluido para los linfocitos totales. Esto es crucial en pacientes pediátricos en los que un recuento de CD4 no es suficiente para monitorizar la progresión de la enfermedad. Los niños menores de 5 años tienen niveles superiores de linfocitos positivos para CD4 que los adultos y por tanto es necesario un porcentaje de células CD4⁺ con respecto a los linfocitos totales para determinar si debe iniciarse el tratamiento. La monitorización estrecha de la infección por VIH es de particular importancia en niños, puesto que la infección puede curarse realmente en pacientes muy jóvenes.

Finalmente, el gran volumen del diluyente significa que los tubos descritos en el documento EP 0470810 no se adaptan fácilmente para su fabricación como componente desechable, lo que conduce a un precio superior.

30 Se conocen en la técnica recipientes desechables para el recuento absoluto de células. Tales recipientes comprenden alícuotas o partes dispensadas que contienen un número conocido, fijo de micropartículas por tubo. El conocimiento del número de micropartículas y, de manera crucial, el mantenimiento de este número dentro del tubo durante la manipulación (por ejemplo, antes de y durante la adición de la muestra), es esencial para la precisión de los recuentos obtenidos.

35 Se conoce por ejemplo, emplear recipientes desechables que contienen un número predeterminado de micropartículas. Por ejemplo, un sistema de recuento disponible comercialmente comprende tubos BD TruCOUNT (n.º de catálogo 340334, BD Biosciences San Jose, Calif.). Los tubos de recuento absoluto TruCOUNT contienen un sedimento liofilizado que se disuelve durante la preparación de la muestra, liberando un número conocido de perlas fluorescentes. El tubo comprende un elemento de retención de acero inoxidable en forma de una rejilla que está colocado cerca del extremo cerrado del tubo y por encima del sedimento liofilizado. El elemento de retención de acero inoxidable impide que el sedimento liofilizado se caiga del recipiente durante la manipulación de rutina (tal como por ejemplo, inversión o agitación del tubo), y por consiguiente mantiene el número predeterminado fijado de micropartículas en el tubo.

45 No obstante, sigue habiendo problemas con tales realizaciones. Estos surgen generalmente del hecho de que la liofilización da como resultado un sedimento, que es "esponjoso" y se rompe fácilmente con la manipulación. Específicamente, es crucial evitar la alteración del sedimento liofilizado durante la manipulación y adición de la muestra. Por tanto, las instrucciones de funcionamiento para los tubos TruCOUNT advierten específicamente contra la alteración del elemento de retención de acero y el sedimento que contiene las perlas, y aconsejan pipetear por encima del elemento de retención de acero inoxidable. Además, dependiendo del cabeceo de la rejilla de acero inoxidable, puede no ser totalmente eficaz en prevenir que partes del sedimento liofilizado se desprendan y caigan del tubo. Con el fin de minimizar la alteración del sedimento liofilizado y la rejilla, los tubos TruCOUNT tienen que envasarse en una bolsa protectora en una atmósfera controlada. Una vez que se ha abierto la bolsa protectora, el sedimento absorberá humedad y en consecuencia se contraerá. Cuando esto sucede, el sedimento corre el riesgo de caer a través de la rejilla. Por tanto, cuando se altera cualquiera del tubo, el sedimento o la rejilla, o se pierden partes, el recuento absoluto obtenido está potencialmente sujeto a error. Las instrucciones de funcionamiento para los tubos TruCOUNT establecen que los tubos deben descartarse si el sedimento se ha alterado de cualquier manera.

Otros problemas surgen de la naturaleza de las perlas empleadas en los tubos TruCOUNT. Éstas proporcionan una señal de dispersión frontal muy pequeña en el citómetro de flujo, y por tanto las perlas se observan en la misma área que los residuos de eritrocitos lisados o eritrocitos no lisados. Esto significa que no es posible usar un activador en el

parámetro de dispersión frontal puesto que éste o bien incluiría tanto perlas como residuos/eritrocitos o bien excluiría ambos. En lugar de tener que usarse un activador de fluorescencia, que es una desventaja, algunos usuarios prefieren usar un activador de dispersión en lugar de un activador de fluorescencia.

5 Además, es necesario optimizar cuidadosamente los métodos de recuento absoluto que emplean microperlas para mantener la precisión y coherencia (es decir, variabilidad de recuento a recuento) de los recuentos. Un problema principal es que no pueden contarse todas las perlas en la muestra mixta, es decir, el número real de perlas contadas con el citómetro de flujo es inferior al esperado a partir del número predeterminado presente en el tubo. Esto surge debido a la tendencia de las micropartículas a adherirse entre sí formando dobletes, tripletes, cuadrupletes, etc. Éste es un problema particular con las perlas usadas en los tubos TruCOUNT descritos anteriormente, en los que (dependiendo del lote) hay habitualmente un 5-10% de perlas múltiples en un tubo. Aunque esto puede compensarse en el valor de perla indicado, esto puede dar lugar a discrepancias en los recuentos absolutos.

15 Además de adherirse unas a otras, las micropartículas también tienden a adherirse a la superficie del recipiente. Finalmente, el citómetro de flujo no registra algunas partículas debido al tiempo muerto en la adquisición de la muestra. Estos factores se acrecientan provocando una discrepancia entre el número de perlas aplicadas al citómetro de flujo y el número de perlas registradas por los detectores del citómetro de flujo en los métodos de la técnica anterior.

20 Un problema adicional es la variabilidad entre recuentos, es decir, la coherencia de los recuentos obtenidos a través de procesamiento repetido. En otras palabras, es de la mayor importancia que la variación en el recuento entre muestras idénticas sea baja, es decir, que se obtenga un recuento similar cada vez que se mide una muestra particular. En este caso, la causa principal de la no reproducibilidad parece ser micropartículas que se adhieren a las paredes del recipiente en números variables.

25 La causa principal de esto es la "pegajosidad" de las micropartículas, es decir, la tendencia de las micropartículas a adherirse a otros componentes. Esto parece depender de la naturaleza del material del que están compuestas las micropartículas, y de las condiciones en el entorno en el que se cuentan. Variables tales como pH, fuerza iónica, hidrofobicidad y temperatura del medio de muestra pueden provocar y de hecho provocan que las micropartículas tengan una adhesividad aumentada. El recubrimiento de las paredes del recipiente con por ejemplo BSA puede reducir pero no eliminar completamente el problema. Multiplicar el recuento obtenido por un factor de corrección para compensar las perlas "perdidas" también puede ayudar a reducir la discrepancia.

30 No obstante, queda claro que existen problemas en la técnica anterior, que tienen el potencial de reducir la precisión y exactitud de los recuentos absolutos.

Sumario

35 Con el fin de solucionar los problemas inherentes en la técnica anterior, se da a conocer en el presente documento la encapsulación de micropartículas dentro de un medio de incrustación, o "matriz", como medio para retener las micropartículas dentro de un recipiente.

40 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar los recuentos absolutos de células por volumen unitario de una muestra, comprendiendo el método: (a) proporcionar un recipiente que contiene: (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y (ii) un agente de unión a células; en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente; (b) añadir un volumen conocido de muestra al recipiente para liberar las micropartículas de dicha pared; (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células contando las micropartículas y células en un volumen de la muestra; y (d) determinar el recuento absoluto de células multiplicando el número de células por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra.

45 Preferiblemente, la matriz retiene sustancialmente todas las micropartículas en o sobre el recipiente durante la manipulación de rutina del recipiente. En diversas realizaciones, las micropartículas se retienen cuando el recipiente se invierte.

Preferiblemente, las micropartículas se retienen en ausencia de otros medios de retención, preferiblemente mecánicos.

50 Preferiblemente, las micropartículas se retienen en ausencia de una rejilla de retención en el recipiente.

En algunas realizaciones, la matriz comprende un hidrato de carbono, preferiblemente un azúcar o una mezcla de azúcares, un polímero o una proteína.

Preferiblemente, la matriz comprende una mezcla 1:2, 1:1 ó 2:1 de dos cualesquiera de fructosa, trehalosa y rafinosa. Preferiblemente, la matriz comprende una mezcla 1:1 de fructosa:trehalosa.

Preferiblemente, la matriz está presente en una cantidad de menos de 5 mg, preferiblemente 3 mg o menos. Preferiblemente, la matriz contiene un antioxidante; preferiblemente, el antioxidante comprende hidroxitolueno butilado (BHT).

- 5 En algunas realizaciones, sustancialmente todas las micropartículas se liberan en el volumen de muestra al añadir la muestra. De manera preferible, sustancialmente todas las micropartículas están diferenciadas cuando se cuentan. Preferiblemente, las micropartículas no forman sustancialmente dobletes o multipletes cuando se cuentan.

En otras realizaciones, tras la adición de la muestra, preferiblemente durante el recuento de las micropartículas, las micropartículas no forman dobletes.

Preferiblemente, las células y las micropartículas se cuentan en un citómetro de flujo.

- 10 En una realización, las células comprenden microorganismos, preferiblemente levaduras o bacterias.

En otra realización, las células comprenden linfocitos y/o la muestra comprende sangre completa no lisada. El agente de unión a células puede comprender un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que puede unirse a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD57, CD64, CDw65, CD117 y CD133.

- 15 Preferiblemente, la matriz y las micropartículas se depositan sobre una pared del recipiente a través de la eliminación al menos parcial del disolvente de una suspensión de micropartículas en una solución acuosa de matriz, preferiblemente mediante evaporación del disolvente.

Las micropartículas pueden comprender perlas de poliestireno, látex, agarosa o acrilamida, preferiblemente perlas de poliestireno.

- 20 Preferiblemente, las micropartículas y el agente de unión a células pueden detectarse independientemente en virtud de que comprenden un medio de generación de señales, preferiblemente un medio de generación de señales fluorescentes. Preferiblemente, el medio de generación de señales fluorescentes comprende un fluorocromo seleccionado del grupo que consiste en: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, PE-A680, PE-TR (rojo Texas), alofococianina (APC), APC-Cy7, azul Pacífico, amarillo cascada, cumarinas, colorantes Alexa o puntos Q.

En algunas realizaciones, las micropartículas y el agente de unión a células se marcan con fluorocromos diferentes.

En algunas realizaciones, el recipiente puede comprender más de un agente de unión a células.

- 30 Por ejemplo, el recipiente puede comprender un anticuerpo anti-CD3 acoplado a ficoeritrina, un anticuerpo anti-CD4 acoplado a APC y un anticuerpo anti-CD45 acoplado a FITC. Alternativamente, o además, el recipiente puede comprender un anticuerpo anti-CD34 acoplado a ficoeritrina, un anticuerpo anti-CD45 acoplado a FITC o APC.

Alternativamente, o además, el recipiente puede comprender un anticuerpo anti-CD3 acoplado a azul Pacífico, un anticuerpo anti-CD4 acoplado a FITC, un anticuerpo anti-CD8 acoplado a APC, un anticuerpo anti-CD19 acoplado a RPE-Cy5, un anticuerpo anti-CD45 acoplado a amarillo cascada y un anticuerpo anti-CD56 acoplado a RPE.

- 35 Alternativamente, o además, el recipiente puede comprender yoduro de propidio y Tween. Preferiblemente, el recipiente es desechable.

Se proporciona, según un 2º aspecto de la presente invención, un método que comprende determinar un primer recuento absoluto de un tipo celular en un primer punto de tiempo mediante un método según el 1º aspecto de la invención, y determinar un segundo recuento del tipo celular en un segundo punto de tiempo.

- 40 Preferiblemente, el segundo recuento es un recuento absoluto del tipo celular en el segundo punto de tiempo determinado mediante un método según el 1º aspecto de la invención.

Preferiblemente, las muestras son del mismo individuo, preferiblemente del mismo órgano o tejido de un individuo.

Se proporciona, según un 3º aspecto de la invención, un método que comprende determinar un primer recuento absoluto de un primer tipo celular mediante un método según el 1º aspecto de la invención, y determinar un segundo recuento de un segundo tipo celular.

- 45 Preferiblemente, el segundo recuento es un recuento absoluto del segundo tipo celular determinado mediante un método según el 1º aspecto de la invención.

Preferiblemente, las muestras son del mismo individuo, preferiblemente del mismo órgano o tejido dentro de un individuo.

Alternativamente, o además, las muestras son de individuos diferentes dentro de una población o cohorte.

En algunas realizaciones altamente ventajosas, los recuentos primero y segundo se comparan para proporcionar información sobre el estado de la muestra o cada muestra, o el estado del tejido, órgano, organismo, cohorte o población o de cada tejido, órgano, organismo, cohorte o población del que se deriva(n) la(s) muestra(s).

5 El estado puede seleccionarse del grupo que consiste en: estado de salud, estado nutricional, estado mental, propensión a enfermedad, presencia o ausencia de enfermedad, presencia o ausencia de infección latente, preferiblemente infección por VIH.

Preferiblemente, el tipo celular o el primer tipo celular comprende linfocitos CD4+. Preferiblemente, el tipo celular o el segundo tipo celular comprende linfocitos totales en la misma muestra. Preferiblemente, la infección comprende infección por VIH y/o la enfermedad comprende SIDA.

10 Se proporciona un método sustancialmente tal como se describió anteriormente en el presente documento con referencia a y tal como se muestra en las figuras 1 a 11 de los dibujos adjuntos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto habitual en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol n.º 1* por Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies: A Laboratory Manual* por Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855, Lars-Inge Larsson "Immunocytochemistry: Theory and Practice", CRC Press inc., Boca Raton, Florida, 1988, ISBN 0-8493-6078-1, John D. Pound (ed); "Immunochemical Protocols, vol. 80", en la serie: "Methods in Molecular Biology", Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 1998, ISBN 0-89603-493-3, *Handbook of Drug Screening*, editado por Ramakrishna Seetala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, Nueva York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); *Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench*, editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3; y *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (17ª edición, Beers, M. H., y Berkow, R, Eds, ISBN: 0911910107, John Wiley & Sons).

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1D muestran las propiedades fluorescentes y de dispersión de perlas CytoCount en el control (A+B) e incorporadas en la matriz (C+D).

35 Figura 1A: gráfico de dispersión, control. Figura 1B: gráfico de fluorescencia, control. Figura 1C: gráfico de dispersión, matriz. Figura 1D: gráfico de fluorescencia, matriz.

Las figuras 2A-2H muestran los gráficos de fluorescencia frente a dispersión lateral de sangre completa teñida con 4 conjugados con CD3 diferentes en el control (figuras 2A, 2C, 2E y 2G) en comparación con la matriz (figuras 2B, 2D, 2F y 2H) incorporándose los conjugados en la matriz.

40 Figura 2A: CD3 FITC, control. Figura 2B: CD3 FITC, matriz. Figura 2C: CD3 RPE, control. Figura 2D: CD3 RPE, matriz. Figura 2E: CD3 RPE/Cy5, control. Figura 2F: CD3 RPE/Cy5, matriz. Figura 2G: CD3 APC, control. Figura 2H: CD3 APC, matriz.

45 Las figuras 2I-2P muestran los gráficos de fluorescencia frente a dispersión lateral y fluorescencia frente a fluorescencia de sangre completa teñida con 4 mezclas de 2 colores diferentes en el control (figuras 2I, 2K, 2M y 2O) en comparación con la matriz (figuras 2J, 2L, 2N y 2P) incorporándose los conjugados en la matriz.

Figura 2I: CD3 FITC, CD4-APC, control. Figura 2J: CD3 FITC, CD4-APC, matriz. Figura 2K: CD3-APC, CD4-FITC, control. Figura 2L: CD3-APC, CD4-FITC, matriz. Figura 2M: CD3-PB, CD4-RPE, control. Figura 2N: CD3-PB, CD4-RPE, matriz. Figura 2O: CD3-PB, CD8-RPE, control. Figura 2P: CD3-PB, CD8-RPE, matriz.

50 Las figuras 3A-3D muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia en tanto por ciento de los controles de 4 conjugados con anticuerpo diferentes (CD3 FITC, CD3 RPE, CD3 RPE-Cy5 y CD3 APC) incrustados en una matriz y almacenados durante hasta 81 días. Las formas de rombo representan almacenamiento a 2-8°C, mientras que los cuadrados representan almacenamiento a 20°C.

Figura 3A: CD3 FITC. Figura 3B: CD3 RPE. Figura 3C: CD3 RPE-Cy5. Figura 3D: CD3 APC.

Las figuras 3E-3H muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia en tanto por ciento de los controles de 4

mezclas de 2 colores diferentes (CD3 FITC/CD4-APC, CD3-APC/CD4-FITC, CD3-PB/CD4-RPE y CD3-PB/CD8-RPE) incrustadas en una matriz y almacenadas durante más de 9 meses sin un antioxidante y más de 4 meses con un antioxidante.

Figura 3E: CD3/CD4 FITC. Figura 3F: CD3/CD4 APC. Figura 3G: CD3PB. Figura 3H: CD4/CD8 RPE.

- 5 Las figuras 4A-4D muestran la intensidad de fluorescencia antes (día 0) y después de la congelación y el calentamiento (día 8) tal como se describe en el ejemplo 4 para CD3 RPE-A680 y CD4 FITC; comparando en negro: matriz que contiene perlas (se añade una mezcla de 4 colores cuando se prepara la muestra) con en gris: matriz que contiene perlas y mezcla de 4 colores.

10 Figura 4A: CD3 RPE-A680 día 0. Figura 4B: CD3 RPE-A680 día 8. Figura 4C: CD4 FITC día 0. Figura 4D: CD4 FITC día 8.

Las figuras 5A-5D muestran gráficos de Bland Altman de recuento de CD4 obtenidos con TruCOUNT/MultiTEST en comparación con muestras de matriz lisadas y no lisadas analizadas tanto en FACSCalibur como en Cyan ADP. Se calcula la similitud en tanto por ciento como el promedio de los recuentos de CD4 a partir de TruCOUNT y la matriz dividido entre el recuento de CD4 de TruCOUNT.

- 15 Figura 5A: muestra lisada, FACSCalibur. Figura 5B: muestra no lisada, FACSCalibur. Figura 5C: muestra lisada, Cyan ADP. Figura 5D: muestra no lisada, Cyan ADP.

Las figuras 6A-6D muestran gráficos de Bland Altman de los porcentajes de CD4 (de las células positivas para CD3) para muestras de matriz lisadas y no lisadas en comparación con TruCOUNT/MultiTEST, analizadas tanto en FACSCalibur como en Cyan ADP. Se calcula la similitud en tanto por ciento como en la figura 5.

- 20 Figura 6A: Muestra lisada, FACSCalibur. Figura 6B: muestra no lisada, FACSCalibur. Figura 6C: muestra lisada, Cyan ADP. Figura 6D: muestra no lisada, Cyan ADP.

Figura 7: Muestra los dos gráficos de fluorescencia usados para separar células y perlas.

Figura 8: Compara los recuentos obtenidos con TruCOUNT/MultiSET, controles de CytoCount de 6 colores lisados y no lisados y muestras de matriz de 2 colores lisadas y no lisadas.

- 25 Figura 9: Un ejemplo de los gráficos usados para calcular el recuento de CD4 en las muestras de matriz.

Figura 10: Comparación de los recuentos de CD4 obtenidos con matriz de 6 colores y CytoCount y TruCOUNT.

Figura 11: Comparación de los gráficos para el recuento de CD34 obtenidos con muestras de matriz y control.

- 30 Figura 12: Comparación de los gráficos obtenidos con anticuerpo anti-mieloperoxidasa en disolución e incrustado en una matriz. El primer gráfico presenta FSC frente a SSC y el segundo muestra anti-MPO-APC frente a SSC, donde los granulocitos positivos pueden separarse. Figura 12A control, figura 12B matriz.

Descripción detallada

MATRIZ DE REACTIVOS

- 35 Según los métodos y las composiciones descritos en el presente documento, se proporciona una composición que comprende una cantidad predeterminada de micropartículas dispuestas en o sobre una matriz. La composición puede comprender opcionalmente, aunque preferiblemente, un agente de unión a células. Por conveniencia, una composición o combinación de este tipo de la matriz, las micropartículas y el agente de unión a células se denomina en este documento "matriz de reactivos".

- 40 La invención proporciona en general la incrustación o encapsulación de micropartículas en un medio de incrustación, o matriz, matriz que se ancla a la pared del recipiente. La matriz puede adherirse a un recipiente para retener sustancialmente las micropartículas (y/o el agente de unión a células, según sea el caso) en o sobre el recipiente durante la manipulación de rutina, en ausencia de medios de contención específicos en el recipiente. Las micropartículas se asocian por tanto con la matriz de un modo tal que se pegan eficazmente a la(s) pared(es) del recipiente, durante el almacenamiento y la manipulación del recipiente que comprende la matriz. Esto permite que el recipiente se manipule y se almacene sin pérdida de micropartículas del mismo. Las micropartículas están presentes en una cantidad predeterminada o conocida, y sustancialmente todas las micropartículas se unen al recipiente por medio de la matriz.

- 45 Una realización de este tipo une eficazmente las micropartículas al recipiente, e impide de ese modo la pérdida de micropartículas sin necesidad de una rejilla de retención u otros elementos de contención mecánicos similares en el recipiente. La invención retiene de manera eficaz sustancialmente todas las micropartículas dentro del recipiente a través de la manipulación de rutina. Se mantiene la precisión y exactitud del recuento (reproducibilidad de recuento a recuento), y además no se observa pérdida sustancial de recuentos como resultado de la adhesión perla a perla o

perla a recipiente.

Una característica importante de los métodos descritos en el presente documento es el uso de una matriz, o medio de incrustación. La matriz comprende un material, detalles del cual se exponen a continuación, que puede al menos unirse o adherirse a al menos una pared del recipiente cuando se seca, de modo que las micropartículas incrustadas en ella se mantienen en el recipiente. Sin embargo, cuando se añade una muestra que contiene células de interés al recipiente, la matriz libera las micropartículas en el medio de muestra (véase a continuación).

Las micropartículas están asociadas con la matriz. Pueden disponerse en, bajo, sobre o alrededor de la matriz. En particular están soportadas por o incrustadas en la matriz. Las micropartículas pueden mezclarse con la matriz o combinarse con ella. En diversas realizaciones, las micropartículas se dispersan en la matriz preferiblemente en una dispersión uniforme. La naturaleza exacta de la ubicación relativa o asociación con la matriz no es importante siempre que la matriz funcione como un adhesivo para unir las micropartículas al recipiente durante el almacenamiento y la manipulación (es decir, en ausencia de muestra).

La matriz de reactivos se prepara fácilmente, proporcionando una suspensión de micropartículas en una disolución acuosa (preferiblemente) de matriz, y eliminando al menos parcialmente el disolvente mediante secado o evaporación. En contraposición a la técnica anterior, la matriz de reactivos no se somete a liofilización durante su producción, sino que simplemente se seca o se evapora para eliminar el disolvente. La liofilización, también conocida como secado por congelación, es un método de secado de alimentos o plasma sanguíneo o productos farmacéuticos o tejido en el que el material se congela y luego se calienta a vacío de modo que el hielo se sublima. Tal liofilización da como resultado un sedimento "esponjoso" (tal como en los tubos TruCOUNT de la técnica anterior descritos anteriormente), con sus problemas concomitantes descritos anteriormente. El ejemplo 1 a continuación muestra que la liofilización da como resultado un sedimento que es esponjoso, espumoso y comprende burbujas de aire. En otras palabras, la matriz de reactivos tal como se describe en el presente documento no se liofiliza, y por tanto es menos propensa a romperse.

Las micropartículas pueden suspenderse en disolventes distintos de agua. Tales disolventes pueden comprender metanol, etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, propilenglicol u otros alcoholes, tetrahidrofurano, N-metilpirrolidinona (NMP) u otros disolventes. Preferiblemente, los disolventes son tales que conservan la estabilidad y fluorescencia de las micropartículas y otros reactivos.

Las micropartículas están presentes en un número conocido o predeterminado en la matriz, y se marcan preferiblemente con una molécula indicadora tal como una molécula fluorescente o fluorocromo. La matriz puede comprender uno o más agentes de unión a células. Se describen agentes de unión a células en detalle adicional a continuación, pero son esencialmente moléculas que pueden unirse al menos a un componente celular y por tanto identificarlo. Preferiblemente, los agentes de unión a células pueden identificar una célula de interés, de tal manera que permitan que se cuente. La exposición de la matriz que comprende agentes de unión a células a una muestra permite por tanto la identificación y/o enumeración del tipo celular de interés.

Para este fin, el uno o más agentes de unión a células preferiblemente se marcan, preferiblemente con una molécula indicadora tal como una molécula fluorescente. En realizaciones altamente ventajosas, el agente de unión a células puede distinguirse de las micropartículas, preferiblemente en virtud de que comprende un marcador diferente de las micropartículas o de que tiene un tamaño diferente.

Con el fin de obtener los recuentos absolutos de una célula de interés en una muestra, se añade un volumen de muestra conocido a un recipiente que comprende la matriz de reactivos. Esto libera las micropartículas, que están presentes en un número conocido, en el medio de muestra. Se permite que el agente de unión a células, cuando está presente, se una a e identifique las células de interés en el medio de muestra. Con el fin de lograr esto, el tubo que contiene la muestra puede agitarse con vórtex y permitirse que reaccione durante un periodo de tiempo suficiente para que todas las células relevantes en la muestra se marquen mediante el agente de unión a células.

Posteriormente, el medio de muestra puede diluirse con un diluyente isotónico para el análisis posterior y la posible clasificación directamente en un citómetro de flujo. La dilución puede ser cualquier cantidad adecuada tal como 20:1 ó 10:1, pero se usa preferiblemente una dilución 5:1 ó 2:1. La baja dilución permite un análisis más rápido de la muestra y es particularmente ventajoso para un formato de placa de microtitulación en el que se requieren pequeños volúmenes. Por lo demás, los eritrocitos pueden lisarse en primer lugar usando una de varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un tampón hipotónico. Puesto que la matriz de reactivos descrita en el presente documento no contiene un diluyente, el tratamiento de la muestra no está restringido, sino que puede usarse a voluntad cualquier técnica.

El medio de muestra se mezcla entonces para garantizar una distribución homogénea de las micropartículas en la disolución. Esto puede hacerse usando un mezclador orbital, ultrasonidos, ondas acústicas de superficie u otras formas de mezclador, tal como bombeando líquido dentro y fuera de los recipientes (por ejemplo, mezclador con chorro). Posteriormente, el medio de muestra (o una parte del mismo) se procesa en un citómetro de flujo. Se cuenta el número de células de interés así como el número de micropartículas en esa parte. Esto permite que se determine el número relativo de células de interés y micropartículas en la parte de muestra (en particular el número de células

por micropartícula). Como las micropartículas están presentes en una cantidad conocida, y se conoce el volumen de la muestra, puede establecerse fácilmente el número de micropartículas en un volumen unitario. El recuento absoluto de las células de interés se calcula multiplicando el número de células por micropartícula por el número de micropartículas en un volumen unitario.

- 5 En algunas realizaciones, la muestra añadida es sangre completa, y los eritrocitos se lisan antes de procesar la muestra. En otra realización, la muestra se procesa en el citómetro de flujo sin lisa. Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento permiten una elección libre de si se lisa o no la muestra.

Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento son particularmente adecuados para metodologías de recuento de plataforma única, en particular cuando son importantes el rendimiento y los resultados rápidos. También es adecuado para su uso en kits de flujo complejos con muchos componentes o muchas muestras, y pueden adaptarse fácilmente para procesamientos de rutina por mano de obra no experimentada. Los ejemplos incluyen laboratorios de hematología e inmunología, bancos de sangre y laboratorios de investigación clínica.

VENTAJAS

- 15 El uso de una matriz para retener las micropartículas proporciona varias ventajas a la matriz de reactivos descrita en el presente documento para el recuento absoluto de células.

Retención de micropartículas en el recipiente

La matriz de reactivos supera los problemas inherentes en la técnica anterior, en particular el problema de mantener el número predeterminado de micropartículas a través del tiempo y la manipulación.

- 20 Puesto que la matriz se adhiere al recipiente para retener las micropartículas en el mismo, no hay necesidad de proporcionar medios de contención adicionales tales como una rejilla de retención. Por tanto, el recipiente tal como se describe en este documento puede manipularse de manera rutinaria, tal como transportarse de una ubicación a otra, con riesgo mínimo (preferiblemente en ausencia de riesgo) de que se pierda la matriz del recipiente.

25 En diversas realizaciones, el recipiente con la matriz de reactivos puede manipularse por tanto perdiéndose menos del 20% de las micropartículas, preferiblemente menos del 15%, más preferiblemente desprendiéndose menos del 10%, el 8%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o el 1% de las micropartículas de la pared, en ausencia de un medio de contención adicional, preferiblemente medios de contención mecánicos tales como una rejilla de acero inoxidable. En realizaciones ventajosas, éste es el caso cuando se invierte el recipiente una vez. Por inversión quiere decirse que el recipiente se desplaza a una posición en la que las micropartículas están por encima de un extremo abierto del recipiente. Preferiblemente, la inversión es tal que las micropartículas están en la parte más alta, y un extremo abierto del recipiente está en la parte más baja.

30 En diversas realizaciones, en el transcurso de una única inversión, menos del 20%, preferiblemente menos del 15%, más preferiblemente menos del 10%, el 8%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o el 1% de las micropartículas se pierden del recipiente. En diversas realizaciones, menos del 5% (preferiblemente menos del 1%) de las micropartículas se desprenden de la pared, o se pierden del tubo, cuando se invierte el recipiente y se mantiene en la posición invertida durante al menos 5 segundos. En algunas realizaciones ventajosas, el recipiente puede invertirse 50 veces de manera continua sin pérdida sustancial tal como se estableció anteriormente.

Preferiblemente, el recipiente puede manipularse por tanto de al menos uno de los siguientes modos, sin pérdida sustancial tal como se explicó resumidamente antes: entre el sitio de fabricación y el almacén, durante el envío al punto de venta, entre un laboratorio y otro, dentro del laboratorio de una mesa a otra.

Liberación de micropartículas en el medio de muestra

Tal como se describió anteriormente, la adhesión micropartícula-micropartícula y la adhesión micropartícula-recipiente puede afectar de manera adversa a la exactitud y precisión de los recuentos obtenidos.

45 Sin embargo, se ha encontrado sorprendentemente que el uso de un medio de incrustación, que puede adherirse a la superficie del recipiente, no afecta significativamente a las perlas de manera que afecte al recuento. En particular, se encuentra que el procedimiento de incrustarse en la matriz no potencia sustancialmente de manera adversa la "pegajosidad" de las micropartículas.

50 Tal como se muestra en los ejemplos, no se observa ni formación de dobletes de perlas ni ninguna pérdida importante de perlas debido a que las perlas se pegan a las paredes del vial de muestra y la intensidad de fluorescencia no cambia. Por tanto, contrariamente a las expectativas, no se observa una reducción sustancial en la exactitud y precisión del recuento, y se obtiene una buena reproducibilidad de los recuentos. Esto es algo que es completamente inesperado con respecto a la técnica anterior, que hasta la fecha evitaba el uso de un medio de incrustación que fuese de naturaleza demasiado adhesiva o gelatinosa.

Las micropartículas no se pegan sustancialmente entre sí, tras la adición de la muestra.

En diversas realizaciones, las micropartículas configuradas en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento no forman sustancialmente números significativos de dobletes, tripletes, cuádrupletes o múltipletes de perlas, tras añadirse la muestra al recipiente que contiene las micropartículas y la matriz. Preferiblemente, al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99%, lo más preferiblemente al menos el 99,9%, de las micropartículas están diferenciadas, es decir, existen como micropartículas individuales sin formación de múltipletes.

Además, las micropartículas no se pegan sustancialmente a la superficie del recipiente, tras la adición de la muestra

Por tanto, en diversas realizaciones, tras añadirse la muestra, o al menos en la etapa de recuento, la matriz preferiblemente se disuelve o se dispersa de tal modo que libera sustancialmente todas las micropartículas en el medio. En diversas realizaciones, al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99%, lo más preferiblemente al menos el 99,9%, de las micropartículas se liberan así. Preferiblemente, menos del 5%, más preferiblemente menos del 4%, más preferiblemente menos del 3%, más preferiblemente menos del 2%, más preferiblemente menos del 1%, lo más preferiblemente menos del 0,1% de las micropartículas se adhieren al recipiente tras añadirse la muestra, o en la etapa de recuento.

En realizaciones altamente ventajosas, los porcentajes preferidos expuestos anteriormente persisten a través de conjuntos de micropartículas, matriz y recipiente dentro de un único lote, preferiblemente a lo largo de al menos 3 procesamientos, más preferiblemente a lo largo de al menos 5 procesamientos.

20 *Otras ventajas*

La matriz de reactivos descrita en el presente documento permite un recuento más eficaz, y menos coste en la fabricación de los tubos. Por tanto, no hay necesidad de envasar un gran volumen de diluyente con el recipiente, como en el método descrito en el documento EP 0470810. Puesto que la reacción de reconocimiento anticuerpo-antígeno depende de la concentración del anticuerpo, un volumen combinado más pequeño de reactivos y muestra tal como se da a conocer en el presente documento permite una reacción más rápida con cantidades más pequeñas de reactivos. Además, una muestra concentrada puede analizarse más rápido que una diluida en un citómetro de flujo con adquisición de datos de alta velocidad, y puede analizarse en dispositivos miniaturizados. El hecho de que no esté presente diluyente (como en el documento EP 0470810) también permite una lisis eficaz de eritrocitos.

MATRIZ

30 La matriz es tal que retiene las micropartículas en el recipiente cuando se seca pero libera las micropartículas en el medio de muestra cuando se añade una muestra que contiene células de interés al recipiente. Preferiblemente, la matriz se disuelve en el medio de muestra (o un disolvente tal como agua contenido en el mismo) para efectuar la liberación.

35 Para este fin, la matriz comprende preferiblemente un material viscoso, gelatinoso que puede tener una consistencia líquida, semisólida o de tipo gel. Preferiblemente, la matriz es un líquido viscoso.

La matriz puede estar sustancialmente libre de agua, o puede comprender agua. Preferiblemente (aunque está aparentemente seca) la matriz contiene algo de agua. Preferiblemente menos del 30% de la matriz es agua. La matriz puede comprender un líquido distinto de agua, tal como glicerol, etilenglicol, propilenglicol u otros.

40 La matriz está de manera preferible sustancialmente libre de agua. En diversas realizaciones, la matriz tiene una viscosidad de 10^3 cP, más preferiblemente 10^4 cP, más preferiblemente 10^5 cP, lo más preferiblemente 10^6 cP o más. La viscosidad puede ser una viscosidad dinámica o una viscosidad cinemática, y se mide preferiblemente a una temperatura de 25 grados centígrados. Se conocen en la técnica mediciones de viscosidad mediante el uso de viscosímetros. Preferiblemente, la viscosidad se mide usando un viscosímetro de tipo Brookfield que determina la fuerza requerida para hacer girar un disco en el fluido a una velocidad conocida. También pueden emplearse reómetros y plastómetros, que son viscosímetros que pueden medir fluidos con alta viscosidad o polímeros fundidos.

La matriz puede existir preferiblemente como una masa contigua individual, o puede estar unida al recipiente como varios trozos separados. Preferiblemente es contigua. Sin embargo, preferiblemente la matriz es tal que durante la manipulación o el almacenamiento ninguna parte de la matriz se desprende eficazmente del recipiente provocando pérdida de micropartículas.

50 En diversas realizaciones, por tanto, la matriz es soluble en agua, preferiblemente fácilmente soluble en medios acuosos. En realizaciones ventajosas, la matriz se disuelve cuando una muestra que contiene las células de interés se añade al recipiente que comprende la matriz, o se rompe de otra forma de tal manera que libera las micropartículas en el medio de muestra. Preferiblemente, todas o sustancialmente todas las micropartículas se liberan en el medio de muestra.

55 La matriz puede estar presente en cualquier cantidad adecuada en un recipiente. Preferiblemente, la cantidad de

matriz es suficiente para contener el número requerido de micropartículas en el recipiente. En diversas realizaciones, la cantidad de matriz de menos de 100 mg, preferiblemente menos de 50 mg, preferiblemente menos de 30 mg, preferiblemente menos de 20 mg, preferiblemente menos de 10 mg. En realizaciones ventajosas, la matriz está presente en una cantidad de menos de 5 mg, preferiblemente de 3 mg o menos de 3 mg.

5 Preferiblemente, la matriz debe comprender un entorno no oxidante (no reductor) con el fin de evitar cualquier reacción redox no deseada. Por tanto, cuando se emplea una matriz de hidratos de carbono (véase a continuación), los hidratos de carbono deben ser no reductores. Además la matriz debe estar compuesta de manera que no cristalice, se agriete o cambie de fase a ninguna temperatura a la que pueda someterse en el transporte y almacenamiento normales.

10 Es preferible usar una matriz con un bajo punto de fusión para evitar la cristalización de la matriz. Es preferible un alto peso molecular para reducir el efecto osmótico sobre la preparación de muestra.

En algunas realizaciones, la matriz se basa en una mezcla de azúcar soluble en agua. La matriz o medio de incrustación puede comprender uno o más compuestos incluyendo hidratos de carbono, polímeros, proteínas pequeñas u otros.

15 Los ejemplos de hidratos de carbono adecuados para su uso en una matriz incluyen sacarosa, arabinosa, ribulosa, fructosa, sorbosa, glucosa, manosa, gulosa, galactosa, sucrosa, lactosa, maltosa, trehalosa, almidón, rafinosa y melicitosa. También pueden emplearse celulosa así como productos de celulosa carboxilada o derivatizada de otra forma.

20 Los ejemplos de polímeros adecuados para su uso en una matriz incluyen poli(alcoholes vinílicos), polietilenglicoles, polietileniminas, poliacrilamidas, poliaziridinas, glicoles, poli(ácidos acrílicos), ésteres o derivados de los mismos. Debe quedar claro que también podrían usarse copolímeros de bloque de los mencionados anteriormente.

Los ejemplos de proteínas pequeñas incluyen BSA, otras albúminas o fragmentos de proteína tales como Byco A.

25 También pueden usarse mezclas de dos o más de los anteriores. Los componentes de la matriz pueden estar presentes en cualquier proporción adecuada compatible con las propiedades deseables explicadas resumidamente antes. Específicamente, se dan a conocer matrices que comprenden mezclas de hidratos de carbono, por ejemplo, fructosa, trehalosa y rafinosa. Por tanto, la matriz puede comprender dos cualesquiera de fructosa, trehalosa y rafinosa, preferiblemente a una razón 2:1, una razón 1:1 o una razón 1:2.

30 La matriz puede comprender 2:1, 1:1 ó 1:2 de fructosa y trehalosa. Una realización altamente ventajosa es 3 mg de una mezcla 1:1 de fructosa y trehalosa. La cantidad de hidrato de carbono se ha determinado como la cantidad máxima que todavía permite un buen lisado de la muestra.

La matriz puede realizar otras funciones, tales como proporcionar un medio estable e inerte para conservar las micropartículas durante el almacenamiento. Para este fin, también pueden incluirse otros componentes.

35 Estos pueden incluir uno cualquiera o más de conservantes, detergentes, fijadores, antioxidantes y estabilizadores del pH. Los ejemplos de conservantes incluyen bronidix, azida de sodio y tiomersal. Los ejemplos de detergentes incluyen Tween, Triton, Brij, Pluronic y Tetronic así como derivados y mezclas de los mencionados anteriormente. Los ejemplos de fijadores incluyen vinilsulfona y glutaraldehído.

40 La matriz puede comprender uno o más antioxidantes, que son moléculas que son eliminadores de radicales. Los radicales pueden ser radicales de O, N C o S. En algunas realizaciones, la matriz puede comprender eliminadores para radicales derivados de oxígeno tales como el anión superóxido o el radical hidroxilo formado por oxígeno atmosférico bajo la influencia de la luz, el calor u otros factores medioambientales. Los ejemplos de tales eliminadores de radicales son ácido ascórbico, beta-caroteno, bilirrubina, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), terc-butilhidroquinona (TBHQ), d-alfa-tocoferol, trolox e hidroxianisol. Los ejemplos de estabilizadores del pH incluyen tampones Good, HEPES, MES, fosfato, citrato.

MICROPARTÍCULAS

45 En general, las micropartículas o perlas son partículas con propiedades de dispersión que las colocan en el contexto de las células de interés cuando se registran mediante un citómetro de flujo. Pueden o bien marcarse con anticuerpos, fluorocromos u otras moléculas pequeñas o bien no marcarse. En algunas realizaciones de la invención, las perlas son perlas de poliestireno con moléculas incrustadas en el polímero que son fluorescentes en la mayoría de los canales del citómetro de flujo.

50 Las micropartículas empleadas en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento deben ser preferiblemente pequeñas, y tienen un diámetro preferiblemente de entre 0,1 μm y 100 μm , preferiblemente de aproximadamente 5 μm . La micropartícula debe estar compuesta preferiblemente por un material tal y ser de un tamaño tal como para permanecer suspendida, con agitación mínima si es necesario, en disolución o suspensión (es decir, una vez que se añade la muestra). Preferiblemente no debe asentarse más rápido que las células de interés

en la muestra. El material del que están compuestas las micropartículas debe ser tal que se evite la aglutinación o agregación, es decir, la formación de dobletes, tripletes, cuádrupletes y otros múltipletes.

5 La concentración de la micropartícula en la suspensión de muestra debe ser mayor que o igual al número de células que van a contarse. Generalmente, es suficiente una razón 3:1 de micropartículas con respecto a células. Sin embargo, se prefiere una razón 1:1.

La micropartícula debe estar marcada preferiblemente con una molécula indicadora, tal como una molécula fluorescente (que se describe en detalle adicional en otra parte). Alternativamente, o además, puede emplearse una micropartícula que es autofluorescente.

10 Pueden seleccionarse micropartículas del grupo que consiste en glóbulos rojos de pollo fijados, perlas de cumarina, liposomas que contienen un colorante fluorescente, perlas de fluoresceína, perlas de rodamina, células fluorescentes fijadas, núcleos celulares fluorescentes, microorganismos y otras perlas etiquetadas con un colorante fluorescente. Sin embargo, los ejemplos particularmente ventajosos de partículas compactas que pueden usarse en la invención incluyen microperlas, tales como perlas de agarosa, perlas de poliacrilamida, perlas de poliestireno, perlas de gel de sílice, etc.

15 *Perlas*

En algunas realizaciones, la micropartícula comprende una perla o microperla.

Las perlas o microperlas adecuadas para su uso incluyen las que se usan para cromatografía en gel, por ejemplo, medios de filtración en gel tales como Sephadex. Las microperlas adecuadas de esta clase incluyen Sephadex G-10 que tiene un tamaño de perla de 40-120 (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.103-9), Sephadex G-15 que tiene un tamaño de perla de 40-120 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.104-7), Sephadex G-25 que tiene un tamaño de perla de 20-50 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.106-3), Sephadex G-25 que tiene un tamaño de perla de 20-80 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.107-1), Sephadex G-25 que tiene un tamaño de perla de 50-150 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.109-8), Sephadex G-25 que tiene un tamaño de perla de 100-300 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.110-1), Sephadex G-50 que tiene un tamaño de perla de 20-50 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.112-8), Sephadex G-50 que tiene un tamaño de perla de 20-80 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.113-6), Sephadex G-50 que tiene un tamaño de perla de 50-150 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.114-4), Sephadex G-50 que tiene un tamaño de perla de 100-300 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.115-2), Sephadex G-75 que tiene un tamaño de perla de 20-50 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.116-0), Sephadex G-75 que tiene un tamaño de perla de 40-120 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.117-9), Sephadex G-100 que tiene un tamaño de perla de 20-50 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.118-7), Sephadex G-100 que tiene un tamaño de perla de 40-120 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.119-5), Sephadex G-150 que tiene un tamaño de perla de 40-120 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.121-7) y Sephadex G-200 que tiene un tamaño de perla de 40-120 μm (número de catálogo de Sigma Aldrich 27.123-3).

35 También pueden usarse perlas de Sepharose, por ejemplo, tal como se usa en cromatografía de líquidos. Ejemplos son perlas de Q-Sepharose, S-Sepharose y SP-Sepharose, disponibles por ejemplo de Amersham Biosciences Europe GmbH (Friburgo, Alemania) como Q Sepharose XL (número de catálogo 17-5072-01), Q Sepharose XL (número de catálogo 17-5072-04), Q Sepharose XL (número de catálogo 17-5072-60), SP Sepharose XL (número de catálogo 17-5073-01), SP Sepharose XL (número de catálogo 17-5073-04) y SP Sepharose XL (número de catálogo 17-5073-60) etc.

45 Otras partículas preferidas para su uso en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento incluyen microperlas de plástico. Aunque las microperlas de plástico son habitualmente sólidas, también pueden estar huecas en el interior y podrían ser vesículas y otros microportadores. No tienen que ser esferas perfectas con el fin de funcionar en los métodos descritos en el presente documento. Pueden emplearse materiales de plástico tales como poliestireno, poliacrilamida y otros materiales de látex para fabricar las perlas, aunque también pueden usarse otros materiales de plástico tales como poli(cloruro de vinilo), polipropileno y similares. El poliestireno es un material preferido. Las micropartículas incluyen perlas no marcadas, perlas con anticuerpos, fluorocromos u otras moléculas pequeñas conjugadas con la superficie o perlas con fluorocromos incrustados en el polímero.

AGENTE DE UNIÓN A CÉLULAS

50 El agente de unión a células comprende una molécula que puede unirse a una molécula diana sobre o en una célula, y de ese modo permitir la identificación de la célula basándose en la posesión de esa molécula diana. El agente de unión a células, en muchas realizaciones, permite el marcaje de una o más poblaciones de células.

55 En realizaciones altamente ventajosas, el agente de unión a células se dispersa en la matriz o matriz de reactivos de la misma manera que las micropartículas, tal como se explicó resumidamente antes. Además, preferiblemente, el agente de unión a células puede adherirse al recipiente por medio de la matriz, de la manera descrita para las micropartículas.

En algunas realizaciones, la molécula diana comprende un marcador celular, y el agente de unión a células comprende un anticuerpo. Se conocen bien en la técnica métodos de fabricación de anticuerpos monoclonales y policlonales, incluyendo anticuerpos artificiales, y se expone una breve descripción a continuación.

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser contra cualquier marcador celular sobre o en las células de interés, conjugados con marcadores fluorescentes para hacerlos visibles en el citómetro de flujo. Los ejemplos de tales marcadores incluyen CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD57, CD64, CDw65, CD117 y CD133 o cualquier otro marcador que ayudará en la identificación de la población celular relevante.

10 En una realización alternativa, el agente de unión a células comprende una molécula que puede unirse a, preferiblemente intercalarse con, ADN, es decir, un colorante de ADN. Los ejemplos de tales moléculas incluyen yoduro de propidio, naranja de acridina, naranja de tiazol, tioflavina T, 7-amino-actinomicina D (7-AAD), DAPI, Hoechst 33342, yoduro de To-Pro-3, etc. Se describen en detalle colorantes de ácido nucleico en las patentes estadounidenses números 4.544.546, 4.883.867 y 4.937.198. Por ejemplo, se da a conocer una realización que comprende una matriz que contiene yoduro de propidio y Tween.

15 En otras realizaciones, el agente de unión a células comprende una molécula que puede unirse a ADN de una manera específica de secuencia. Los ejemplos de tales moléculas incluyen sondas de ADN, sondas de ARN, sondas de ANP, sondas de ANB o sondas compuestas por otros análogos de oligonucleótido incluyendo moléculas constituidas por ADN o ARN que incorpora nucleótidos modificados individuales o tramos de nucleótidos modificados y/o moléculas intercalantes.

20 Adicionalmente en otras realizaciones, el agente de unión a células comprende proteínas de afinidad distintas de inmunoglobulina tales como anticuerpos u otros reactivos con especificidad por determinados marcadores celulares.

En realizaciones altamente ventajosas, el agente de unión a células se marca con una molécula indicadora, preferiblemente un fluorocromo, para permitir que el agente de unión a células y la célula a la que se une, si hay alguna, se identifiquen y preferiblemente se cuenten. Éstos se dan a conocer en detalle más adelante.

25 Se expone una lista no exhaustiva de realizaciones altamente ventajosas de los métodos y las composiciones.

Progresión de la infección por VIH

30 Una realización adecuada para la enumeración absoluta de linfocitos T cooperadores/inductores emplea uno o más agentes de unión a células que pueden identificar cualquier marcador para un linfocito T cooperador/inductor. Por ejemplo, el agente de unión a células puede comprender un anticuerpo anti-CD4 marcado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón anti-CD4. Puede usarse una realización de este tipo para evaluar el riesgo de SIDA, así como la aparición de enfermedades oportunistas tales como neumonía por *Pneumocystis carinii*. El recuento de células T cooperadoras/inductoras CD4+ también puede usarse como un indicador de la reconstitución inmunitaria tras el tratamiento con fármacos anti-VIH.

Recuento de células madre

35 Otra realización adecuada para contar células madre comprende uno o más agentes de unión a células que pueden identificar cualquier marcador para una célula madre. Por ejemplo, el agente de unión a células puede comprender un anticuerpo marcado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón marcado con fluoresceína contra una cualquiera o más de fosfatasa alcalina, alfa-fetoproteína (AFP), proteína morfogenética ósea-4, Brachyury, designación de grupo 30 (CD30), Cripto (TDGF-1), gen de GATA-4, GCTM-2, génesis, factor nuclear de células germinales, factor nuclear de hepatocitos-4 (HNF-4), nestina, molécula de adhesión a células neuronales (N-CAM), Oct-4, Pax6, antígeno embrionario específico de fase-3 (SSEA-3), antígeno embrionario específico de fase-4 (SSEA-4), factor de células madre (SCF o ligando de c-Kit), telomerasa, TRA-1-60, TRA-1-81 y vimentina.

40 Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a fosfatasa alcalina, designación de grupo 30 (CD30), GCTM-2, génesis, factor nuclear de células germinales, Oct-4, antígeno embrionario específico de fase-3 (SSEA-3), antígeno embrionario específico de fase-4 (SSEA-4), telomerasa, TRA-1-60 o TRA-1-81 para el recuento absoluto de células madre embrionarias (ES) o de carcinoma embrionario (EC).

45 Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a alfa-fetoproteína (AFP), gen de GATA-4 o factor nuclear de hepatocitos-4 (HNF-4) para el recuento absoluto de células del endodermo.

50 Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a proteína morfogenética ósea-4 y/o Brachyury para el recuento absoluto de células del mesodermo.

Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a Cripto (TDGF-1) para el recuento absoluto de células ES o cardiomiocitos.

Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a nestina para el recuento absoluto de células progenitoras pancreáticas, neurales y del ectodermo.

Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a molécula de adhesión a células neuronales (N-CAM) o Pax6 para el recuento absoluto de células del ectodermo.

Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a factor de células madre (SCF o ligando de c-Kit) para el recuento absoluto de células ES, EC, HSC, MSC.

- 5 Puede usarse un agente de unión a células que puede unirse a vimentina para el recuento absoluto de células progenitoras pancreáticas, neurales y del ectodermo.

Recuento de células madre hematopoyéticas

- 10 Otra realización adecuada para contar células madre comprende uno o más agentes de unión a células que pueden identificar cualquier marcador para una célula progenitora hematopoyética. Esto incluye una realización adecuada para la enumeración de CD34. Por ejemplo, el agente de unión a células puede comprender un anticuerpo marcado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón anti-CD34. Puede someterse a prueba un paciente para determinar los recuentos de CD34 como medio de establecer si está listo para la recogida de células madre hematopoyéticas.

Alternativamente, o además, el agente de unión a células puede comprender un anticuerpo anti-CD133. El antígeno CD133 se expresa sobre células madre con potencial de diferenciación hematopoyética y no hematopoyética.

- 15 *Recuento de leucocitos a bajo nivel*

- 20 Una realización adicional es adecuada para contar glóbulos blancos residuales en productos sanguíneos con reducción de leucocitos empleando un colorante de ADN, para distinguir los glóbulos blancos nucleados de los glóbulos rojos no nucleados. Puede usarse el recuento de leucocitos como control de calidad para productos sanguíneos. Se da a conocer por tanto un método para el recuento absoluto de leucocitos que comprende un colorante de ADN tal como yoduro de propidio.

- 25 Debe quedar claro que puede ser necesario más de un marcador celular con el fin de conseguir una separación completa de las poblaciones celulares. Sin embargo, la fluorescencia de cada marcador debe tener intensidades o longitudes de onda de emisión que puedan distinguirse de las otras. Además, las micropartículas deben poder distinguirse de las células marcadas o bien mediante el tamaño, la longitud de onda de emisión o la intensidad de fluorescencia. Por tanto, es necesario optimizar las combinaciones de fluorocromos para cada realización.

Agentes de unión a células múltiples

- 30 Debe quedar claro que la matriz puede comprender más de un agente de unión a células. Esto permite el recuento simultáneo o secuencial de más de un tipo celular, así como permite que se cuenten células caracterizadas por la presencia de múltiples marcadores. En realizaciones en las que está presente más de un agente de unión a células en la matriz de reactivos, los agentes de unión a células pueden marcarse con el mismo indicador, o diferentes indicadores (véase más adelante).

- 35 Por tanto, resultará evidente que cuando va a contarse más de una población de células, puede usarse más de un marcador celular (siendo cada uno específico para una población diferente). Sin embargo, la fluorescencia de cada marcador debe tener intensidades o longitudes de onda de emisión que puedan distinguirse no sólo entre sí sino también de las micropartícula usada. Cuando sólo se usa un marcador de inmunofluorescencia, el fluorocromo puede comprender fluoresceína. Cuando se usan dos o más marcadores de inmunofluorescencia, el fluorocromo puede comprender por ejemplo fluoresceína y ficoeritrina.

- 40 Por ejemplo, una realización es una matriz que contiene una combinación de anticuerpos tales como frente a CD3-PE (ficoeritrina), CD4-APC (aloficocianina) y CD45-FITC (isotiocianato de fluoresceína). Otra realización es una matriz que contiene una combinación de anticuerpos tales como frente a CD34-PE y CD45-FITC/APC. Aún otra realización es una matriz que contiene una combinación de anticuerpos tales como frente a CD3-PB (azul Pacífico), CD4-FITC, CD8-APC, CD19-PECy5, CD45-CY (amarillo cascada) y CD56-PE.

- 45 En tales realizaciones, los agentes de unión a células se eligen preferiblemente de manera que la razón de los recuentos de células que se marcan respectivamente proporciona información útil. Por ejemplo, puede ser útil para realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de los recuentos de un tipo celular con un marcador celular particular, frente a los recuentos de otro tipo celular con un marcador diferente. Se exponen a continuación aplicaciones para una realización de este tipo en "Usos de diagnóstico", "Determinaciones del estado" y "Usos terapéuticos y de farmacodiagnóstico".

MOLÉCULA MARCADORA / INDICADORA / FLUORESCENTE

- 50 En realizaciones altamente ventajosas, el agente de unión a células se marca con una molécula indicadora, para permitir que el agente de unión a células y la célula a la que se une, si hay alguna, se identifiquen y preferiblemente se cuenten. Preferiblemente, las micropartículas también se marcan con una molécula indicadora para permitir el recuento.

- 5 Los colorantes que tienen estas propiedades incluyen las ficobiliproteínas (especialmente ficoeritrina), derivados de fluoresceína (tales como isotiocianato de fluoresceína), complejo de peridina-clorofila (tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.876.190), derivados de cumarina (tales como aminometilcumarina), colorantes de ftalocianina (tales como colorantes Ultralite (Ultradiagnostics)) y derivados de rodamina (tales como tetrametil-rodamina o rojo Texas (Molecular Probes)).
- 10 Los ejemplos preferidos de fluorocromos incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, PE-A680, PE-TR (rojo Texas), aloftocianina (APC), APC-Cy7, azul Pacífico, amarillo cascada, colorantes Alexa, cumarinas o puntos Q. Uno cualquiera o más de estos fluorocromos pueden unirse, preferiblemente conjugarse químicamente, con el agente de unión a células tal como un anticuerpo. Opcionalmente, se une un fluorocromo (o más de uno) a las micropartículas.
- 15 La mayoría de los fluorocromos se conjugan haciendo reaccionar un fluorocromo acoplado a maleimida con un anticuerpo activado con tiolato, es decir una reacción quimioselectiva, mientras que FITC, azul Pacífico, amarillo cascada, Cy5 y los colorantes Alexa reaccionan directamente con grupos amino de lisina sobre los anticuerpos.
- 20 El indicador o “marcador” comprende preferiblemente un medio de detección emisor de luz, y el medio de detección emisor de luz emite ventajosamente luz de al menos una emisión de longitud de onda fluorescente. Se prefiere que el medio de detección emisor de luz comprenda un fluoróforo o grupo o etiqueta fluorescente.
- 25 Una “etiqueta fluorescente” o “grupo fluorescente” se refiere a o bien un fluoróforo o bien una molécula fluorescente o proteína fluorescente o fragmento fluorescente de la misma. El grupo o la etiqueta fluorescente es tal que puede absorber energía a un intervalo de longitud de onda y liberar energía a un intervalo de longitud de onda distinto del intervalo de absorción. El término “longitud de onda de excitación” se refiere al intervalo de longitudes de onda a las que un fluoróforo absorbe energía. El término “longitud de onda de emisión” se refiere al intervalo de longitud de onda a la que el fluoróforo libera energía o fluoresce. “Proteína fluorescente” se refiere a cualquier proteína que fluoresce cuando se excita con radiación electromagnética apropiada. Esto incluye proteínas cuyas secuencias de aminoácidos o bien son naturales o bien están modificadas por ingeniería genética.
- 30 En algunas realizaciones, el marcador indicador, preferiblemente la etiqueta fluorescente, de la micropartícula es diferente de la del agente de unión a células. Preferiblemente, los marcadores indicadores se eligen de tal manera que el espectro de longitud de onda de emisión de uno puede distinguirse del espectro de longitud de onda de excitación del otro. Los dos marcadores indicadores pueden excitarse por la misma longitud de onda de luz, o por longitudes de onda diferentes. Preferiblemente, las longitudes de onda de emisión son diferentes. Alternativamente, si los tiempos de extinción de la especie excitada son diferentes, podría usarse fluorescencia de resolución temporal.
- 35 En una disposición de este tipo, es posible contar las micropartículas por separado de los agentes de unión a células (es decir, las células a las que están unidas), por ejemplo, usando un canal fluorescente diferente. Sin embargo, aunque se prefieren marcadores indicadores distinguibles, quedará claro que esto no es absolutamente necesario. De hecho, en algunas realizaciones, pueden emplearse micropartículas que no están marcadas con etiquetas fluorescentes, aunque todavía pueden distinguirse de las células marcadas usando otros parámetros. Por ejemplo, las micropartículas pueden distinguirse de las células marcadas mediante o bien el tamaño (parámetros de dispersión), la longitud de onda de emisión (parámetros de fluorescencia) o bien la intensidad de fluorescencia.
- 40 Se prefiere adicionalmente que los fluoróforos comprendan fluoresceína y tetrametil-rodamina u otra pareja adecuada. En otra realización, el marcador comprende dos proteínas fluorescentes diferentes. Se prefiere que las proteínas fluorescentes comprendan cualquier proteína seleccionada del grupo que consiste en proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente azul, proteína fluorescente roja y otras formas modificadas por ingeniería genética de GFP.
- 45 Preferiblemente, el polipéptido comprende un aminoácido cisteína o lisina a través del cual el marcador se une por medio de un enlace covalente.
- En la tabla 1 se presenta una lista no limitativa de fluoróforos químicos adecuados para su uso, junto con sus longitudes de onda de excitación y emisión.

Tabla 1. Longitudes de onda de excitación y emisión de algunos fluoróforos

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Color
PKH2	490	504	verde
PKH67	490	502	verde
Fluoresceína (FITC)	495	525	verde
Hoechst 33258	360	470	azul
R-Ficoeritrina (PE)	488	578	naranja-rojo
Rodamina (TRITC)	552	570	rojo
Quantum Red [®]	488	670	rojo
PKH26	551	567	rojo

Rojo Texas	596	620	rojo
Cy3	552	570	rojo

Se enumeran ejemplos de moléculas fluorescentes que pueden variar entre ellas en máximos de excitación y emisión en la tabla 1 del documento WO 97/28261 (incorporado en el presente documento como referencia). Éstas (cada una seguida por las longitudes de onda [máx. de excitación/máx. de emisión] expresadas en nanómetros) incluyen proteína fluorescente verde silvestre [395(475)/508] y el mutante clonado de variantes de proteína fluorescente verde P4 [383/447], P4-3 [381/445], W7 [433(453)/475(501)], W2 [432(453)/480], S65T [489/511], P4-1 [504(396)/480], S65A [471/504], S65C [479/507], S65L [484/510], Y66F [360/442], Y66W [458/480], I0c [513/527], W1B [432(453)/476(503)], Emerald [487/508] y Sapphire [395/511]. Esta lista no es exhaustiva de las proteínas fluorescentes conocidas en la técnica; se encuentran ejemplos adicionales en las bases de datos públicas Genbank y SwissProt.

- 5 La fluorescencia de las micropartículas debe ser tal que en un canal de fluorescencia es suficientemente mayor que el ruido de fondo para poder distinguirse y también debe poder distinguirse en otro(s) canal(es) de fluorescencia del/de los colorante(s) fluorescente(s) usado(s) como parte del/de los marcador(es) de inmunofluorescencia o agentes de unión a células. Es suficiente una diferencia de un log entre la fluorescencia del/de los colorante(s) y la micropartícula. La concentración de la micropartícula debe ser mayor que o igual al número de células que van a contarse. Generalmente, una razón 3:1 de perlas con respecto a células es suficiente, aunque se prefiere una razón 1:1.

RECIPIENTE

- 10 Para facilidad de manipulación, las micropartículas y el agente de unión a células pueden estar contenidos en un recipiente. El recipiente puede adoptar cualquier forma adecuada y estar compuesto por cualquier material adecuado.

El recipiente puede adoptar en particular la forma de un tubo de reactivo, tal como un tubo de ensayo, tiras o una placa de microtitulación para un formato de microtitulación. Cuando se usan placas de microtitulación como recipiente, cada uno de los agentes de unión a células, indicadores y micropartículas en cada una de las placas pueden ser iguales o diferentes.

- 25 Preferiblemente, el recipiente tiene una conformación tubular o alargada. En algunas realizaciones, el recipiente tiene una sección transversal no circular, por ejemplo, una sección transversal cuadrada o una sección transversal triangular o una sección transversal poligonal. Sin embargo, en diversas realizaciones, el recipiente tiene una sección transversal circular, y tiene preferiblemente una conformación cilíndrica.

- 30 El recipiente está preferiblemente cerrado en un extremo, y preferiblemente la matriz que comprende en la que están dispuestas las micropartículas está situada en o hacia el extremo cerrado. El extremo cerrado puede ser plano o tener una conformación de cuenco. Las micropartículas se retienen eficazmente en el recipiente durante la manipulación a través de la matriz, y por tanto no hay necesidad de una rejilla de retención. Preferiblemente, por tanto, el recipiente no comprende una rejilla de este tipo. Sin embargo, el recipiente puede cerrarse mediante una tapa o un sello superior, por ejemplo una lámina de plástico (preferido para placas de microtitulación) o cera o aceite para impedir el contacto con el aire o la humedad. El aire en el recipiente podría ser aire filtrado, gases neutros, dióxido de carbono o cualquier gas que tenga un efecto protector sobre los reactivos en el recipiente. Debe quedar claro que la muestra podría añadirse sin eliminar el sello superior. Además, un sello superior hará posible incluir muchas mezclas de reactivos diferentes en una placa de microtitulación y usar las mezclas de reactivos deseadas simplemente perforando el sello, dejando las mezclas no usadas sin alterar.

- 40 El recipiente es preferiblemente transparente o translúcido (por ejemplo, esmerilado) en al menos una parte, preferiblemente a lo largo de la totalidad del recipiente. Sin embargo, también puede ser impenetrable a la luz con el fin de proteger el contenido de la luz. Un recipiente transparente también puede envasarse en un recipiente secundario que es impenetrable a la luz, protegiendo así el contenido de la luz. El recipiente secundario puede estar compuesto por papel de aluminio, preferiblemente una bolsa o bolsita de papel de aluminio. También puede ser una caja compuesta por plástico o cualquier otro material que sea o puede hacerse impenetrable a la luz.

El recipiente primario puede estar compuesto por cualquier material adecuado, tal como vidrio, vidrio termorresistente (por ejemplo, vidrio Pyrex), plástico, polipropileno, poliestireno, etc. Preferiblemente, el material por el que está compuesto el recipiente es inerte y resistente al ataque químico.

- 50 Al menos una parte de la superficie interna del recipiente, preferiblemente al menos una o más de las paredes del recipiente pueden tratarse, por ejemplo, mediante recubrimiento. El recubrimiento puede comprender por ejemplo un material hidrófobo tal como silicona, o un material que puede impedir que los componentes de la muestra se peguen al recipiente. También puede impedir preferiblemente que las micropartículas (cuando se suspenden tras la adición de la muestra) se peguen a las superficies del recipiente. Tal material de recubrimiento puede comprender por ejemplo proteínas tales como albúmina sérica bovina (BSA), caseína o gelatina. El recubrimiento de tal manera con agentes de bloqueo impide la unión no específica al recipiente.

El recipiente también puede comprender un dispositivo de mezclado, preferiblemente incorporado en el recipiente, para mezclar la muestra u otros reactivos. Los dispositivos de mezclado adecuados comprenden imanes o chips de vibración.

5 El recipiente puede marcarse con un medio de identificación. Éstos pueden comprender códigos de barras, Infoglyph o chips, preferiblemente chips de RFID. El medio de identificación también puede almacenar otra información. Tal otra información puede comprender uno cualquiera o más de lo siguiente: identificación o información del paciente, información sobre la muestra, información sobre los reactivos (por ejemplo, fecha de fabricación, número de lote, protocolo de corrección), información sobre las etapas a las que se ha sometido la muestra (por ejemplo, tiempo de incubación, temperatura, cualquier tiempo de espera entre etapas, etc.).

10 Los recipientes preferidos son los que se emplean para fines de laboratorio, en particular, para citometría de flujo.

FABRICACIÓN

Las composiciones descritas en el presente documento se fabrican fácilmente. En general, el material de la matriz se disuelve en un disolvente apropiado, tal como agua, y se añade cualquier reactivo requerido al material resultante.

15 Entonces se añade esto a un recipiente apropiado en una cantidad apropiada, se añade un número conocido de las micropartículas y se elimina el disolvente removed con agitación si es necesario. El disolvente puede eliminarse por ejemplo mediante evaporación a presión reducida o secado de otra forma. Es esencial que el disolvente no se elimine mediante secado por congelación o liofilización, ya que esto da como resultado un sedimento esponjoso (véase el ejemplo 0).

20 La eliminación del disolvente da como resultado la deposición de la matriz sobre la superficie del recipiente. Preferiblemente, no todo el disolvente se elimina. Esto permite que la matriz retenga algo de disolvente, lo que permite que retenga su conformación o forma sin cristalización o agrietamiento.

Debido a la simplicidad del procedimiento de fabricación, es posible preparar muchas mezclas de reactivos diferentes en la misma línea de producción. Por tanto, es posible preparar paneles de mezclas de reactivos diferentes en un recipiente (placa de microtitulación) e incluso producir paneles preparados por encargo a petición.

25 Se expone en los ejemplos un protocolo específico para producir una matriz con micropartículas.

MUESTRA/MUESTRA BIOLÓGICA

La muestra puede derivarse de cualquier fuente. En diversas realizaciones, la muestra comprende una muestra biológica, que puede comprender preferiblemente una suspensión de células o partículas.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “muestra biológica” se refiere a un subconjunto de los tejidos de un organismo biológico, sus células o partes componentes. “Muestra biológica” y “espécimen biológico” se refieren además a un homogeneizado, lisado o extracto preparado a partir de un organismo completo o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes, o una fracción o parte de los mismos.

35 Por ejemplo, la muestra biológica puede comprender o derivarse de fluidos corporales, incluyendo pero sin limitarse a sueros, plasma, líquido sinovial y líquido espinal, sangre, moco, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre de cordón umbilical amniótico, orina, fluido vaginal y semen. Además, la muestra biológica puede comprender o derivarse de tejidos tales como ovarios, próstata, corazón, placenta, páncreas, ascitis, músculo, piel, tejido glandular, riñón, hígado, bazo, pulmón, hueso, médula ósea, tejido ocular, nervios periféricos, sistema nervioso central, mama y tejido umbilical. Se conocen bien en la técnica métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos y otros organismos.

40 La muestra puede comprender microorganismos, tales como levaduras, bacterias, virus, etc. En particular, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento son útiles para el recuento celular en el campo de la tecnología alimentaria. Los métodos que se dan a conocer pueden usarse para determinar los recuentos absolutos de microorganismos usados en procesos industriales o biotecnológicos, incluyendo procesos de fermentación. Por ejemplo, puede usarse un agente de unión a células que pueda unirse a e identificar una célula de levadura para obtener los recuentos absolutos de células de levadura en medios o aguas madre de fermentación. Esto es útil en fábricas de cerveza y durante la producción de cerveza y vinos. Además, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento son adecuados para el recuento de cultivos vivos que comprenden células bacterianas, células probióticas, etc. Un ejemplo es el recuento de bacterias del ácido láctico tales como células de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* o *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* en por ejemplo la producción de yogures. Otro ejemplo es la determinación del recuento absoluto de un organismo recombinante en medio de fermentación que se ha modificado por ingeniería genética para producir una proteína (por ejemplo, una proteína terapéutica) o una molécula pequeña tal como un antibiótico.

En general, por tanto, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para los

recuentos absolutos de cualquier célula implicada en controles de calidad de alimentos o células/partículas de cualquier otra área que podría beneficiarse del recuento de células/partículas o la determinación de la viabilidad y/o el fenotipo celulares.

5 En diversas realizaciones, la muestra comprendida se selecciona del grupo que consiste en sangre completa no lisada, linfa, líquido espinal, orina y médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra comprende sangre completa.

10 Las poblaciones de células que pueden contarse en una muestra tal como una muestra biológica pueden comprender plaquetas, glóbulos rojos, glóbulos blancos y subconjuntos y precursores de cada uno. Una población preferida de glóbulos rojos comprende reticulocitos. Los subconjuntos preferidos de leucocitos comprenden linfocitos, monocitos y granulocitos. En algunas realizaciones, los subconjuntos de linfocitos son particularmente importantes y se prefiere más el recuento de linfocitos T CD4⁺ en una muestra de sangre completa.

15 Sin embargo, debe quedar claro que los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden aplicarse al recuento de una población cualquiera de células (por ejemplo, linfocitos T CD8⁺) así como a más de una población de células. Por ejemplo, con el fin de contar el número de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺ en una muestra, podrían usarse anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. En otro ejemplo, para calcular un diferencial de glóbulos blancos de tres partes, podrían usarse anticuerpos anti-CD45, anti-CD14 y anti-CD15. Todavía en otro ejemplo, para calcular el número absoluto de linfocitos T y/o linfocitos B, podrían usarse anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD19 (o anti-CD20) para contar células T o células B, respectivamente.

20 Todavía en otro ejemplo, podrían usarse anticuerpos anti-CD3 y anti-CD56 para contar células citotóxicas naturales (NK) (negativas para CD3, positivas para CD56) y células similares a NK (positivas para CD3, positivas para CD56). Cualquier población que pueda identificarse mediante uno o una combinación de marcadores celulares puede contarse sola o puede contarse con otras poblaciones en la muestra.

Cualquier población que pueda identificarse mediante un único marcador celular puede contarse sola o puede contarse con otras poblaciones en la misma muestra.

CITOMETRÍA DE FLUJO

25 El método de recuento absoluto y las composiciones para tal uso tal como se describen en este documento son particularmente idóneos para su uso con un aparato de citometría de flujo. Tal aparato se conoce generalmente en la técnica, pero sigue una breve descripción.

30 En citometría de flujo, se hacen pasar células sustancialmente de una en una a través de una o más regiones de detección en las que cada célula se ilumina por una fuente de energía. La fuente de energía comprende generalmente un medio que emite luz de una única longitud de onda en una región de detección tal como la proporcionada por un láser o una lámpara de arco de mercurio con filtros de paso banda apropiados. La fuente de luz puede comprender en particular lámparas (mercurio, xenón); láseres enfriados por agua de alta potencia (argón, kriptón, láser de colorante); láseres enfriados por aire de baja potencia (argón (488 nm), rojo-HeNe (633 nm), verde-HeNe, HeCd (UV)); láseres de diodo (azul, verde, rojo, violeta).

35 Las diferentes regiones de detección pueden incluir una o más fuentes de energía que emiten luz a diferentes longitudes de onda. En serie con cada región de detección, pueden usarse diversos medios de recogida de luz, tales como tubos fotomultiplicadores, para reunir la luz que se refracta por cada célula (generalmente denominada dispersión de luz directa o FSC), y/o luz que se refleja de manera ortogonal a la dirección del flujo de las células a través de una región de detección (dispersión de luz ortogonal, o dispersión lateral, SSC). Puede usarse uno o más medios de recogida de luz adicionales para recoger la luz fluorescente que puede emitirse desde la célula a medida que pasa a través de la región de detección y se ilumina por una fuente de energía. Las emisiones fluorescentes a diferentes longitudes de onda, tales como a partir de diferentes marcadores fluorescentes, pueden separarse mediante, por ejemplo, filtros de película delgada convencionales, rejillas de difracción, o similares y detectarse por separado. La dispersión de luz se correlaciona generalmente con las características físicas de cada célula.

45 Los citómetros de flujo comprenden además medios de registro y almacenamiento de datos, tales como un ordenador, en el que canales separados registran y almacenan la luz dispersada y la fluorescencia emitida por cada célula a medida que pasa a través de una región de detección (es decir, los datos recogidos para cada célula comprenden "un acontecimiento registrado"). Representando gráficamente la dispersión de luz ortogonal frente a la dispersión de luz directa o bien en tiempo real o bien volviendo a analizar los datos tras haberse registrado los acontecimientos, puede distinguirse entre y contar diversos tipos de células o partículas. Por ejemplo, usando la dispersión de luz y mediante el uso de marcadores de inmunofluorescencia apropiados, tales como anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromo de diferente longitud de onda de emisión, puede distinguirse además entre y contar tipos celulares dentro de la población de linfocitos (por ejemplo, entre linfocitos CD4⁺ y CD8⁺). Las patentes estadounidenses números 4.727.020, 4.704.891 y 4.599.307 describen la disposición de los diversos componentes que comprenden un citómetro de flujo y también los principios generales de su uso.

55 En diversas realizaciones, la muestra se añade al recipiente, matriz, micropartículas marcadas fluorescentemente y agente de unión a células marcado fluorescentemente, y se permite que el agente de unión a células reaccione con

5 y marque las células de interés relevantes. Se toma la muestra o una parte de la muestra y se procesa en un citómetro de flujo. El citómetro de flujo está equipado con uno o más detectores de fluorescencia, y se establece un activador de fluorescencia de modo que se cuenta la mayoría (preferiblemente más del 95%) de las micropartículas y células. Se establece una compuerta de fluorescencia de modo que las emisiones de fluorescencia de cada una de las micropartículas y células puedan distinguirse. Alternativamente, estas emisiones de fluorescencia pueden distinguirse por sus longitudes de onda de emisión posiblemente diferentes, detectándose las diferentes longitudes de onda por separado mediante el citómetro de flujo. Esto puede lograrse mediante el brillo relativo de las micropartículas y células. Se utiliza la razón de micropartículas con respecto a células en la parte de la muestra junto con la concentración conocida de micropartículas para proporcionar un recuento absoluto de células del tipo celular relevante.

10 Los ejemplos exponen una realización específica que usa citometría de flujo para obtener el recuento absoluto de células.

KITS

15 Se dan a conocer además kits para el recuento absoluto que usan o incluyen los métodos y las composiciones descritos en el presente documento.

En general, el kit puede comprender componentes de las composiciones para el recuento absoluto descritos en el presente documento, concretamente, la matriz, las micropartículas y el agente de unión a células. El kit puede comprender envases, y puede comprender además instrucciones para su uso.

20 El kit puede comprender uno o más elementos adicionales, incluyendo específicamente uno cualquiera o más fármacos, composiciones farmacéuticas o composiciones terapéuticas. En particular, el kit puede comprender uno o más reactivos terapéuticos adecuados para la enfermedad asociada con el recuento absoluto de células que se desea obtener.

25 Por tanto, por ejemplo, un kit relevante para la monitorización, el diagnóstico o la detección de VIH/SIDA puede comprender un recipiente con una matriz que comprende micropartículas y un agente de unión a células que es un anticuerpo anti-CD4. El kit es adecuado para evaluar los recuentos de CD4 y puede comprender fármacos antirretrovirales por ejemplo, tales como inhibidores de proteasa, AZT, etc.

30 En otro ejemplo, un kit relevante para monitorizar VIH/SIDA en pacientes pediátricos puede comprender un recipiente con una matriz que comprende micropartículas y 6 agentes de unión a células que son anticuerpos contra los siguientes marcadores celulares: CD3, CD4, CD8, CD19, CD45 y CD56. El kit es adecuado para evaluar el recuento de CD4 así como células positivas para CD4 como porcentaje de los linfocitos totales.

El kit puede comprender uno o más recipientes que comprenden micropartículas, matriz y agentes de unión a células. Los recipientes pueden estar dispuestos en un bastidor, por ejemplo.

35 El kit puede comprender uno o más agentes farmacéuticos. Por tanto, cuando el kit comprende una matriz de reactivos que cuando se usa puede diagnosticar una enfermedad en virtud del recuento absoluto obtenido de un tipo celular relevante, por ejemplo, CD3+ CD4+, el kit comprende preferiblemente un agente farmacéutico que puede usarse para tratar esa enfermedad. Por ejemplo, un kit puede comprender una matriz de reactivos con un anticuerpo anti-CD4, junto con un fármaco contra el VIH o contra el SIDA tal como un inhibidor de proteasa o un fármaco antirretroviral. En general, puede usarse cualquiera de las combinaciones dadas a conocer a continuación bajo "Usos terapéuticos y de farmacodiagnóstico" como base de un kit.

40 USOS PARA CALIBRACIÓN, CONTROL DE CALIDAD Y COMPENSACIÓN

45 Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento también pueden usarse para calibración, control de calidad, configuración de instrumentos y compensación. Pueden usarse en particular para la alineación y el establecimiento de los retardos de tiempo de láser en un citómetro de flujo que emplea perlas que preferiblemente son intensamente fluorescentes y tienen baja variabilidad en tanto el tamaño como las intensidades de fluorescencia.

Pueden usarse en particular para el control de calidad de un instrumento a intervalos regulares. Un ejemplo preferido es el control de calidad diario de la resolución y sensibilidad de un citómetro de flujo.

50 Pueden usarse en particular para comprobar la capacidad del citómetro de flujo para resolver poblaciones de perlas de intensidades variables. Un ejemplo podría ser una mezcla de 2-8 poblaciones de perlas con diferentes intensidades de fluorescencia (perlas premarcadas) y opcionalmente una perla de blanco (no marcada). Para compensación, pueden usarse para establecer una compensación en línea así como para una compensación fuera de línea. En ambos casos una realización ventajosa sería una mezcla de 2 o más poblaciones de perlas en las que cada población porta sólo un único fluorocromo bien definido (por ejemplo FITC, RPE-Cy5, APC o un punto cuántico) y opcionalmente una población de perlas de blanco. Preferiblemente, las intensidades de fluorescencia de las poblaciones de perlas marcadas son altas.

Debe indicarse que una opción es mezclar composiciones independientes antes de su uso. Como ejemplo, puede mezclarse una composición con una única población de perlas que porta FITC con una composición con una única población de perlas que porta RPE antes de que se analicen en un instrumento (por ejemplo, un citómetro de flujo). Como ejemplo adicional, puede mezclarse una composición con 3 poblaciones de perlas de las que la primera porta FITC, la segunda RPE y la tercera APC (incluyendo opcionalmente una perla de blanco) con una composición con una o más poblaciones de perlas en las que cada población está marcada con un fluorocromo único (por ejemplo azul Pacífico, amarillo cascada, RPE-rojo Texas, RPE-Cy5, RPE-Cy7, APC-Cy7, Alexa700 o Qdot605).

Otra realización para compensación es una matriz con una perla de captura (una perla que porta anticuerpos unidos covalentemente con especificidad por anticuerpos de otra especie, un ejemplo de lo cual podría ser IgG1 de conejo anti-ratón). La perla de captura puede cargarse entonces con un reactivo (por ejemplo, anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón anti-CD3 humano marcado con RPE-Cy5) convirtiendo de ese modo la perla de captura en una perla marcada con RPE-Cy5. Es posible mezclar una composición de perla de captura con una composición de perla premarcada tanto después como antes de la carga de la perla de captura.

En tales realizaciones no es necesario incluir agentes de unión a células. Todo lo que se requiere es una matriz que comprende micropartículas, en la que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente. Tales matrices pueden estar hechas esencialmente de la misma manera (y tener las propiedades relevantes similares que) las matrices de reactivos que comprenden matriz, micropartículas y agente de unión a células. Por tanto, se da a conocer una composición que comprende una cantidad predeterminada de micropartículas dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared de un recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente.

Otra realización consiste en una composición de perlas premarcadas junto con reactivos de unión a células. Un ejemplo de una composición son perlas marcadas con FITC, marcadas con RPE y marcadas con APC así como anticuerpo de ratón anti-CD3 humano RPE-Cy5. Otro ejemplo son perlas marcadas con FITC, marcadas con RPE, marcadas con APC así como anticuerpo de ratón anti-CD4 humano RPE-Cy5, anticuerpo de ratón anti-CD19 humano azul Pacífico y anticuerpo de ratón anti-CD8 humano RPE-Cy7. Es posible mezclar composiciones con perlas premarcadas con composiciones tanto con perlas premarcadas (y/o una perla de blanco) como con reactivos de unión a células antes así como después de la adición de la muestra de células.

La información obtenida a partir de tales realizaciones puede usarse directamente en el instrumento (por ejemplo, citómetro de flujo) para configurar el instrumento y los controles de software (un ejemplo es para configurar parámetros de compensación y un ejemplo adicional es para configurar los voltajes de PMT). Tal configuración puede realizarse manualmente por un usuario, automáticamente por software especializado o de manera semiautomática (usuario asistido por software). De manera similar, la información obtenida a partir de tales realizaciones puede usarse para garantía de calidad y por tanto usarse para determinar si un instrumento está operativo o no.

Un ejemplo podría ser la determinación de si el análisis automático, manual o semiautomático de 6 perlas pico (una mezcla de perlas con 6 poblaciones: una población de perlas de blanco y 5 poblaciones fluorescentes cada una con una intensidad única) da lugar a que las poblaciones detectadas se distingan y se separen bien por el instrumento (por ejemplo citómetro de flujo). La información obtenida a partir de tales realizaciones también puede usarse para monitorizar el rendimiento del instrumento. La información obtenida a partir de las composiciones usadas para compensación puede almacenarse (por ejemplo, en un archivo FCS) para el análisis fuera de línea (por ejemplo, el derrame de cada fluorocromo en cada canal de fluorescencia puede medirse y usarse para el cálculo de una matriz de derrame). La aplicación de la información almacenada para fines de compensación puede realizarse por medios automáticos, semiautomáticos o manuales.

Como ejemplo, un protocolo para calibrar un citómetro de flujo usando perlas incrustadas en una matriz puede realizarse tal como sigue: (i) Usar un tubo de matriz que contiene perlas de calibración (ii) disolver la matriz en el tubo con un diluyente tamponado isotónico (preferiblemente solución salina tamponada con fosfato, PBS) liberando así las perlas en la disolución; (iii) analizar el contenido del tubo en el citómetro de flujo; (iv) ajustar los voltajes de PMT de manera que un pico de perla seleccionada tenga una mediana de intensidad o intensidad media seleccionada.

Como otro ejemplo, un protocolo para monitorizar el rendimiento de un citómetro de flujo usando perlas incrustadas en una matriz puede realizarse tal como sigue: Los voltajes de PMT o SD pico (o CV) obtenidos en el ejemplo anterior se representan gráficamente frente al tiempo y se pone en servicio si se alcanza un valor umbral.

Un protocolo para la compensación en un citómetro de flujo (o datos derivados de un citómetro de flujo) usando perlas incrustadas en una matriz puede realizarse tal como sigue: Se realiza la compensación usando perlas marcadas con los mismos fluorocromos que los anticuerpos de interés. Estas perlas marcadas se procesan por separado o en una mezcla para evaluar para cada fluorocromo cuánta fluorescencia se derrama en los otros canales de fluorescencia. Este derrame se indica normalmente como una fracción o porcentaje de la señal en el canal asignado a ese fluorocromo y también se denomina coeficiente de derrame (por ejemplo, la señal de una perla

marcada con FITC puede ser 1000 en el canal de FITC pero 300 en el canal de RPE. Por tanto, coeficiente de derrame de FITC en el canal de RPE es del 0,30 o el 30%). Basándose en tal conjunto de datos de coeficientes de derrame, se calcula una matriz de compensación. Se permite que esta matriz opere sobre el conjunto de datos obtenido para cada célula o partícula analizada de la muestra de interés. Este procedimiento elimina matemáticamente la señal en cualquier canal de fluorescencia dado que se derive de cualquier otro fluorocromo distinto del que pertenece a ese canal y se conoce bien en la técnica. El conjunto de datos para cada célula o partícula puede corregirse para cualquier autofluorescencia antes de que se permita que la matriz de compensación opere sobre el conjunto de datos.

USOS DE DIAGNÓSTICO

La matriz de reactivos descrita en el presente documento puede emplearse ventajosamente en el diagnóstico de enfermedades, a través de la elección de un tipo celular relevante que va a contarse. Además, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse también para monitorizar el estado de salud y para determinar la presencia de infecciones latentes, por ejemplo. Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse también para monitorizar el progreso del tratamiento, o para proporcionar una indicación del pronóstico.

En diversas realizaciones, la matriz de reactivos se usa para diagnosticar, detectar o monitorizar VIH/SIDA.

Se apreciará que es posible usar el método de recuento absoluto tal como se expone en este documento para comparar el recuento absoluto de dos tipos celulares. Por tanto, se proporciona generalmente un método de determinación de la razón del recuento de un primer tipo celular con respecto al recuento de un segundo tipo celular, comprendiendo el método un método tal como se expuso anteriormente aplicado a al menos uno de (preferiblemente cada uno de) el primer y segundo tipo celular.

Resulta evidente que varias enfermedades se caracterizan por un desequilibrio en la razón de un tipo celular con respecto a otro. Por consiguiente, es posible usar los métodos y las composiciones descritos en el presente documento para el recuento absoluto de células para obtener un diagnóstico de, o una indicación preliminar de la existencia de, una enfermedad de este tipo realizando las mediciones apropiadas. También se prevé que los métodos y las composiciones descritos en el presente documento puedan usarse para una evaluación del pronóstico de un paciente diagnosticado con una enfermedad (diagnóstico que, por supuesto, puede realizarse usando los métodos descritos en el presente documento).

Un ejemplo en el que es relevante determinar la razón de poblaciones de células específicas en la razón de células $CD4^+$ con respecto a $CD8^+$, que está elevada en muchos pacientes con deficiencias inmunitarias tales como SIDA. En la descripción a continuación, "células $CD4^+$ " incluye "CD3+ $CD4^+$ " y "células $CD8^+$ " incluye células "CD3+ $CD8^+$ ".

Por tanto, se proporciona un método de monitorización de la progresión de la infección por VIH, comprendiendo el método determinar un primer recuento absoluto de células $CD4^+$ y un segundo recuento absoluto de células $CD8^+$ en una muestra de un paciente mediante un método que comprende: (a) proporcionar un recipiente que contiene: (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y (ii) un anticuerpo anti- $CD4$ y un anticuerpo anti- $CD8$; en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente; (b) añadir un volumen conocido de muestra al recipiente; (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células $CD4^+$ y células $CD8^+$ contando las micropartículas, células $CD4^+$ y células $CD8^+$ en un volumen de la muestra; (d) determinar el recuento absoluto de células $CD4^+$ y células $CD8^+$ multiplicando el número de células $CD4^+$ y células $CD8^+$ por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra y (e) determinar la razón de células $CD4^+$ con respecto a $CD8^+$ dividiendo el recuento de $CD4^+$ entre el recuento de $CD8^+$. Por tanto, se obtienen los recuentos absolutos de células y las razones de células al mismo tiempo.

Otro ejemplo de la utilidad de determinar las razones de poblaciones de células se expone en la patente estadounidense n.º 4.677.061, que describe la importancia de determinar la razón de tipos celulares específicos en la monitorización de pacientes autoinmunitarios, particularmente pacientes con esclerosis múltiple. En esta patente, se determina la razón de linfocitos $CD4^+$ o $CD8^+$ linfocitos con respecto a subconjuntos de los mismos que llevan antígenos de diferenciación celular para la monitorización de esclerosis múltiple. Particularmente útil es la razón de células $CD4^+$ con respecto a $Lp220^+$. Por consiguiente, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para determinar los recuentos absolutos de células $CD4^+$ en comparación con células $CD8^+$, y/o células $CD4^+$ con respecto a células $Lp220^+$ mediante el uso de agentes de unión a células apropiados.

Por tanto, se proporciona un método de diagnóstico de esclerosis múltiple, comprendiendo el método determinar un primer recuento absoluto de células $CD4^+$ en una muestra de un paciente mediante un método que comprende: (a) proporcionar un recipiente que contiene: (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y (ii) un anticuerpo anti- $CD4$; en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente; (b) añadir un volumen conocido de muestra al recipiente; (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células

CD4⁺ contando las micropartículas y células CD4⁺ en un volumen de la muestra; y (d) determinar el recuento absoluto de células CD4⁺ multiplicando el número de células CD4⁺ por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra.

5 Puede obtenerse un segundo recuento absoluto de células CD8⁺ (y/o células Lp220⁺) de una manera similar a través del uso de anticuerpos anti-CD8 y/o anticuerpos anti-Lp220 apropiados, y se comparan los recuentos. Alternativamente, y preferiblemente, puede emplearse una matriz que comprende un anticuerpo anti-CD4 junto con un anticuerpo anti-CD8 (o junto con un anticuerpo anti-Lp220 según sea el caso). Por tanto, los anticuerpos mencionados anteriormente (anti-CD4, anti-CD8 y anti-Lp220 conjugados con 3 moléculas fluorescentes diferentes) podrían combinarse también en un recipiente proporcionando así los recuentos absolutos así como las razones de células simultáneamente.

Se sabe también que otras enfermedades se caracterizan por una disminución o un aumento anómalo, con el tiempo, del número de un tipo celular particular en un cuerpo humano o animal. Por tanto se da a conocer el uso de las composiciones y los métodos de recuento absoluto para obtener el recuento absoluto de un tipo celular en dos momentos diferentes.

15 Un ejemplo de una enfermedad asociada con los cambios en el número de células es la infección por VIH/SIDA, que se caracteriza por una disminución en el número de células CD4⁺. Las infecciones por VIH progresan a través de varios estadios clínicos diferentes que pueden distinguirse de una variedad de modos. Un sistema de clasificación aceptado actualmente para seguir atentamente el progreso de la enfermedad desde la exposición inicial hasta los estadios posteriores se describe en el sistema de clasificación de Walter Reed. Varios criterios entran en la evaluación de cada uno de los varios estadios. Por ejemplo, la presencia o ausencia de anticuerpos frente a VIH o la presencia o ausencia del propio virus se usan como indicación de la exposición inicial a VIH (WR1). Posteriormente, puede medirse el número de linfocitos CD4⁺ en la sangre. Una disminución en el número de linfocitos CD4⁺ indica que la enfermedad ha progresado (WR3).

25 Por tanto se proporciona un método de diagnóstico de VIH/SIDA, comprendiendo el método determinar un primer recuento absoluto de células CD4⁺ en una muestra de un paciente en un primer punto de tiempo mediante un método que comprende: (a) proporcionar un recipiente que contiene: (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y (ii) un anticuerpo anti-CD4; en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente; (b) añadir un volumen conocido de muestra que contiene células CD4⁺ al recipiente; (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células CD4⁺ contando las micropartículas y células CD4⁺ en un volumen de la muestra; y (d) determinar el recuento absoluto de células CD4⁺ multiplicando el número de células CD4⁺ por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra.

35 En diversas realizaciones, el método comprende además establecer un recuento de linfocitos totales del paciente. Preferiblemente, el porcentaje de células CD4⁺ con respecto a los linfocitos totales se calcula y se usa para monitorizar la progresión de la enfermedad, en particular para pacientes pediátricos. El recuento de los linfocitos totales se establece preferiblemente en la misma muestra que la usada para contar linfocitos CD4⁺, usando preferiblemente la misma metodología que la descrita en el presente documento.

40 Alternativamente, se proporciona un método de monitorización de VIH, comprendiendo el método determinar un primer porcentaje de células CD3⁺CD4⁺ con respecto a los linfocitos totales en una muestra de un paciente pediátrico en un primer punto de tiempo mediante un método que comprende: (a) proporcionar un recipiente que contiene: (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y (ii) un anticuerpo anti-CD4; en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente; (b) añadir un volumen conocido de muestra que contiene células CD3⁺CD4⁺ al recipiente; (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células CD4⁺ contando las micropartículas y células CD4⁺ en un volumen de la muestra; (d) determinar el recuento absoluto de células CD4⁺ multiplicando el número de células CD4⁺ por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra; (e) determinar la razón de micropartículas con respecto a linfocitos contando las micropartículas y los linfocitos en un volumen de la muestra; (f) determinar el recuento absoluto de linfocitos multiplicando el número de linfocitos por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra; y (g) determinar las células CD3⁺CD4⁺ como porcentaje de los linfocitos.

El método puede comprender además determinar un segundo recuento absoluto de linfocitos CD4⁺ en una muestra de un paciente en un segundo punto de tiempo. Preferiblemente, el recuento absoluto de células CD4⁺ en el segundo punto de tiempo se obtiene usando un método igual, similar o correspondiente.

DETERMINACIONES DEL ESTADO

55 Aparte del diagnóstico de enfermedades, queda claro que los recuentos absolutos de tipos celulares pueden proporcionar indicadores para otros estados del organismo. Por ejemplo, pueden contarse tipos celulares específicos para establecer el estado de salud, estado nutricional, estado mental, la propensión a enfermedad, la presencia o ausencia de enfermedad, la presencia o ausencia de infección latente, preferiblemente infección por VIH

de un organismo.

5 Por ejemplo, la estimación de recuentos de subconjuntos de linfocitos es una herramienta útil en el diagnóstico de cambios inmunitarios y en la nutrición en pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatorios. Puede usarse citometría de flujo para estimar antígenos CD3, CD4, CD8, CD19, y CD16 + 56 usando los métodos y las composiciones descritos en el presente documento (Grzegorzewska AE, Leander M. Adv Perit Dial. 2002; 18:6-11).

10 Además, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para ayudar en la evaluación de la activación de mecanismos autoinmunitarios, lo que es valioso en el diagnóstico temprano de la alergia a la leche de vaca (ALV). Grandes números de células B CD19+ activadas y bajos números de células T CD8+ podrían considerarse como marcadores tempranos para la alergia alimentaria puesto que pueden detectarse ya en la sangre periférica durante los síntomas más tempranos de ALV (Jarvinen KM, Aro A, Juntunen-Backman K, Suomalainen H. Pediatr Allergy Immunol. Agosto de 1998; 9(3): 139-42). Por consiguiente, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para obtener los recuentos absolutos de células B CD19+ y/o células T CD8+ para la evaluación de la alergia alimentaria.

15 Además, multímeros marcados fluorescentemente de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) son reactivos novedosos que hacen posible identificar y enumerar directamente células T inducidas por enfermedad y vacuna mediante análisis citométrico de flujo. Los receptores de células T específicos de antígeno se reconocen por reactivos marcados con fluorocromo que contienen moléculas de CMH cargadas con péptidos coincidentes. Esto hace posible utilizar citometría de flujo para una visualización rápida y altamente específica de células T específicas de virus, por ejemplo CMV. El uso de tales multímeros en las matrices de reactivos descritas en el presente documento hace posible obtener los recuentos absolutos de tales células T infectadas con virus, para el diagnóstico de infección viral y para obtener información sobre la probabilidad de progresión de la enfermedad viral.

USOS TERAPÉUTICOS Y DE FARMACODIAGNÓSTICO

25 Resultará evidente que los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden combinarse con métodos terapéuticos (conocidos o por identificar). Por tanto, es posible usar la matriz de reactivos para el diagnóstico de una enfermedad, seguido por la administración de un régimen terapéutico para aliviar o tratar esa enfermedad. La matriz de reactivos tiene también utilidad por tanto en el campo de farmacodiagnóstico.

Por ejemplo, se da a conocer el uso de los métodos y las composiciones descritos en el presente documento para el diagnóstico, la detección o monitorización de SIDA, seguido por la administración de un fármaco anti-VIH o anti-SIDA tal como un antirretroviral o inhibidor de proteasa.

30 En general, se da a conocer el uso de cualquiera de los métodos y las composiciones descritos en el presente documento, en particular, la matriz de reactivos, para el diagnóstico de una enfermedad, seguido por la administración de un fármaco apropiado para tratar o aliviar esa enfermedad.

35 Se da a conocer por tanto un método para el tratamiento de una enfermedad, comprendiendo el método determinar los recuentos absolutos de células por volumen unitario de una muestra, comprendiendo el método: (a) proporcionar un recipiente que contiene: (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y (ii) un agente de unión a células; en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente; (b) añadir un volumen conocido de muestra al recipiente; (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células contando las micropartículas y células en un volumen de la muestra; (d) determinar el recuento absoluto de células multiplicando el número de células por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra; (e) determinar si el recuento absoluto de las células es diagnóstico de una enfermedad en el individuo del que se toma la muestra, y (f) administrar una cantidad eficaz de un compuesto farmacéutico que puede tratar esa enfermedad al paciente.

45 Por tanto, por ejemplo, los métodos y las composiciones descritos en el presente documento son útiles para el diagnóstico y tratamiento de tricoleucemia. Los tricoleucocitos presentan antígenos de superficie característicos definidos por anticuerpos monoclonales, y puede emplearse una matriz de reactivos que comprende micropartículas y tales anticuerpos para el recuento absoluto de tricoleucocitos. Tales antígenos de superficie incluyen los marcadores de células B CD19, CD20 y CD22 así como los antígenos CD11c y CD25, y la matriz de reactivos comprenderá anticuerpos correspondientes que pueden detectar tales marcadores. Tras el diagnóstico, se trata la tricoleucemia con análogos de nucleósidos de purina (2'-desoxicoformicina o 2-clordesoxiadenosina).

50 Como otro ejemplo, la leucemia promielocítica aguda (LPA) puede distinguirse de otras subclases de leucemia mieloide aguda por tener una población mieloide que expresa CD13 y CD33 pero no CD34 o HLA-DR. Se usa una matriz de reactivos que comprende micropartículas y anticuerpos que pueden detectar tales antígenos para el recuento absoluto de esta población mieloide. Tras el diagnóstico, se trata eficazmente la LPA usando ácido todo-trans-retinoico, cuando se diagnostica apropiadamente.

Además, en general, con el fin de establecer el diagnóstico o el establecimiento del estado, las muestras se obtienen del mismo individuo, preferiblemente del mismo órgano o tejido dentro de un individuo. Sin embargo, quedará claro

que los métodos y las composiciones descritos en el presente documento para el recuento absoluto pueden usarse para estudios epidemiológicos, en los que las muestras pueden obtenerse de individuos diferentes dentro de una población o cohorte de interés. Los recuentos primero y segundo pueden compararse entonces para proporcionar información sobre el estado de la muestra o de cada muestra, o el estado del tejido, órgano, organismo, cohorte o población del que se deriva la muestra o de cada tal tejido, órgano, organismo, cohorte o población. Las muestras son preferiblemente de individuos diferentes dentro de una población o cohorte.

ANTICUERPO

El agente de unión a células puede comprender preferiblemente una inmunoglobulina, preferiblemente un anticuerpo. El anticuerpo puede unirse a, preferiblemente unirse específicamente a, el antígeno de interés (tal como se describe en otra parte en este documento) con el fin de identificar un tipo celular de modo que se cuente.

Los anticuerpos comprenden moléculas de inmunoglobulina. Las moléculas de inmunoglobulina son en el sentido más amplio miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, una familia de polipéptidos que comprende el plegado inmunoglobulina característico de moléculas de anticuerpo, que contiene dos láminas β y, habitualmente, un enlace disulfuro conservado. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas están implicados en muchos aspectos de las interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo papeles extendidos en el sistema inmunitario (por ejemplo, anticuerpos, moléculas receptoras de células T y similares), implicación en la adhesión celular (por ejemplo, las moléculas ICAM) y la señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tales como el receptor de PDGF). Los métodos descritos en el presente documento de detección de entidades detectable y de uso del patrón de referencia pueden hacer uso por tanto de cualquier molécula de la superfamilia de inmunoglobulinas que pueda unirse a una diana. También pueden usarse péptidos o fragmentos derivados de inmunoglobulinas.

Anticuerpos, tal como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo que pueden unirse a una diana seleccionada, e incluyendo Fv, ScFv, F(ab') y F(ab')₂, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos modificados por ingeniería genética incluyendo anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados, y anticuerpos seleccionados artificialmente producidos usando presentación en fago o técnicas alternativas. Fragmentos pequeños, tales como Fv y ScFv, presentan propiedades ventajosas para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico debido a su pequeño tamaño y distribución tisular superior consecuyente. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla o ScFv.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos alterados que comprenden una proteína efectora tal como una toxina o un marcador. El uso de anticuerpos marcados permite la obtención de imágenes de la distribución del anticuerpo *in vivo*. Tales marcadores pueden ser marcadores radiactivos o marcadores radiopacos, tales como partículas de metal, que pueden visualizarse fácilmente dentro del cuerpo de un paciente. Además, pueden ser marcadores fluorescentes (tales como los descritos en el presente documento) u otros marcadores que pueden visualizarse en muestras de tejido retiradas de pacientes. Los anticuerpos con grupos efectores pueden unirse a cualquier medio de asociación tal como se describió anteriormente.

Pueden obtenerse anticuerpos de suero animal o, en el caso de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos, producirse en cultivo celular. Puede usarse tecnología de ADN recombinante para producir los anticuerpos según el procedimiento establecido, en cultivo de células bacterianas, de levaduras, insectos o preferiblemente de mamíferos. El sistema de cultivo celular seleccionado secreta preferiblemente el producto de anticuerpo.

El crecimiento de células de hibridoma o células huésped de mamífero *in vitro* se lleva a cabo en medios de cultivo adecuados, que son los medios de cultivo habituales y convencionales, por ejemplo medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) o medio RPMI 1640, opcionalmente complementado mediante un suero de mamífero, por ejemplo suero de ternero fetal, u oligoelementos y complementos que sostienen el crecimiento, por ejemplo células alimentadoras tales como células de exudado peritoneal de ratón normal, células del bazo, macrófagos de la médula ósea, 2-aminoetanol, insulina, transferrina, lipoproteína de baja densidad, ácido oleico, o similares. La multiplicación de las células huésped que son células bacterianas o células de levaduras se lleva a cabo asimismo en medios de cultivo adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo para bacterias en medio LB, NZCYM, NZYM, NZM, caldo Terrific, SOB, SOC, 2 x YT o medio mínimo M9, y para levaduras en medio YPD, YEPD, medio mínimo o medio mínimo completo selectivo (*dropout*).

El uso de células de insectos como huéspedes para la expresión de proteínas tiene las ventajas de que el proceso de clonación y expresión es relativamente fácil y rápido. Además, hay una alta probabilidad de obtener una proteína correctamente plegada y biológicamente activa en comparación con la expresión bacteriana o en levaduras. Las células de insectos pueden cultivarse en medio libre de suero, que es más barato y seguro en comparación con medio que contiene suero. Puede usarse baculovirus recombinante como vector de expresión, y usarse el constructo usado para transfectar una línea de células huésped, que puede ser cualquiera de varias líneas celulares de lepidóptero, en particular *Spodoptera frugiperda sf9*, tal como se conoce en la técnica. Se proporcionan revisiones de la expresión de proteínas recombinantes en células huésped de insectos por Altmann *et al.* (1999), Glycoconj J 1999, 16, 109-23 y Kost y Condreay (1999), Curr Opin Biotechnol, 10, 428-33.

La producción *in vitro* proporciona preparaciones de anticuerpos relativamente puras y permite el aumento de la

escala para dar grandes cantidades de los anticuerpos deseados. Se conocen en la técnica técnicas para cultivo de células bacterianas, de levaduras, insectos y mamíferos e incluyen cultivo en suspensión homogéneo, por ejemplo en un reactor agitado por aire o en un reactor agitador continuo, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos.

5 También pueden obtenerse grandes cantidades de los anticuerpos deseados multiplicando células de mamíferos *in vivo*. Para este fin, se inyectan células de hibridoma que producen los anticuerpos deseados en mamíferos histocompatibles para provocar el crecimiento de tumores que producen anticuerpos. Opcionalmente, se sensibilizan los animales con un hidrocarburo, especialmente aceites minerales tales como pristano (tetrametil-pentadecano), antes de la inyección. Tras de una a tres semanas, se aíslan los anticuerpos de los líquidos corporales de esos mamíferos. Por ejemplo, se inyectan por vía intraperitoneal células de hibridoma obtenidas por fusión de células de mieloma adecuadas con células de bazo que producen anticuerpos de ratones Balb/c, o células transfectadas derivadas de la línea celular de hibridoma Sp2/0 que producen los anticuerpos deseados en ratones Balb/c pretratados opcionalmente con pristano y, tras de una a dos semanas, se toma líquido ascítico de los animales.

10 Lo anterior y otras técnicas se comentan en, por ejemplo, Kohler y Milstein, (1975) Nature 256:495-497; documento US 4.376.110; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, (1988) Cold Spring Harbor, incorporado en el presente documento como referencia. Se describen técnicas para la preparación de moléculas de anticuerpo recombinantes en las referencias anteriores y también en, por ejemplo, los documentos EP 0623679; EP 0368684 y EP 0436597, que se incorporan en el presente documento como referencia.

15 Los sobrenadantes de cultivo celular se examinan para detectar los anticuerpos deseados, preferentemente mediante la tinción inmunofluorescente de células que expresan la diana deseada mediante inmunotransferencia, mediante un inmunoensayo enzimático, por ejemplo un ensayo de tipo sándwich o un ensayo de puntos, o un radioinmunoensayo.

20 Para el aislamiento de los anticuerpos, las inmunoglobulinas en los sobrenadantes de cultivo o en el líquido ascítico pueden concentrarse, por ejemplo mediante precipitación con sulfato de amonio, diálisis frente a material higroscópico tal como polietilenglicol, filtración a través de membranas selectivas, o similares. Si es necesario y/o se desea, los anticuerpos se purifican mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa y/o cromatografía de afinidad, por ejemplo cromatografía de afinidad con la proteína que contiene una diana o con proteína-A.

25 Los anticuerpos generados según los procedimientos anteriores pueden clonarse por aislamiento del ácido nucleico de las células, según procedimientos convencionales. De manera útil, los dominios variables de ácidos nucleicos de los anticuerpos pueden aislarse y usarse para construir fragmentos de anticuerpo, tales como scFv.

30 Los métodos descritos en el presente documento emplean preferiblemente ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o para un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos. Por definición tales ácidos nucleicos comprenden ácidos nucleicos monocatenarios codificantes, ácidos nucleicos bicatenarios que consisten en los ácidos nucleicos codificantes y ácidos nucleicos complementarios a los mismos, o estos ácidos nucleicos complementarios (monocatenarios) por sí mismos.

35 Además, ácidos nucleicos que codifican para un dominio variable de cadena pesada y/o para un dominio variable de cadena ligera de anticuerpos pueden ser ácidos nucleicos enzimática o químicamente sintetizados teniendo la secuencia auténtica que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o dominio variable de cadena ligera que se produce de manera natural, o un mutante del mismo. Un mutante de la secuencia auténtica es un ácido nucleico que codifica para un dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos mencionados anteriormente en el que uno o más aminoácidos se delecionan o intercambian por uno o más aminoácidos distintos. Preferiblemente la(s) modificación/modificaciones es/son fuera de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable de cadena pesada y/o del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo. Un ácido nucleico mutante de este tipo también pretende ser un mutante silencioso en el que uno o más nucleótidos se reemplazan por otros nucleótidos con los nuevos codones que codifican para el/los mismo(s) aminoácido(s). Una secuencia mutante de este tipo también es una secuencia degenerada. Las secuencias degeneradas están degeneradas dentro del significado del código genético porque un número ilimitado de nucleótidos se reemplazan por otros nucleótidos sin dar como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos codificada originalmente. Tales secuencias degeneradas pueden ser útiles debido a sus sitios de restricción diferentes y/o frecuencia de codones particulares que se prefieren por el huésped específico, particularmente células de levaduras, bacterianas o de mamíferos, para obtener una expresión óptima del dominio variable de cadena pesada y/o un dominio variable de cadena ligera.

40 El término mutante pretende incluir un mutante de ADN obtenido mediante mutagénesis *in vitro* o *in vivo* de ADN según métodos conocidos en la técnica.

45 Puede usarse tecnología de ADN recombinante para mejorar los anticuerpos. Por tanto, pueden construirse anticuerpos quiméricos con el fin de disminuir la inmunogenicidad de los mismos en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Además, puede minimizarse la inmunogenicidad humanizando los anticuerpos mediante injerto de CDR

[patente europea 0 239 400 (Winter)] y, opcionalmente, modificación del entramado [patente europea 0239400; Riechmann *et al.*, (1988) Nature 322:323-327; y tal como se revisa en la solicitud de patente internacional WO 90/07861 (Protein Design Labs)].

- 5 Pueden emplearse ácidos nucleicos recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo fusionado a un dominio constante humano γ , por ejemplo $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ o $\gamma 4$, preferiblemente $\gamma 1$ o $\gamma 4$. Asimismo también pueden usarse ADN recombinantes que comprenden un inserto que codifica para un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo fusionado a un dominio constante humano κ o λ , preferiblemente κ .
- 10 Más preferiblemente, pueden usarse anticuerpos con injerto de CDR, que son preferiblemente dominios variables de cadena pesada y cadena ligera con injerto de CDR sólo. Ventajosamente, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se unen por medio de un grupo espaciador, que comprende opcionalmente una secuencia señal que facilita el procesamiento del anticuerpo en la célula huésped y/o un ADN que codifica para un péptido que facilita la purificación del anticuerpo y/o un sitio de escisión y/o un espaciador peptídico y/o una molécula efectora. Tales anticuerpos se conocen como ScFv.
- 15 Además pueden generarse anticuerpos mediante mutagénesis de genes de anticuerpo para producir repertorios artificiales de anticuerpos. Esta técnica permite la preparación de bibliotecas de anticuerpos, tal como se comenta adicionalmente a continuación; las bibliotecas de anticuerpos también están disponibles comercialmente. Por tanto, se usan repertorios artificiales de inmunoglobulinas, preferiblemente repertorios de ScFv artificiales, como fuente de inmunoglobulinas.
- 20 Pueden unirse anticuerpos aislados o clonados a otras moléculas, por ejemplo, medios de asociación de ácido nucleico o proteínas mediante acoplamiento químico, usando protocolos conocidos en la técnica (por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor, y Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1991), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

25 Ejemplos

Se presentan ahora varios ejemplos (ejemplo 1 a ejemplo 10) de la evaluación y práctica de la presente invención. Debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan para ilustrar algunos de los beneficios y usos de la presente invención y no se pretende que sean exhaustivos o limitativos de la invención de ningún modo.

Ejemplo 0. Secado de la matriz que incorpora micropartículas usando liofilización

- 30 1. Se preparan tres disoluciones al 20% (p/v) de fructosa, trehalosa y rafinosa.
2. Se constituyen 4 tubos con 1: fructosa; 2: fructosa:trehalosa, 1:1; 3: fructosa:rafinosa, 1:1; 4: fructosa:trehalosa:rafinosa, 1:1:1.
3. A cada tubo se le añaden 100 μ l de micropartículas.
4. Se enfrían los tubos hasta -18°C durante 1 h.
- 35 Todavía congelados, se colocan los tubos en un condensador de frío Heto CT110 equipado con una bomba de vacío Edward RV12.
- Tras dos horas, el disolvente se había eliminado por liofilización, pero el procedimiento había provocado que la matriz formara burbujas y grietas en todos los tubos, permitiendo que parte de la matriz se saliese de los tubos. Por tanto se desecharon los tubos de matriz y se desarrolló un procedimiento de secado más lento.

- 40 Ejemplo 1. Matriz de reactivos: Reactivos y procedimientos generales

A. Reactivos usados en los ejemplos descritos

Tabla 2. Reactivos usados en los ejemplos del método

Reactivo	Proveedor	N.º de catálogo
CD3 FITC UCHT1	Dako A/S	F0818
CD3 RPE UCHT1	Dako A/S	R0810
CD3 RPE-Cy5 UCHT1	Dako A/S	C7067
CD3 RPE-A680 UCHT1	Dako A/S	-
CD3 azul Pacífico UCHT1	Dako A/S	PB982
CD3 APC UCHT1	Dako A/S	C7225
CD4 RPE MT310	Dako A/S	R0805
CD4 FITC MT310	Dako A/S	F0766

ES 2 533 334 T3

CD4 APC MT310	Dako A/S	C7226
CD8 RPE DK25	Dako A/S	R0806
CD8 APC DK25	Dako A/S	C7227
CD19 RPE-Cy5 HD37	Dako A/S	C7066
CD45 RPE-Cy5 T29/33	Dako A/S	C7099
CD45 FITC T29/33	Dako A/S	F0861
CD45 APC T29/33	Dako A/S	C7230
CD45 amarillo cascada T29/33	Dako A/S	-
CD56 RPE MOC-1	Dako A/S	R7127
MPO APC MPO-7	Dako A/S	C7246
Control negativo	Dako A/S	X0968
Perlas CytoCount™	Dako A/S	S2366
Easy-Lyse™	Dako A/S	S2364
Uti-Lyse™	Dako A/S	S3350
IntraStain	Dako A/S	K 2311
Fructosa	Sigma	F-0127
Trehalosa	Sigma	T-9531
Tubos TruCOUNT™	Becton Dickinson	340334
Reactivo MultiTEST™	Becton Dickinson	342417
Disolución de lisis FACS™	Becton Dickinson	349202

Nota: Dako A/S se conocía anteriormente como DakoCytomation A/S

B. Preparación de las matrices

1. Se constituyen disoluciones al 20% (p/v) de los azúcares y se mezclan en una razón 1:1.
2. Se añaden 15 µl de la mezcla a tubos Falcon de 5 ml (Becton Dickinson).
- 5 3. Si se desea, se añaden anticuerpos en la cantidad requerida.
4. Se añaden perlas CytoCount™ a cada tubo usando pipeteo inverso en la cantidad requerida.
5. Se secan las mezclas a vacío a temperatura ambiente durante la noche y posteriormente se almacenan a 2-8°C protegidas de la luz hasta que se usen.

C. Lisis usando Easy-Lyse™

- 10 1. Se añaden 2 ml de Easy-Lyse™ a cada tubo.
2. Se agitan con vórtex los tubos rápidamente.
3. Se incuban los tubos en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.

D. Lisis usando Uti-Lyse™

1. Se añaden 100 µl de reactivo Uti-Lyse™ A a cada tubo.
- 15 2. Se agitan con vórtex los tubos rápidamente.
3. Se incuban los tubos en la oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente.
4. Se añade 1 ml de reactivo Uti-Lyse™ B a cada tubo.
5. Se agitan con vórtex los tubos rápidamente.
6. Se incuban los tubos en la oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente.

20 E. Lisis usando disolución de lisado FACS™

1. Se añaden 450 µl de disolución de lisado FACS™ a cada tubo.
2. Se agitan con vórtex los tubos rápidamente.
3. Se incuban los tubos en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.

Ejemplo 1A. Matriz de reactivos: Procedimiento mejorado para la preparación de la matriz

Preparación de las matrices

1. Se constituyen disoluciones al 20% (p/v) de los azúcares y se mezclan en una razón 1:1.
2. Se añaden 15 µl de la mezcla a tubos Falcon de 5 ml (Becton Dickinson).
3. Se añaden anticuerpos en la cantidad requerida.
- 5 4. Si se desea, se añade un antioxidante en la cantidad requerida.
5. Se añaden perlas CytoCount™ a cada tubo usando pipeteo inverso en la cantidad requerida.
6. Se secan las mezclas a vacío a 2-8°C durante la noche y posteriormente se almacenan a 2-8°C protegidas de la luz hasta que se usen.

Ejemplo 2. Recuento de CD4 con perlas de recuento incrustadas en la matriz

- 10 Este ejemplo describe el recuento de CD4 usando perlas de recuento incorporadas en una matriz de hidrato de carbono, en comparación con la adición de las perlas de recuento inmediatamente antes de analizar la muestra.

Procedimiento

Se preparan 20 matrices según el procedimiento B, ejemplo 1, y usando 100 µl de perlas CytoCount™.

Preparación de las muestras de matriz junto con los correspondientes controles

- 15 1. A cada uno de 40 tubos Falcon (20 de matriz y 20 controles) se le añaden 10 µl de CD3 FITC, 10 µl de CD4 RPE y 10 µl de CD45 RPE-Cy5.
2. A cada tubo se le añaden 100 µl de muestra de sangre completa.
3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se lisan la mitad de los tubos (10 de matriz y 10 controles) con Easy-Lyse™ según el procedimiento C, ejemplo 1; la otra mitad se lisan con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1, para eliminar eritrocitos.
- 20

Se analizan todas las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software Cellquest™ versión 3.3. Para los controles, se añaden 100 µl de perlas CytoCount™ inmediatamente antes del análisis. Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se obtiene el recuento de linfocitos CD4 por volumen de muestra unitario.

25 *Resultados*

Se muestran los resultados en la figura 1A-D.

La figura 1 muestra las propiedades fluorescentes y de dispersión de perlas CytoCount™ en la muestra control (A+B) y de matriz (C+D). Ambas muestras se lisan con Easy-Lyse™.

- 30 En los gráficos de dispersión (A+C) las perlas se sitúan en la esquina superior izquierda, mientras que los linfocitos son la población densa en la parte inferior de los gráficos. En la gráficos de fluorescencia (B+D) las perlas están en la esquina superior derecha y los linfocitos están en el medio en la parte inferior de los gráficos. Los gráficos son bastante similares para muestras control y de matriz excepto porque las perlas y los granulocitos se extienden ligeramente más en los gráficos de dispersión. En los gráficos de fluorescencia las perlas se sitúan de manera exactamente igual para la matriz y el control.

35 *Tabla 3. Recuento de CD4 / µl de muestra tal como se determina en el ejemplo 2*

Tipo de muestra	Control/Easy-Lyse™	Matriz/Easy-Lyse™	Control/Uti-Lyse™	Matriz/Uti-Lyse™
Media	1037	1069	1060	1113
Des. est.	28,4	25,4	28,5	18,7
C.V.	2,7	2,4	2,7	1,7

- 40 Los resultados muestran que la matriz no afecta a la fluorescencia de las perlas y que no hay formación de dobletes. Los recuentos para las muestras de matriz concuerdan con los recuentos obtenidos con los controles y los CV son muy bajos. Una alta coherencia y una baja variación son de la mayor importancia en el recuento absoluto para garantizar que una muestra dará el mismo recuento y por tanto el mismo diagnóstico independientemente de si se somete a prueba hoy o mañana. Sería posible ajustar los recuentos para dar una coincidencia incluso más estrecha con los controles.

Resumen

Pueden incorporarse perlas CytoCount™ en una matriz de hidrato de carbono sin ningún efecto sobre la fluorescencia; dando lugar a recuentos que concuerdan con los controles. Los obtenidos con las muestras de matriz son muy bajos.

5 Ejemplo 3. Recuento de CD3 con conjugados con anticuerpos y perlas de recuento incrustados en la matriz

Este ejemplo describe el uso de matrices que contienen 4 conjugados con anticuerpo diferentes junto con perlas de recuento.

Procedimiento

10 Se preparan 4 matrices según el procedimiento B en el ejemplo 1 con 100 µl de perlas CytoCount™ y 10 µl de CD3 FITC, CD3 RPE, CD3 RPE-Cy5 y CD3 APC respectivamente, es decir sólo un conjugado con anticuerpo por tubo de matriz.

Preparación de las muestras de matriz junto con los correspondientes controles

A 4 tubos Falcon nuevos se les añaden 10 µl de CD3 FITC, CD3 RPE, CD3 RPE-Cy5 y CD3 APC respectivamente. Estos son los controles.

- 15 1. A los 8 tubos (4 controles y 4 tubos de matriz) se les añaden 100 µl de muestra de sangre completa.
 2. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
 3. Se lisan las muestras con Easy-Lyse™ según el procedimiento C, ejemplo 1.

20 Para los controles, se añaden 100 µl de perlas CytoCount™ inmediatamente antes del análisis. Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan todas las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software Cellquest™ versión 3.3 para dar la intensidad de fluorescencia de las células positivas para CD3.

Resultados

Se muestran los resultados en las figuras 2A-H.

25 La figura 2 muestra los gráficos de fluorescencia frente a dispersión lateral de sangre completa teñida con 4 conjugados con CD3 diferentes en el control (figura 2A, figura 2C, figura 2E y figura 2G) en comparación con la matriz (figura 2B, figura 2D, figura 2F y figura 2H) incorporándose los conjugados en la matriz.

Las intensidades de fluorescencia son en todos los casos comparables, y no hay ningún problema con la separación de las poblaciones positivas para CD3 (población densa centrada en la parte inferior de los gráficos) de las poblaciones negativas.

30 *Tabla 4. Mediana de las intensidades de fluorescencia determinadas en el ejemplo 3*

Fluorocromo	Control	Matriz	% de control/matriz
FITC	228,8	205,4	89,8
RPE	264,2	143,3	54,2
RPE-Cy5	264,2	171,5	64,9
APC	283,9	237,1	83,5

Resumen

Los conjugados con anticuerpos que se incorporan en la matriz presentaban intensidades de fluorescencia que son comparables a los controles y permitían una separación fácil e inequívoca de la población positiva para CD3.

35 Ejemplo 3A. Recuento de CD4 con conjugados con anticuerpos y perlas de recuento incrustados en la matriz (mezclas de conjugados con anticuerpos de dos colores)

Este ejemplo describe el uso de 4 matrices que contienen 4 mezclas diferentes de conjugados con anticuerpos de dos colores junto con las perlas de recuento.

Procedimiento

Se preparan 4 mezclas de dos colores como mezclas 1:1 de los anticuerpos individuales:

40 *Tabla 5. Mezclas usadas en el ejemplo 3A*

Mezcla de anticuerpos	Conjugados con anticuerpos	
Dual 1	CD3-FITC	CD4-APC
Dual 2	CD3-APC	CD4-FITC
Dual 3	CD3-PB	CD4-RPE
Dual 4	CD3-PB	CD8-RPE

Se preparan 4 matrices según el procedimiento B en el ejemplo 1 con 50 µl de perlas CytoCount™ y 5 µl de Dual 1, Dual 2, Dual 3 y Dual 4 respectivamente.

Preparación de las muestras de matriz junto con los correspondientes controles

5 A 4 tubos Falcon nuevos se les añaden 5 µl de Dual 1, Dual 2, Dual 3 y Dual 4 respectivamente. Estos son los controles.

1. A los 8 tubos (4 controles y 4 tubos de matriz) se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa.
2. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
3. Se lisan las muestras con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.

10 Para los controles, se añaden 50 µl de perlas CytoCount™ inmediatamente antes del análisis. Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se adquieren todas las muestras y se analizan en un instrumento Cyan™ ADP con software Summit v4.2 para determinar el recuento de células CD3+CD4+ o CD3+CD8+. Se fija el umbral en CD3 excepto para Dual 2, en donde se fija en CD4, puesto que las perlas no son positivas en el canal de APC.

Resultados

15 Se muestran los resultados en las figuras 2I-P.

Las figuras 2I y 2J muestran los gráficos para control y matriz de Dual 1, respectivamente. Los gráficos son CD3-FITC frente a dispersión lateral, en donde los linfocitos T (el centro de la parte inferior del gráfico) y las perlas (lado superior derecho del gráfico) se separan, y el gráfico de CD3-FITC frente a CD4-APC que muestra sólo los linfocitos T, en donde los linfocitos T positivos para CD4 se separan.

20 Las figuras 2K y 2L muestran los gráficos para control y matriz de Dual 2, respectivamente. Los gráficos son CD3-APC frente a dispersión lateral, en donde los linfocitos T (el centro de la parte inferior del gráfico) se separan, el gráfico de CD3-APC frente a CD4-FITC que muestra sólo los linfocitos T, en donde los linfocitos T positivos para CD4 se separan y el violeta 1 frente a dispersión lateral, donde las perlas se separan.

25 Las figuras 2M y 2N muestran los gráficos para control y matriz de Dual 3, respectivamente. Los gráficos son CD3-PB frente a dispersión lateral, en donde los linfocitos T (el centro de la parte inferior del gráfico) y las perlas (lado superior derecho del gráfico) se separan y el gráfico de CD3-PB frente a CD4-PE que muestra sólo los linfocitos T, en donde los linfocitos T positivos para CD4 se separan.

30 Las figuras 2O y 2P muestran los gráficos para control y matriz de Dual 4, respectivamente. Los gráficos son CD3-PB frente a dispersión lateral, en donde los linfocitos T (el centro de la parte inferior del gráfico) y las perlas (lado superior derecho del gráfico) se separan y el gráfico de CD3-PB frente a CD8-PE que muestra sólo los linfocitos T, en donde los linfocitos T positivos para CD8 se separan.

Las intensidades de fluorescencia son en todos los casos comparables, y no hay ningún problema con la separación de las poblaciones positivas para CD3 (población densa centrada en la parte inferior de los gráficos) de las poblaciones negativas o la separación de los linfocitos positivos para CD4 de los negativos.

35 *Tabla 6. Mediana de las intensidades de fluorescencia determinadas en el ejemplo 3A*

Mezcla de dos colores	Conjugado con anticuerpo	Control	Matriz	% de control/matriz
Dual 1	CD3-FITC	339,8	305,1	89,8
	CD4-APC	212,9	205,4	96,5
Dual 2	CD3-APC	604,3	437,1	72,3
	CD4-FITC	154,0	148,6	96,5
Dual 3	CD3-PB	273,8	254,8	93,1
	CD4-RPE	805,8	582,9	72,3
Dual 4	CD3-PB	273,8	237,1	86,6
	CD8-RPE	2838,7	2371,4	83,5

Resumen

Los conjugados con anticuerpos que se incorporan en la matriz presentaban intensidades de fluorescencia que eran comparables a los controles y permitían una separación fácil e inequívoca de las poblaciones de CD3+CD4+ o CD3+CD8+.

Ejemplo 4. Estabilidad en almacenamiento de conjugados con anticuerpos incrustados en la matriz

5 Este ejemplo describe la estabilidad en almacenamiento de conjugados con anticuerpos en la matriz.

Procedimiento

10 Se preparan 36 matrices según el procedimiento B en el ejemplo 1 con 100 µl de perlas CytoCount™ y 10 µl de CD3 FITC, CD3 RPE, CD3 RPE-Cy5 y CD3 APC en 9 tubos cada uno, es decir sólo un conjugado con anticuerpo por tubo de matriz y 9 tubos con cada conjugado con anticuerpo. Se almacenan 16 tubos (4 con cada conjugado con anticuerpo) a 2-8°C y se almacenan 16 a 20°C. Los últimos 4 se analizan inmediatamente después del secado. Se analizan 8 tubos tras 13, 28, 47 y 81 días, dos con cada conjugado con anticuerpo, uno almacenado a 2-8°C y uno almacenado a 20°C.

Preparación de las muestras de matriz junto con los correspondientes controles

15 1. A 4 tubos Falcon nuevos se les añaden 10 µl de CD3 FITC, CD3 RPE, CD3 RPE-Cy5 y CD3 APC respectivamente. Estos son los controles.

2. A los 12 tubos (4 controles y 8 tubos de matriz) se les añaden 100 µl de muestra de sangre completa.

3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.

4. Se lisan las muestras con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.

20 Para los controles, se añaden 100 µl de perlas CytoCount™ inmediatamente antes del análisis. Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan todas las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software Cellquest™ versión 3.3.

Resultados

Se muestran los resultados en las figuras 3A, 3B, 3C y 3D.

25 Las figuras 3A-D muestran el cambio en la intensidad de fluorescencia en tanto por ciento de los controles de 4 conjugados con anticuerpos diferentes almacenados en una matriz durante hasta 81 días. Las formas de rombo representan almacenamiento a 2-8°C, mientras que los cuadrados representan almacenamiento a 20°C.

30 La estabilidad de los conjugados con anticuerpos en la matriz es similar a la estabilidad de los conjugados en disolución acuosa. La separación no se ve afectada por el almacenamiento a 2-8°C en la oscuridad, que son las condiciones de almacenamiento recomendadas normalmente para conjugados con anticuerpos. Ésta es una propiedad importante considerando el uso práctico del reactivo listo para usar.

Resumen

Todos los conjugados muestran una estabilidad suficiente cuando se almacenan a 2-8°C.

Ejemplo 4A. Estabilidad en almacenamiento de conjugados con anticuerpos incrustados en la matriz (mezclas de dos colores)

35 Este ejemplo describe la estabilidad en almacenamiento de conjugados con anticuerpos en la matriz.

Procedimiento

Se preparan 4 mezclas de dos colores tal como se describió en el ejemplo 3A.

40 Se preparan 16 matrices según el procedimiento B en el ejemplo 1 con 50 µl de perlas CytoCount™ y 5 µl de Dual 1, Dual 2, Dual 3 y Dual 4 en 6 tubos cada uno, es decir sólo una mezcla de anticuerpos por tubo de matriz y 4 tubos con cada mezcla de anticuerpos. El resto de las mezclas de anticuerpos se almacenan a 2-8°C junto con los tubos de matriz. Tras secar se almacenan 12 tubos a 2-8°C. Los últimos 4, uno con cada mezcla, se analizan inmediatamente después del secado. El resto se analizan tras 76, 172, 288 días, 4 a la vez, uno con cada mezcla de anticuerpos.

45 Con las mismas mezclas de anticuerpos de dos colores, se preparan otras 8 matrices según el procedimiento en el ejemplo 2 con 50 µl de perlas CytoCount™ y 5 µl de Dual 1, Dual 2, Dual 3 y Dual 4 en 2 tubos cada uno. Se prepara una disolución saturada de hidroxitolueno butilado (BHT) y se añaden 100 µl a cada tubo. Inmediatamente después del secado se analizan los primeros 4 tubos (uno con mezcla de anticuerpos). Los otros 4 se almacenan durante 132

días a 2-8°C y entonces se analizan.

Preparación de las muestras de matriz junto con los correspondientes controles para cada análisis

1. A 4 tubos Falcon nuevos se les añaden 5 µl de Dual 1, Dual 2, Dual 3 y Dual 4 respectivamente de las mezclas usadas para preparar los tubos de matriz que van a someterse a prueba. Estos son los controles.

- 5 2. A los 8 tubos (4 controles y 8 tubos de matriz) se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa.
3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se lisan las muestras con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.

10 Para los controles, se añaden 50 µl de perlas CytoCount™ inmediatamente antes del análisis. Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan todas las muestras en un instrumento Cyan™ ADP con software Summit v4.2 para determinar el recuento de células CD3+CD4+ o CD3+CD8+. Se fija el umbral en CD3 excepto para Dual 2, en donde se fija en CD4, puesto que las perlas no son positivas en el canal de APC. Se determina la mediana de la intensidad de fluorescencia para cada conjugado con anticuerpo y se compara con el control.

Resultados

15 Se muestran los resultados en la figura 3E, figura 3F, figura 3G y figura 3H.

Las figuras 3E-H muestran el cambio en las intensidades de fluorescencia de todos los conjugados con anticuerpos en tanto por ciento de los controles almacenados durante la misma duración de tiempo en las mismas condiciones.

20 La estabilidad de los conjugados con anticuerpos en la matriz se reduce en comparación con la estabilidad de los conjugados en disolución acuosa. Sin embargo, todavía es posible una separación inequívoca en todas las muestras. La adición de un antioxidante a la matriz mejora significativamente la estabilidad de los conjugados con anticuerpos en la matriz hasta el punto que es comparable a la estabilidad en disolución. Ésta es una propiedad importante considerando el uso práctico del reactivo listo para usar.

Resumen

25 Todos los conjugados muestran una estabilidad suficiente en una matriz que contiene un antioxidante cuando se almacenan a 2-8°C.

Ejemplo 5. Reactivo de matriz de 4 colores

Este ejemplo describe la combinación de cuatro anticuerpos en la matriz y la estabilidad de esta matriz de reactivos a diferentes temperaturas.

Procedimiento

30 Se preparan 16 matrices según el procedimiento B en el ejemplo 1, usando una mezcla de 4 colores que incorpora CD3 RPE-A680, CD4 FITC, CD8 RPE y CD45 APC en una razón 1:1:1:1. Se preparan 8 matrices con 100 µl de perlas CytoCount™ y 8 con tanto perlas como 20 µl de la mezcla de 4 colores.

Preparación de las muestras de matriz

Día 0: Se analizan 4 matrices (2 de cada una).

- 35 1. Se añaden 20 µl de la mezcla de 4 colores a las matrices que contienen sólo perlas.
2. A los 4 tubos se les añaden 100 µl de muestra de sangre completa.
3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.

Se lisan las muestras con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.

40 Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan todas las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software Cellquest™ versión 3.3 y se halla la mediana de la intensidad de fluorescencia de los linfocitos.

Se congelan las matrices restantes (-18°C) durante 24 h y se descongelan durante 2 h a 2-8°C. Se repite este ciclo de congelación-descongelación 3 veces.

Día 3: Se analizan 4 matrices tal como se describió anteriormente.

Se almacenan las matrices restantes a 37°C durante 24 h en la oscuridad.

Día 4: Se analizan 4 matrices tal como se describió anteriormente.

Se almacenan las matrices restantes a 20°C durante 4 días en la oscuridad.

Día 8: Se analizan las 4 matrices finales tal como se describió anteriormente.

5 *Resultados*

Se muestran los resultados en la figura 4.

La figura 4 muestra la intensidad de fluorescencia antes (día 0) y después de la congelación y el calentamiento (día 8) para CD3 RPE-A680 y CD4 FITC; comparando en negro: la matriz que contiene perlas (se añade la mezcla de 4 colores cuando se prepara la muestra) con en gris: la matriz que contiene perlas y mezcla de 4 colores.

10 La siguiente tabla (tabla 7) muestra la mediana de las intensidades de fluorescencia expresada en tanto por ciento del control de los linfocitos según resulta influida por la congelación y el calentamiento (para el control de la intensidad de fluorescencia se usan los tubos de matriz con perlas sólo, en donde la mezcla de 4 colores se añade cuando se prepara la muestra).

15 Tabla 7. Mediana de las intensidades de fluorescencia, como porcentajes de los controles, determinada en el ejemplo 5.

	CD3 RPE-A680	CD4 FITC	CD8 RPE	CD45 APC
Día 0	59	89	64	75
Día 3 (tras la congelación)	65	95	48	104
Día 4 (tras 37°C)	27	87	20	90
Día 8 (tras 20°C)	14	79	18	63

20 La estabilidad de los conjugados con anticuerpos en la matriz es comparable con la estabilidad de los conjugados en disolución acuosa. La estabilidad frente a alguna variación en temperatura es esencial para los conjugados con anticuerpos en disolución acuosa, puesto que se expondrán a calentamiento y enfriamiento cada vez que se use el reactivo. Esta exigencia no es tan relevante para el tipo de reactivo listo para usar descrito en las reivindicaciones, puesto que pueden sacarse del almacenamiento uno a la vez y usarse inmediatamente. Sin embargo, puesto que el reactivo puede exponerse a algunas variaciones de temperatura durante el envío, la estabilidad observada es una gran ventaja.

Resumen

25 Los conjugados con anticuerpos investigados presentan una estabilidad bajo temperaturas variables que es comparable a su estabilidad en disolución acuosa.

Ejemplo 6. Recuento de CD4 en muestras de matriz de 3 colores lisadas y no lisadas en comparación con TruCOUNT™/reactivo de 4 colores Multitest™

30 Este ejemplo compara los recuentos de CD4 y los porcentajes de 18 muestras de sangre completa diferentes a partir de muestras de matriz lisadas y no lisadas usando una mezcla de 3 colores con los recuentos de CD4 obtenidos usando tubos TruCOUNT™ y un reactivo de 4 colores MultiTEST™.

Procedimiento

Se preparan 72 matrices según el procedimiento B en el ejemplo 1, usando 15 µl de una mezcla de 3 colores que incorpora CD3 RPE, CD4 APC y CD45 FITC en una razón 1:1:1 y 50 µl de perlas CytoCount™.

Para cada una de 18 muestras de sangre completa, se preparan 4 muestras de matriz:

- 35
1. A los 4 tubos se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa.
 2. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
 3. Se lisan 2 muestras con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.
 4. Las otras 2 muestras no se lisan, sino que simplemente se diluyen con 0,5 ml de PBS.

Además se prepara una muestra de TruCOUNT™:

- 40
1. Al tubo TruCOUNT™ se le añaden 10 µl de reactivo de 4 colores MultiTEST™.

2. Al tubo se le añaden 50 µl de muestra de sangre completa.
3. Se agita con vórtex la muestra y se incuba en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se lisa la muestra con disolución de lisado FACS™ según el procedimiento E, ejemplo 1.

5 Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan todas las muestras en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software Cellquest™ versión 3.3 o MultiSET™ y en un citómetro de flujo Cyan™ ADP con software Summit versión 4.1. Se obtiene el recuento de CD4 así como el porcentaje de células positivas para CD4 con respecto a las células positivas para CD3.

Resultados

10 Se muestran los resultados en la figura 5A, figura 5B, figura 5C, figura 5D, figura 5E, figura 5F, figura 5G, figura 5H y figura 6.

15 Las figuras 5A-D muestran gráficos de Bland Altman del recuento de CD4 obtenido con TruCOUNT™/MultiTEST™ en comparación con muestras de matriz lisadas y no lisadas analizadas tanto en FACSCalibur™ como en Cyan™ ADP. Se calcula la similitud en tanto por ciento como el promedio de los recuentos de CD4 a partir de TruCOUNT y matriz entre el recuento de CD4 de TruCOUNT™. Las figuras 5E-H muestran los gráficos de Bland Altman del recuento de CD4 obtenido cuando se reanalizan los datos. Los gráficos muestran que los tubos de matriz proporcionan generalmente recuentos que concuerdan con los recuentos obtenidos con los tubos TruCOUNT™. Los CV son en todos los casos bajos.

20 La figura 6 muestra los gráficos de Bland Altman de los porcentajes de CD4 (con respecto a las células positivas para CD3) para muestras de matriz lisadas y no lisadas en comparación con TruCOUNT™/MultiTEST™, analizadas tanto en FACSCalibur™ como en Cyan™ ADP. Se calcula la similitud en tanto por ciento como en las figuras 5A-H anteriormente. Los gráficos muestran que los porcentajes de CD4 obtenidos son los mismos, y los CV son muy bajos.

Tabla 8. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para las similitudes en tanto por ciento entre los tubos de matriz y TruCOUNT determinados en el ejemplo 6.

	Recuentos de CD4			Porcentajes de CD4		
	Promedio	Des. est.	CV	Promedio	Des. est.	CV
Matriz lisada / Calibur	96,0	5,0	5,3	99,9	0,8	0,8
Matriz lisada / Cyan	93,3	5,5	5,9	100,1	1,3	1,3
Matriz no lisada / Calibur	95,1	3,9	4,1	99,5	1,2	1,2
Matriz no lisada / Cyan	90,6	4,9	5,4	99,6	1,3	1,3

25 Se observaron algunas pequeñas faltas de coherencia durante el análisis de los datos. Por tanto, se reanalizaron posteriormente los recuentos de CD4 con una nueva versión del software Summit (versión 4.2) y con separación optimizada. Esto proporcionó los resultados observados a continuación.

Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación reanalizados para las similitudes en tanto por ciento entre tubos de matriz y TruCOUNT determinados en el ejemplo 6.

	Recuentos de CD4		
	Promedio	Des. est.	CV
Matriz lisada / Calibur	102,1	2,9	2,8
Matriz lisada / Cyan	99,3	3,3	3,3
Matriz no lisada / Calibur	96,0	3,1	3,2
Matriz no lisada / Cyan	91,5	4,6	5,1

30 Los recuentos para las muestras de matriz concuerdan con los recuentos obtenidos con los tubos TruCOUNT™ y los CV son bajos. Una alta coherencia y una baja variación son de la mayor importancia en el recuento absoluto para garantizar que una muestra proporcionará el mismo recuento y por tanto el mismo diagnóstico si se somete a prueba hoy o mañana. Sería posible ajustar los recuentos para proporcionar una coincidencia incluso más estrecha con los recuentos obtenidos con los tubos TruCOUNT™.

35 *Resumen*

Los recuentos de tubos de matriz concuerdan con los recuentos obtenidos con los tubos TruCOUNT™, y los CV son bajos. Los dos métodos proporcionaron los mismos porcentajes de CD4 con CV muy bajos.

Ejemplo 7. Recuento de CD4 en muestras de matriz de 2 colores lisadas y no lisadas en comparación con

TruCOUNT™/reactivo de 4 colores MultiTEST™

5 Este ejemplo compara los recuentos de CD4 de 6 muestras de sangre completa diferentes de muestras de matriz tanto lisadas como no lisadas usando una mezcla de 2 colores con los recuentos de CD4 obtenidos usando tubos TruCOUNT™ y reactivo de 4 colores MultiTEST™ y una mezcla de anticuerpos de 6 colores con perlas CytoCount añadidas inmediatamente antes del análisis.

Procedimiento

Se preparan 36 matrices según el procedimiento en el ejemplo 1B, usando 5 µl de una mezcla de dos colores que incorpora CD3-FITC y CD4-RPE en una razón 1:1 y 50 µl de perlas CytoCount™. Se prepara una mezcla de 6 colores con CD3-PB, CD4-FITC, CD8-APC, CD19-RPECy5, CD45-CY y CD56-RPE.

10 Para cada una de 6 muestras de sangre completa, se preparan 6 muestras de matriz junto con 6 muestras de CytoCount:

1. A cada una de las muestras de CytoCount se le añaden 3 µl de la mezcla de 6 colores.
2. A todas las muestras de matriz se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa. A las muestras de CytoCount se les añaden 30 µl de muestra de sangre completa.
- 15 3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se lisan 3 muestras de cada clase con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.
5. Las otras 3 muestras de cada clase no se lisan, sino que se diluyen simplemente con 0,5 ml de PBS.

Además se preparan dos muestras de TruCOUNT™:

1. A los tubos TruCOUNT™ se les añaden 10 µl de reactivo de 4 colores MultiTEST™.
- 20 2. A los tubos se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa.
3. Se agita con vórtex la muestra y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se lisa la muestra con disolución de lisis FACS™ según el procedimiento E, ejemplo 1.

25 Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan las muestras de matriz y CytoCount en un citómetro de flujo Cyan™ ADP con software Summit versión 4.2 y se analizan las muestras de MultiSET en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software MultiSET™. Se obtiene el recuento absoluto de linfocitos T positivos para CD4.

Resultados

En la figura 7 se muestra un ejemplo de los gráficos usados para calcular el recuento de CD4 en las muestras de matriz. En la figura 8 se muestran los recuentos de CD4.

30 La figura 7 muestra un gráfico de puntos de CD3-FITC frente a CD4-RPE, y CD3-FITC frente a violeta 1. Las perlas se separan en R1 y las células positivas para CD4 en R2. Se define el recuento de células como acontecimientos en R2 que no están en R1. La figura 8 muestra la comparación de los recuentos de CD4 de los 6 donantes.

Resumen

35 Con este método se halla también que los recuentos de tubos de matriz concuerdan con los recuentos obtenidos con los tubos TruCOUNT™, de hecho los recuentos absolutos de los tubos de matriz están más próximos a los resultados de TruCOUNT que los resultados obtenidos con las perlas CytoCount usadas de modo convencional.

Ejemplo 8. Recuento de CD4 en muestras de matriz de 6 colores no lisadas en comparación con TruCOUNT™/reactivo de 4 colores MultiTEST™

40 Este ejemplo compara los recuentos de CD4 de 5 muestras de sangre completa diferentes de muestras de matriz no lisadas usando una mezcla de 6 colores con los recuentos de CD4 obtenidos usando tubos TruCOUNT™ y reactivo de 4 colores MultiTEST™ y una mezcla de anticuerpos de 6 colores con perlas CytoCount añadidas inmediatamente antes del análisis.

Procedimiento

45 Se preparara una mezcla de 6 colores con CD3-PB, CD4-FITC, CD8-APC, CD19-RPECy5, CD45-CY y CD56-RPE. Se preparan 10 matrices según el procedimiento en el ejemplo 1B, usando 3 µl de la mezcla de 6 colores y 30 µl de

perlas Cyto-Count™.

Para cada una de 5 muestras de sangre completa, se preparan 6 muestras de matriz junto con 15 muestras de CytoCount:

1. A cada una de las muestras de CytoCount se les añaden 3 µl de la mezcla de 6 colores.
- 5 2. A todas las muestras se les añaden 30 µl de muestra de sangre completa.
3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Se lisan 3 muestras de CytoCount con Uti-Lyse™ según el procedimiento D, ejemplo 1.
5. Las otras 3 muestras de CytoCount junto con las muestras de matriz no se lisan, sino que simplemente se diluyen con 0,5 ml de PBS.
- 10 Además se preparan dos muestras de TruCOUNT™:
 1. A los tubos TruCOUNT™ se les añaden 10 µl de reactivo de 4 colores MultiTEST™.
 2. A los tubos se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa.
 3. Se agita con vórtex la muestra y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
 4. Se lisa la muestra con disolución de lisis FACS™ según el procedimiento E, ejemplo 1.
- 15 Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan las muestras de matriz y CytoCount en un citómetro de flujo Cyan™ ADP con software Summit versión 4.2 y se analizan las muestras de MultiSET en un citómetro de flujo FACSCalibur™ con software MultiSET™. Se obtiene el recuento absoluto de linfocitos T positivos para CD4.

Resultados

- 20 La figura 9 es un ejemplo de los gráficos usados para calcular el recuento de CD4 en las muestras de matriz. Se fija el umbral en CD45-CY. Los linfocitos T se separan en CD19-RPECy5 frente a CD3-PB y se dividen en subpoblaciones en CD8-APC frente a CD4-FITC. Las células B se separan en CD19-RPECy5 frente a CD4-FITC y las células NK se separan en CD56-RPE frente a CD3-PB. Finalmente se separan las perlas en CD56-RPE frente a CD4-FITC. Figura 10, comparación de los recuentos de CD4 obtenidos con matriz, CytoCount y TruCOUNT.

25 *Resumen*

Este método tiene la ventaja de que además del recuento de CD4 es posible obtener información referente al estado del paciente. Los recuentos concuerdan con los resultados obtenidos con TruCOUNT.

Ejemplo 9. Recuento de CD34 en muestras de matriz de 2 colores no lisadas en sangre completa estabilizada.

- 30 Este ejemplo compara el recuento de CD34 de dos muestras de sangre completa estabilizada de UK-NEQAS obtenidas con muestras de matriz de 2 colores no lisadas y muestras control no lisadas usando perlas CytoCount.

Procedimiento

Se prepara una mezcla de 2 colores con CD34-RPE y CD45-FITC. Se preparan 2 matrices según el procedimiento en el ejemplo 1B, usando 5 µl de la mezcla de 2 colores y 50 µl de perlas CytoCount™.

- 35 Para cada muestra de sangre completa estabilizada, se prepara una muestra de matriz junto con una muestra de CytoCount:

1. A las muestras de CytoCount se les añaden 5 µl de la mezcla de 2 colores.
2. A todas las muestras se les añaden 50 µl de muestra de sangre completa estabilizada.
3. Se agitan con vórtex las muestras y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.
4. Las muestras no se lisan, sino que simplemente se diluyen con 0,5 ml de PBS.

- 40 Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan las muestras en un citómetro de flujo Cyan™ ADP con software Summit versión 4.2. Se obtiene el recuento absoluto de células positivas para CD34 usando la estrategia de separación ISHAGE.

Resultados

Figura 11, comparación de los gráficos obtenidos con muestras de matriz y control. Todas las células excepto los eritrocitos se seleccionan en el gráfico de SSC frente a CD45-FITC. Esta compuerta se fija en el gráfico de SSC frente a CD34-RPE, en donde se separan las células positivas para CD34. En el gráfico de SSC frente a CD45-FITC a continuación, se selecciona la agrupación de células y en el gráfico de SSC frente a FSC se verifica que las células están en la misma área que los linfocitos. Figura 11A, control, figura 11B, matriz.

Tabla 10. Comparación de los recuentos de CD34 determinados en el ejemplo 9

Muestra	Recuento control	Recuento de matriz	Recuento de NEQAS
0502 #94	62,2	62,8	61,09
0504 #98	14,2	12,5	13,05

Resumen

Las muestras de matriz proporcionan gráficos que no pueden distinguirse de los controles y los recuentos obtenidos están muy próximos a los recuentos determinados por UK-NEQAS.

10 Ejemplo 10. Tinción de una diana intercelular usando tubos de matriz

Este ejemplo verifica que es posible teñir marcadores intercelulares usando la tecnología de matriz.

Procedimiento

Se prepara 1 matriz según el procedimiento en el ejemplo 1B, usando 3 μ l de anticuerpo anti-mieloperoxidasa (MPO) y 1 usando 3 μ l de un anticuerpo control negativo.

15 Se preparan dos muestras de sangre completa con IntraStain:

1. Se añaden 100 μ l de sangre completa a cada uno de dos tubos.

2. A ambas muestras se les añaden 200 μ l de reactivo IntraStain A. Se agitan con vórtex los tubos y se incuban a temperatura ambiente durante 15 min.

20 3. Se añaden 2 ml de PBS a cada tubo. Se centrifugan los tubos y se aspira el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μ l de fluido.

4. A cada tubo se le añaden 200 μ l de reactivo IntraStain B.

5. De estos tubos se pipetea 100 μ l de suspensión de células a los tubos de matriz y a dos tubos control que contienen 3 μ l de anticuerpo anti-MPO y el anticuerpo control negativo, respectivamente.

6. Se agitan con vórtex todos los tubos y se incuban en la oscuridad durante 15 min a temperatura ambiente.

25 7. Se añaden 2 ml de PBS a cada tubo. Se centrifugan los tubos y se aspira el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μ l de fluido.

8. Se resuspenden las células en 0,4 ml de PBS.

Se agitan con vórtex todas las muestras durante 5 segundos inmediatamente antes del análisis. Se analizan las muestras en un citómetro de flujo Cyan™ ADP con software Summit versión 4.2.

30 *Resultados*

Figura 12, comparación de los gráficos obtenidos con anticuerpo anti-mieloperoxidasa en disolución e incrustado en una matriz. El primer gráfico presenta FSC frente a SSC y el segundo muestra anti-MPO-APC frente a SSC, en donde los granulocitos positivos pueden separarse. Figura 12A, control, figura 12B, matriz.

Resumen

35 La muestras de matriz proporcionan gráficos que son muy similares a los controles y los controles negativos no muestran unión inespecífica en las muestra o bien de matriz o bien control.

Diversas modificaciones y variaciones de los métodos de la invención descritos resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología molecular o campos relacionados estén dentro del alcance de las reivindicaciones.

40

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar los recuentos absolutos de células por volumen unitario de una muestra, comprendiendo el método:
 - (a) proporcionar un recipiente que contiene:
 - 5 (i) una cantidad predeterminada de micropartículas; y
 - (ii) un agente de unión a células;

en el que las micropartículas están dispuestas en o sobre una matriz que se adhiere a al menos una pared del recipiente de manera que sustancialmente todas las micropartículas se unen de ese modo al recipiente;
 - 10 (b) añadir un volumen conocido de muestra al recipiente;
 - (c) determinar la razón de micropartículas con respecto a células contando las micropartículas y células en un volumen de la muestra; y
 - (d) determinar el recuento absoluto de células multiplicando el número de células por micropartícula por la concentración de micropartículas en la muestra.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la matriz retiene sustancialmente todas las micropartículas en o sobre el recipiente durante la manipulación de rutina del recipiente.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que las micropartículas se retienen cuando el recipiente se invierte.
4. Método según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que las micropartículas se retienen en ausencia de otros medios de retención, preferiblemente mecánicos.
- 20 5. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que las micropartículas se retienen en ausencia de una rejilla de retención en el recipiente.
6. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz comprende un hidrato de carbono, preferiblemente un azúcar o una mezcla de azúcares, un polímero o una proteína.
- 25 7. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz comprende una mezcla 1:2, 1:1 ó 2:1 de dos cualesquiera de fructosa, trehalosa y rafinosa.
8. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz está presente en una cantidad de menos de 5 mg, preferiblemente 3 mg o menos.
9. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz comprende un antioxidante, preferiblemente hidroxitolueno butilado (BHT).
- 30 10. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que sustancialmente todas las micropartículas se liberan de la pared del recipiente en el volumen de la muestra al añadir la muestra.
11. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que sustancialmente todas las micropartículas están diferenciadas cuando se cuentan, preferiblemente en el que las micropartículas no forman sustancialmente dobles o múltiples cuando se cuentan.
- 35 12. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que las células y las micropartículas se cuentan en un citómetro de flujo.
13. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que las células comprenden microorganismos, preferiblemente levaduras o bacterias.
- 40 14. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que las células comprenden linfocitos y/o la muestra comprende sangre completa no lisada.
15. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el agente de unión a células comprende un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, que puede unirse a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20, CD22, CD33, CD34, CD38, CD45, CD56, CD57, CD64, CDw65, CD117 y CD133.
- 45 16. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que la matriz y las micropartículas se depositan sobre una pared del recipiente a través de la eliminación al menos parcial del disolvente de una suspensión de

- micropartículas en una solución acuosa de matriz, preferiblemente mediante evaporación del disolvente.
17. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que las micropartículas comprenden perlas de poliestireno, látex, agarosa o acrilamida, preferiblemente perlas de poliestireno.
 - 5 18. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que las micropartículas y el agente de unión a células pueden detectarse independientemente en virtud de que comprenden un medio de generación de señales, preferiblemente un medio de generación de señales fluorescentes.
 - 10 19. Método según la reivindicación inmediatamente anterior, en el que el medio de generación de señales fluorescentes comprende un fluorocromo seleccionado del grupo que consiste en: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), PE-Cy5, PE-CY5.5, PE-Cy7, PE-A680, PE-TR (rojo Texas), alofocianina (APC), APC-CY7, azul Pacífico, amarillo cascada, colorantes Alexa, cumarinas y puntos Q.
 20. Método según la reivindicación inmediatamente anterior, en el que las micropartículas y el agente de unión a células se marcan con fluorocromos diferentes.
 21. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el recipiente comprende más de un agente de unión a células.
 - 15 22. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el recipiente comprende un anticuerpo anti-CD3 acoplado a ficoeritrina, un anticuerpo anti-CD4 acoplado a APC y un anticuerpo anti-CD45 acoplado a FITC.
 23. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el recipiente comprende un anticuerpo anti-CD34 acoplado a ficoeritrina, un anticuerpo anti-CD45 acoplado a FITC o APC.
 - 20 24. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el recipiente comprende yoduro de propidio y Tween.
 25. Método según cualquier reivindicación anterior, en el que el recipiente es desechable.
 26. Método que comprende determinar un primer recuento absoluto de un tipo celular en un primer punto de tiempo mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, y determinar un segundo recuento del tipo celular en un segundo punto de tiempo.
 - 25 27. Método según la reivindicación 26, en el que el segundo recuento es un recuento absoluto del tipo celular en el segundo punto de tiempo determinado mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
 28. Método según la reivindicación 26 ó 27, en el que las muestras son del mismo individuo, preferiblemente del mismo órgano o tejido de un individuo.
 - 30 29. Método que comprende determinar un primer recuento absoluto de un primer tipo celular mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, y determinar un segundo recuento de un segundo tipo celular.
 30. Método según la reivindicación 29, en el que el segundo recuento es un recuento absoluto del segundo tipo celular determinado mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
 - 35 31. Método según la reivindicación 29 ó 30, en el que las muestras son del mismo individuo, preferiblemente del mismo órgano o tejido dentro de un individuo.
 32. Método según la reivindicación 29 ó 30, en el que las muestras son de individuos diferentes dentro de una población o cohorte.
 - 40 33. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en el que los recuentos primero y segundo se comparan para proporcionar información sobre el estado de la o cada muestra, o el estado del o cada tejido, órgano, organismo, cohorte o población del que se deriva la muestra.
 34. Método según la reivindicación 33, en el que el estado se selecciona del grupo que consiste en: estado de salud, estado nutricional, estado mental, propensión a enfermedad, presencia o ausencia de enfermedad, presencia o ausencia de infección latente, preferiblemente infección por VIH.
 - 45 35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 34, en el que el o el primer tipo celular comprende linfocitos CD4+, opcionalmente en el que el segundo tipo celular comprende linfocitos totales, preferiblemente de la misma muestra.
 36. Método según la reivindicación 34 ó 35, en el que la infección comprende infección por VIH y/o la enfermedad comprende SIDA.

FIGURA 1A

Control

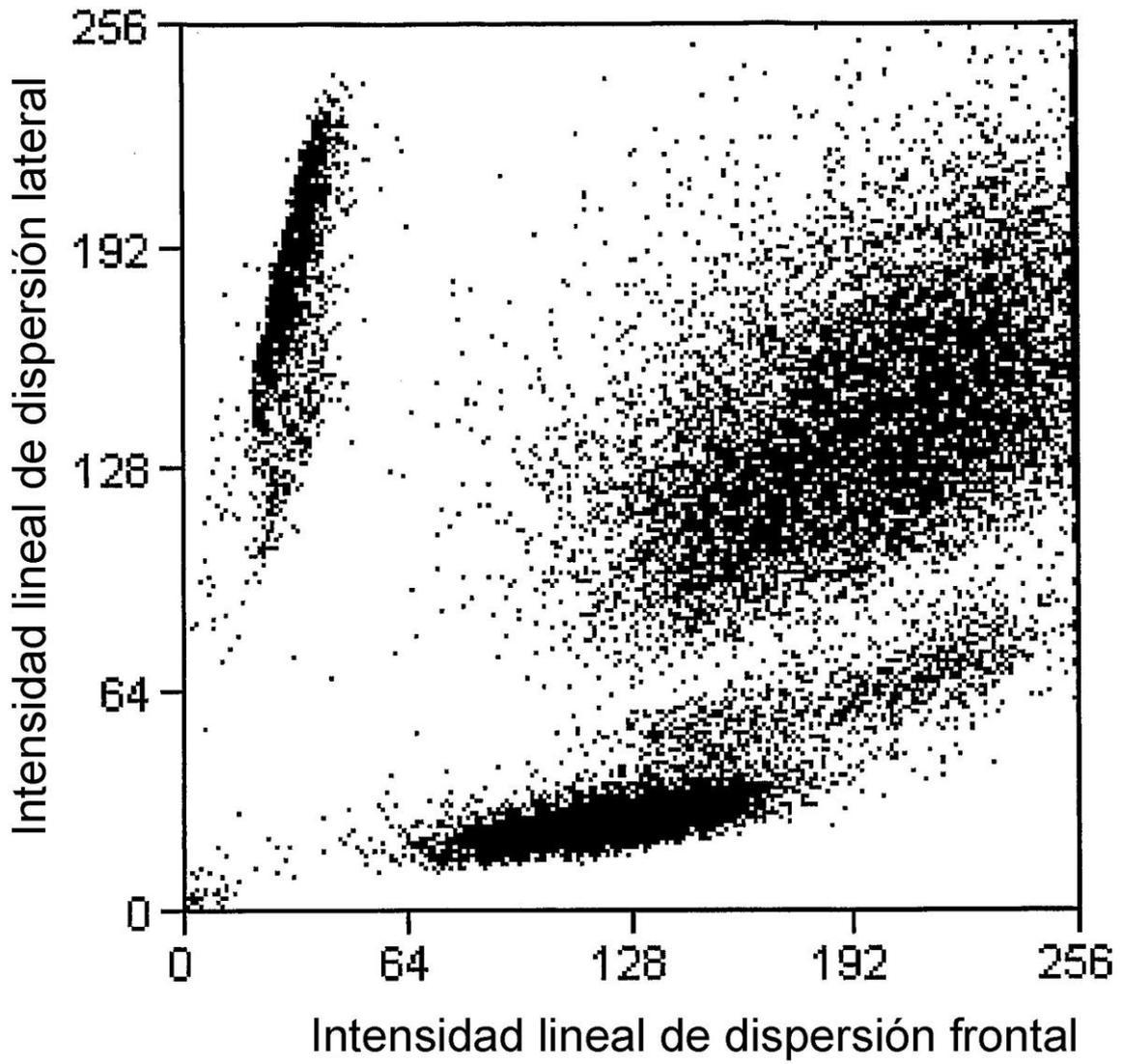


FIGURA 1B

Control

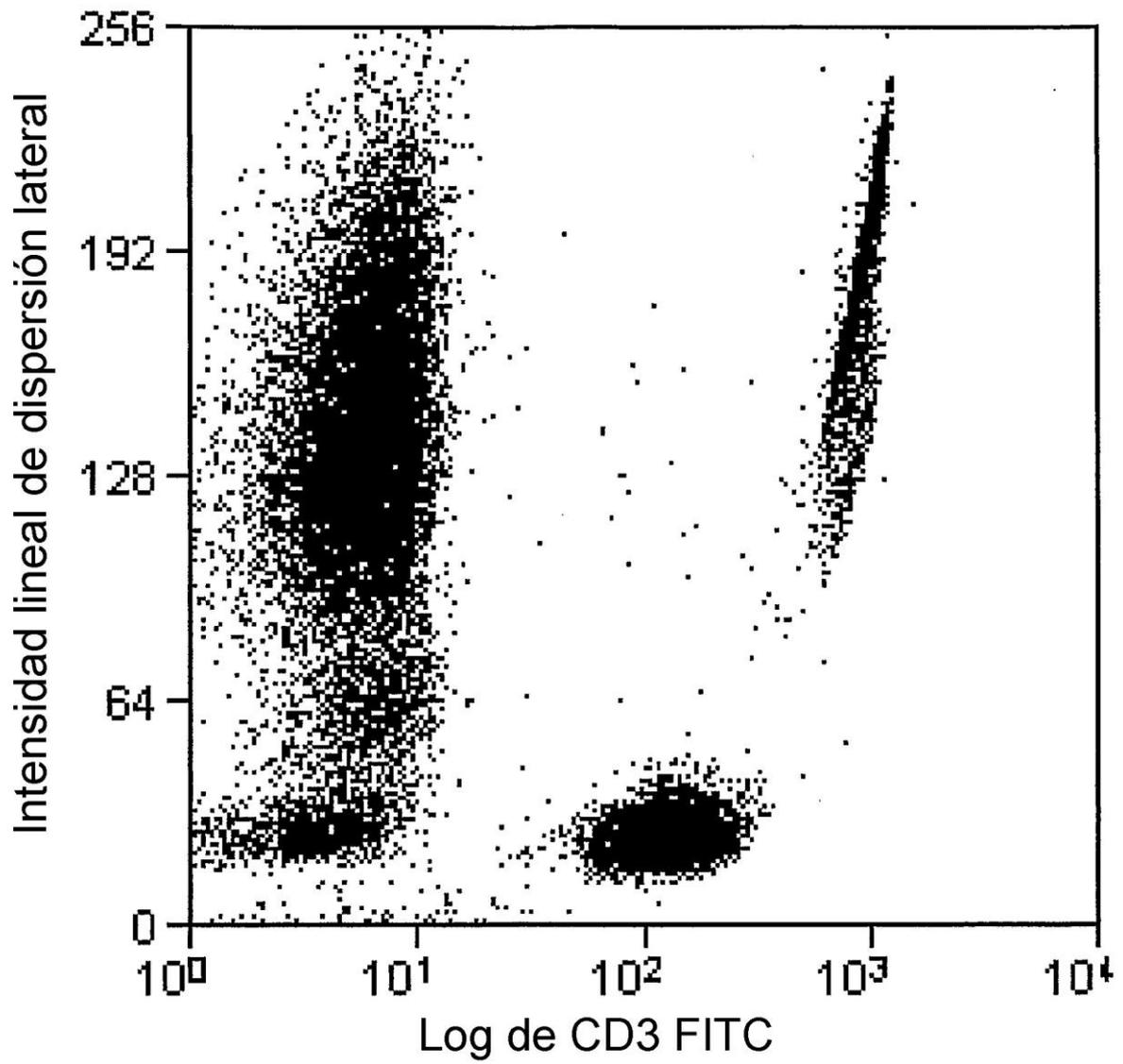


FIGURA 1C

Matriz

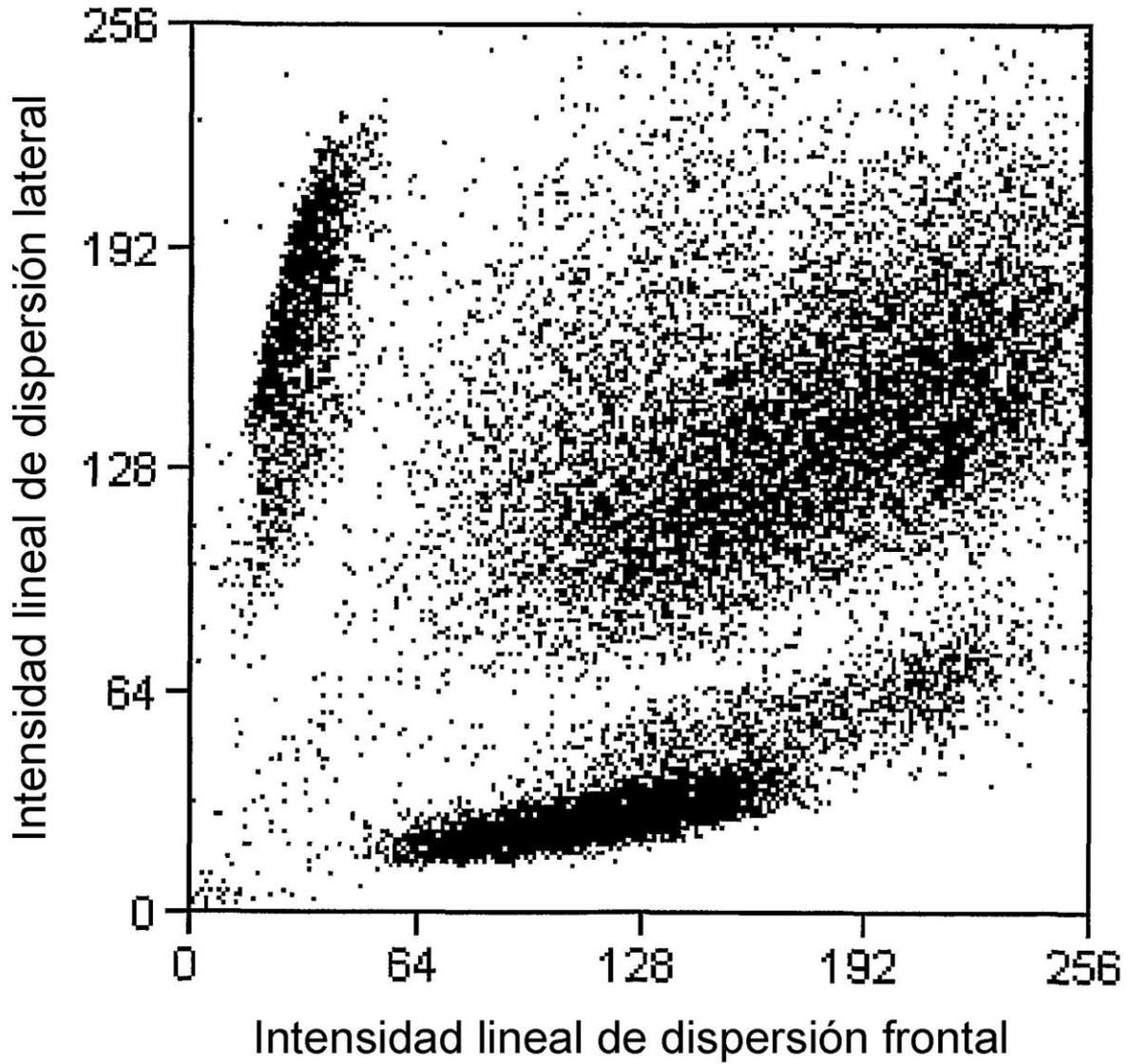
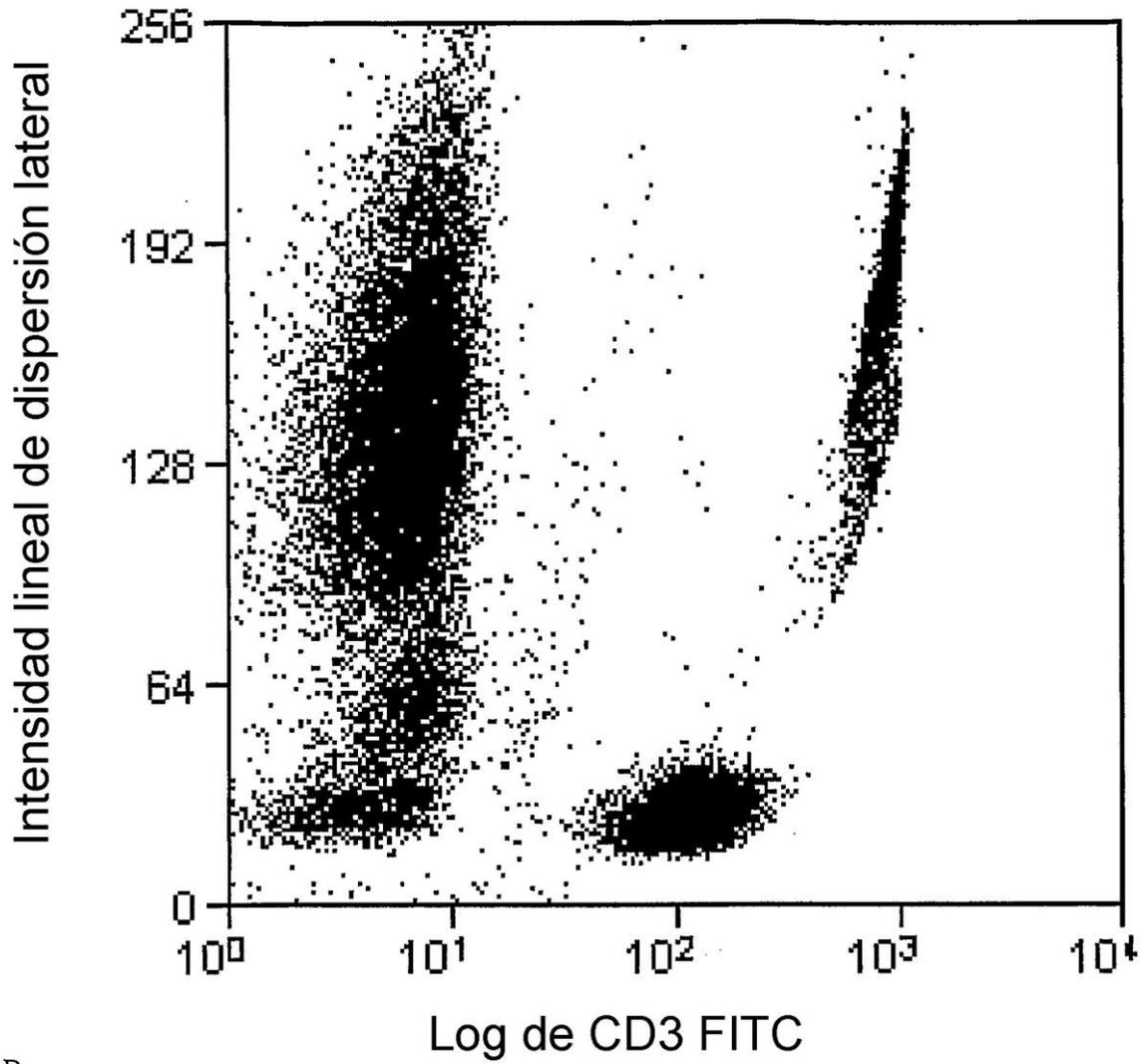


FIGURA 1D

Matriz



D

FIGURA 2A

Control de FITC

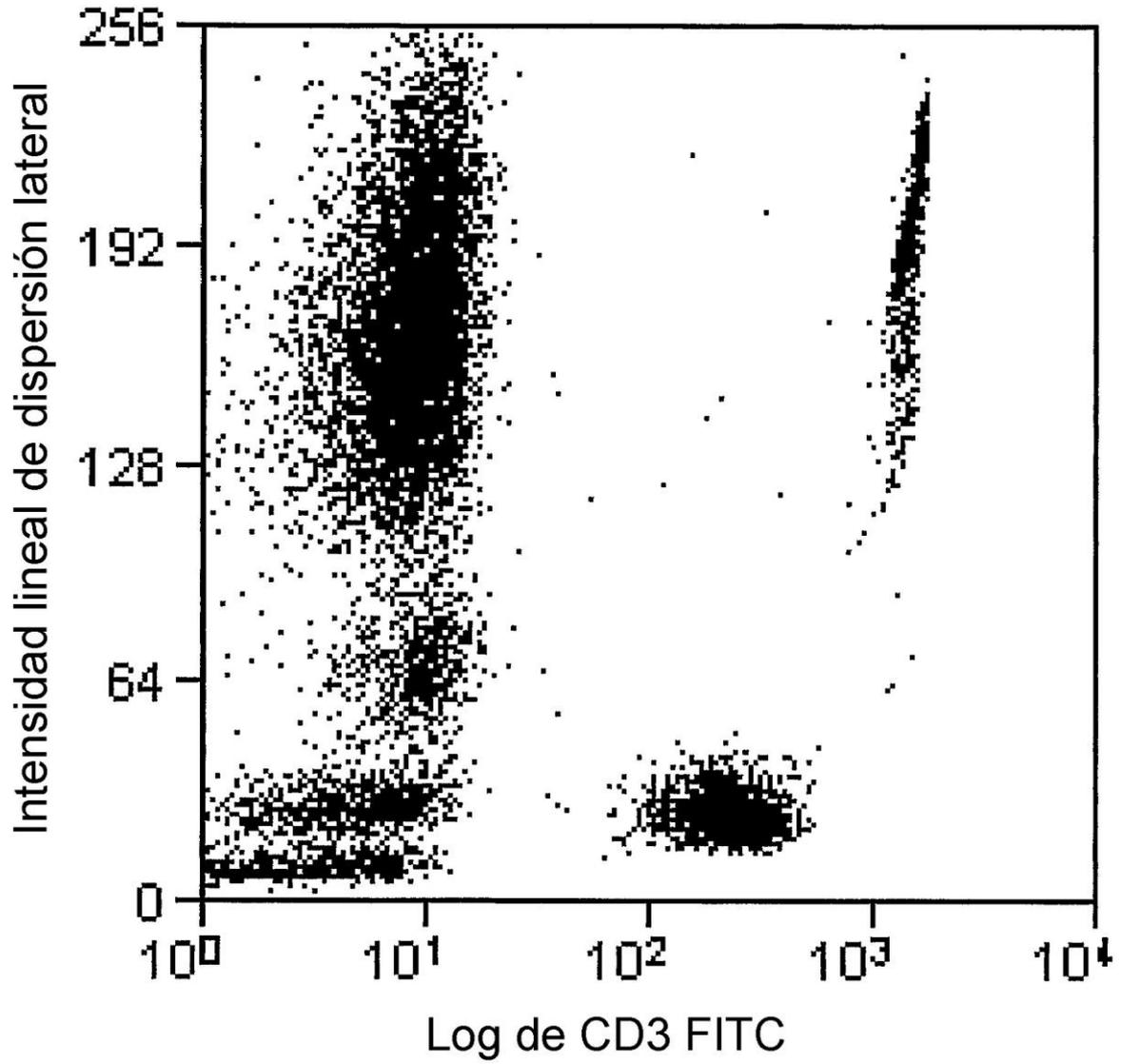


FIGURA 2B

Matriz de FITC

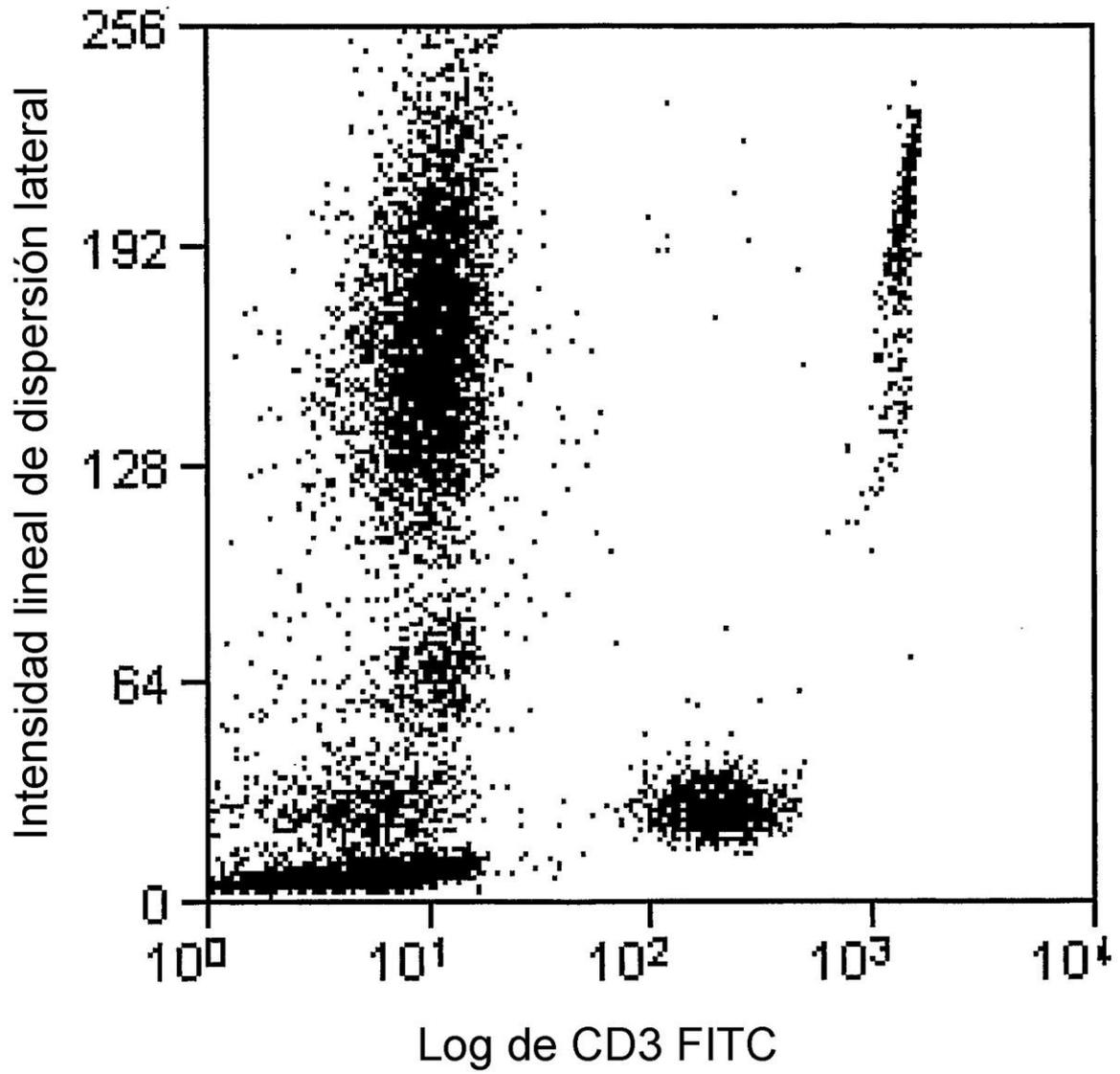


FIGURA 2C

Control de RPE

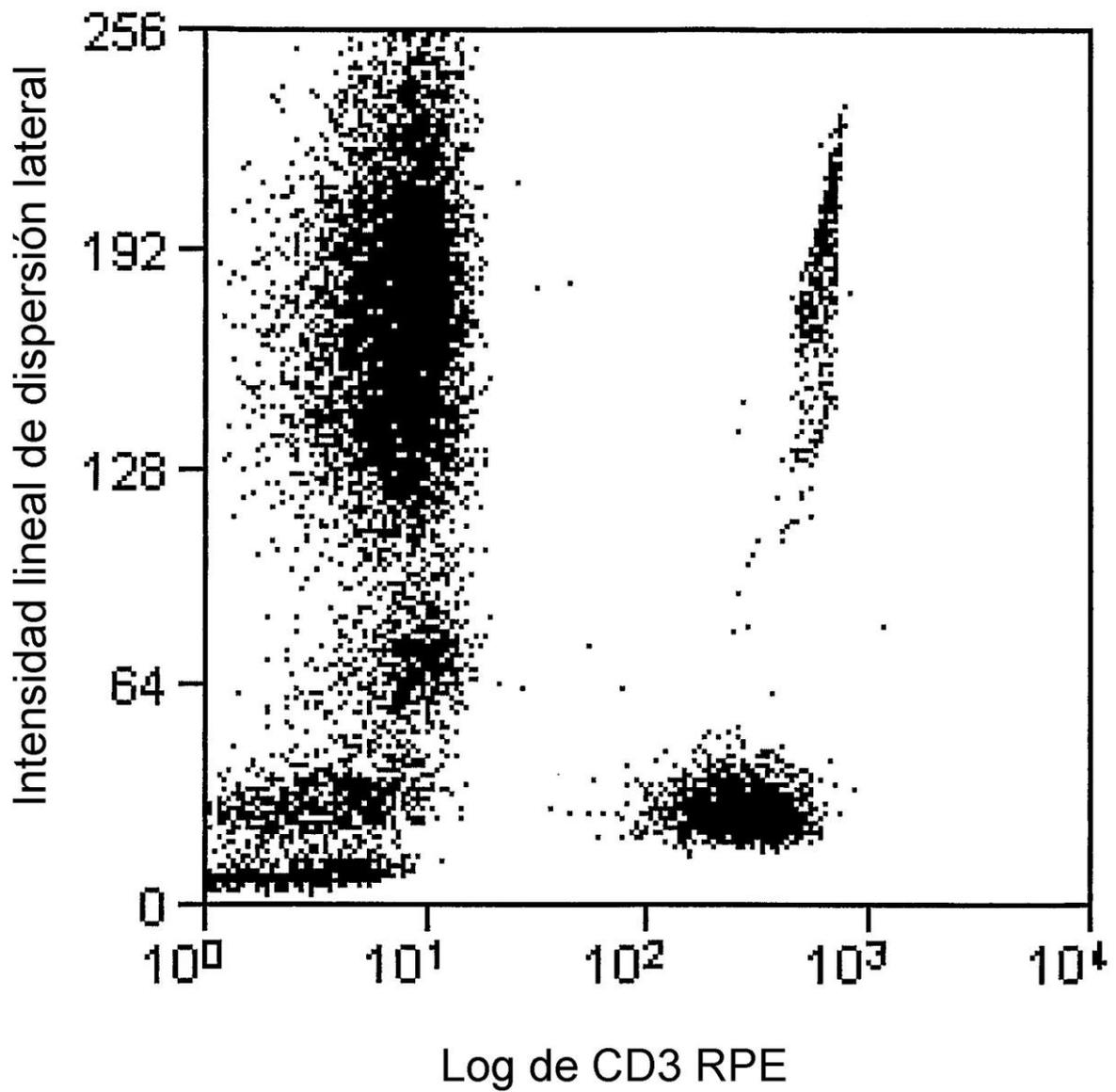


FIGURA 2D

Matriz de RPE

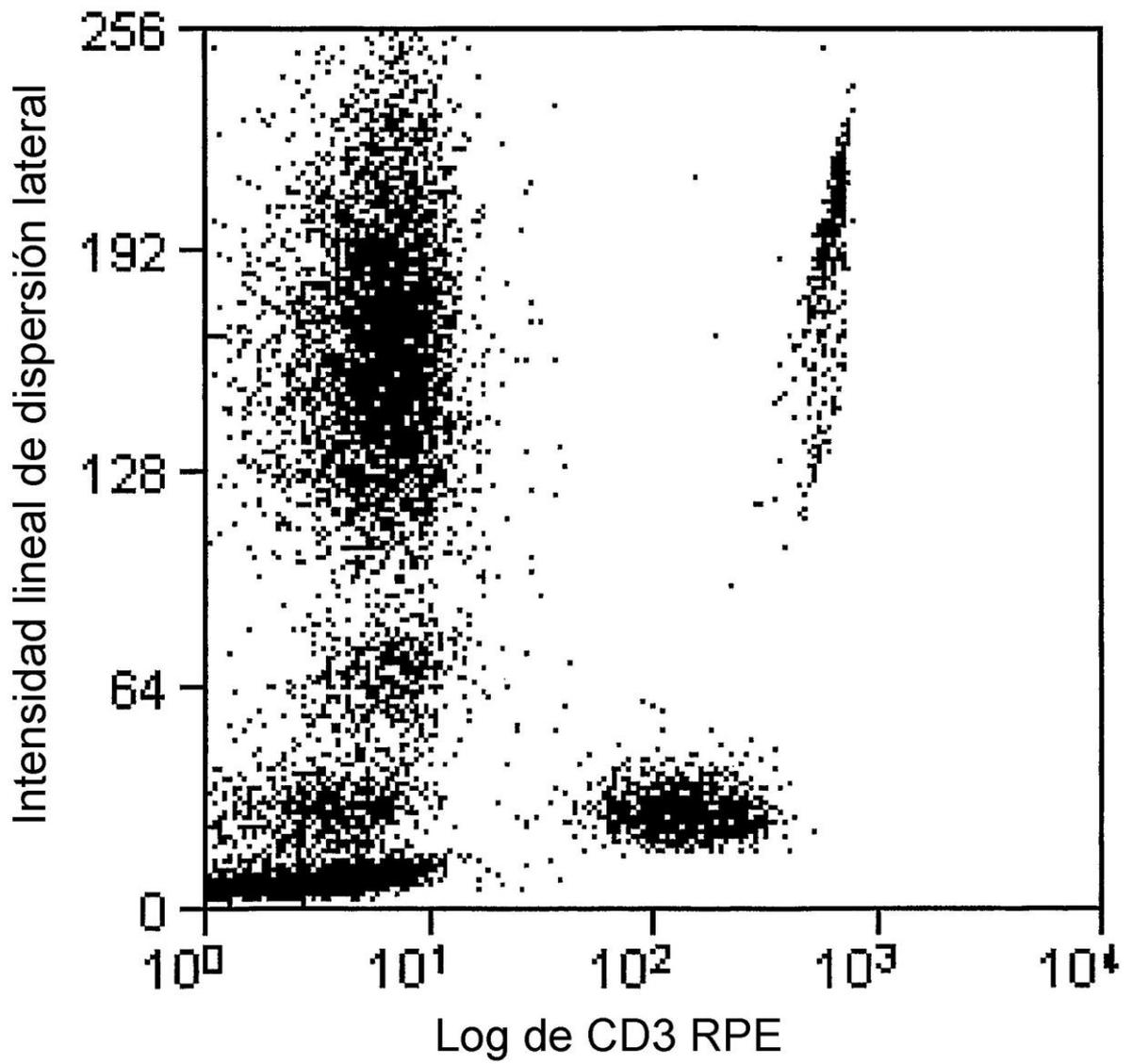


FIGURA 2E

Control de RPE-Cy5

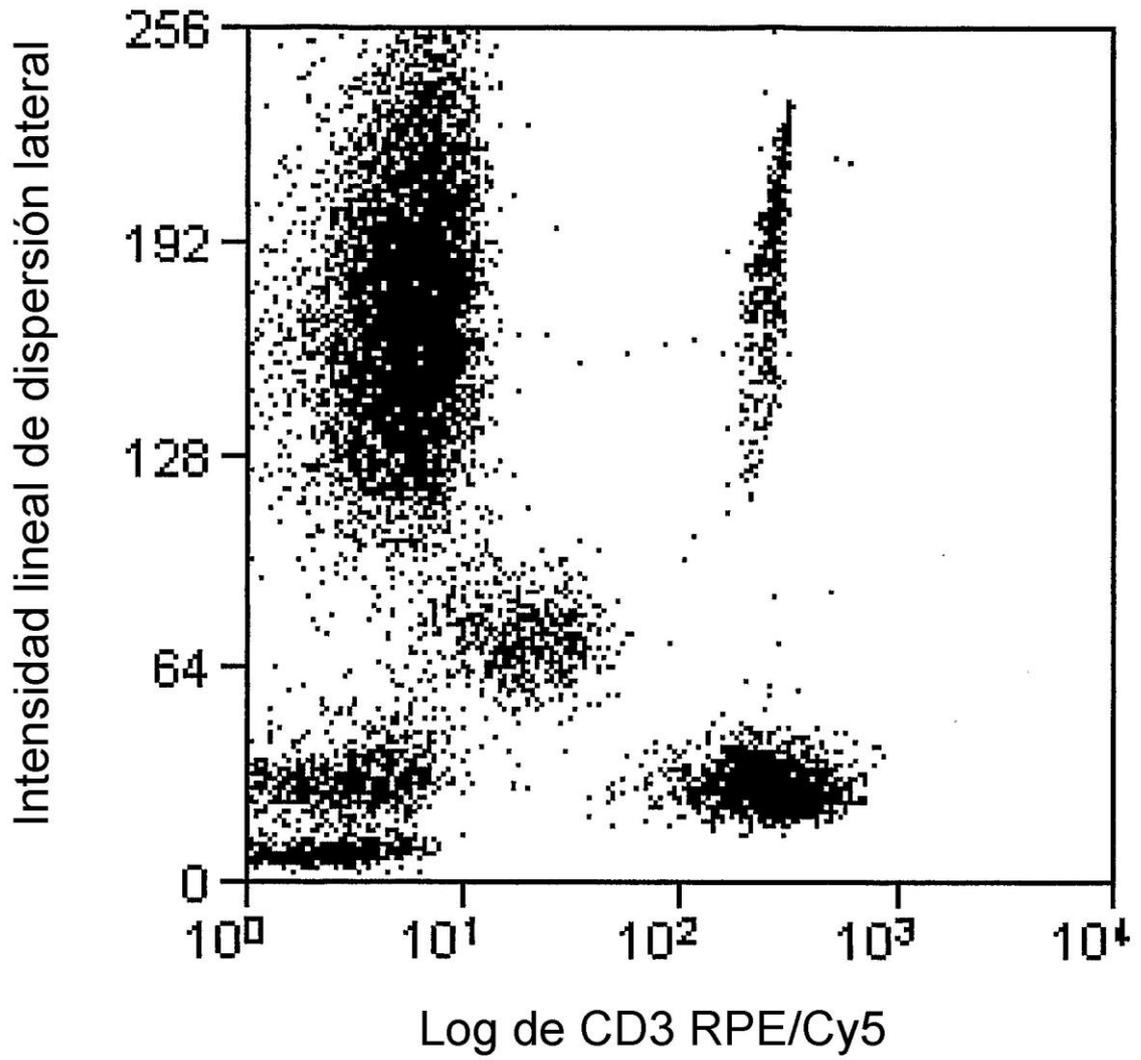


FIGURA 2F

Control de RPE-Cy5

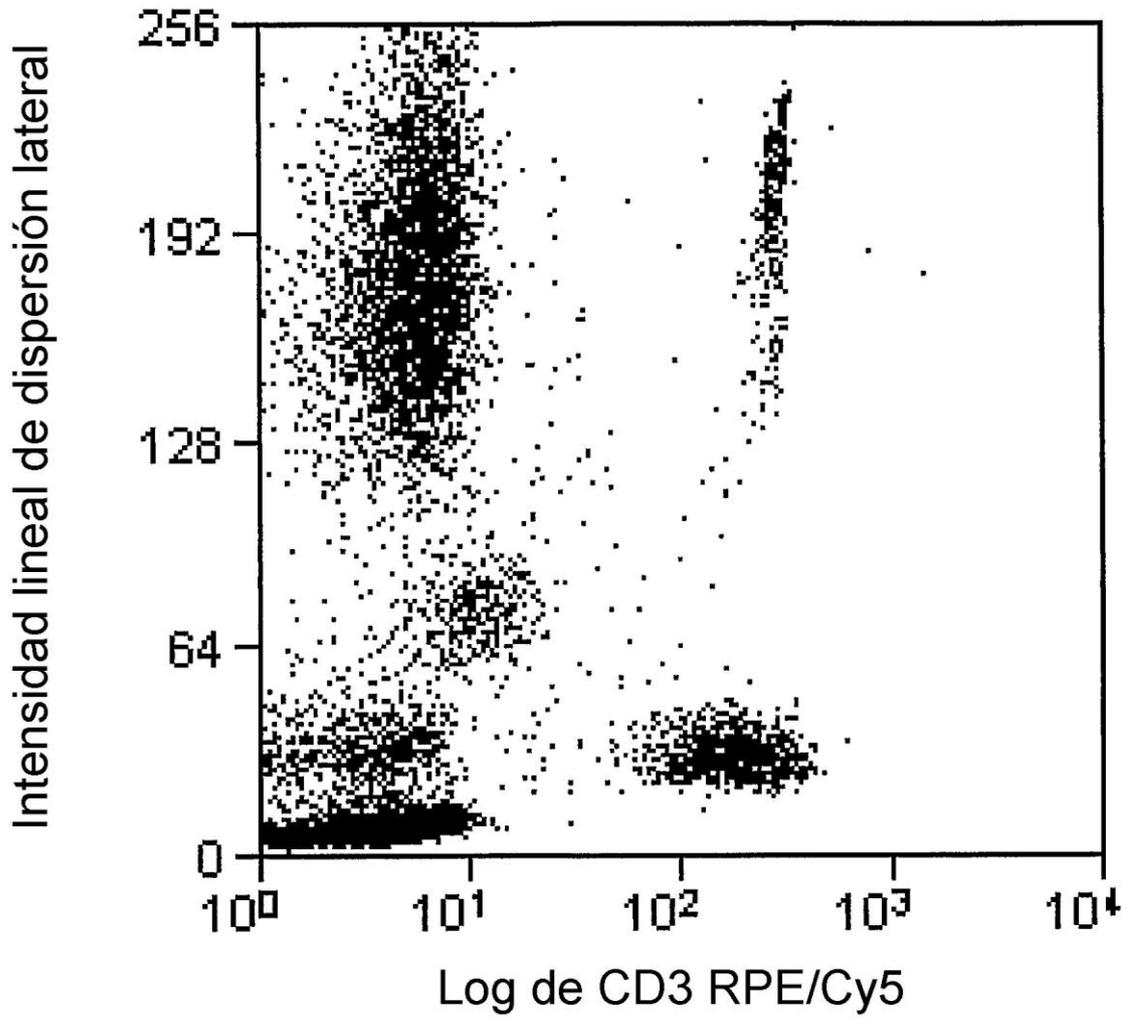


FIGURA 2G

Control de APC

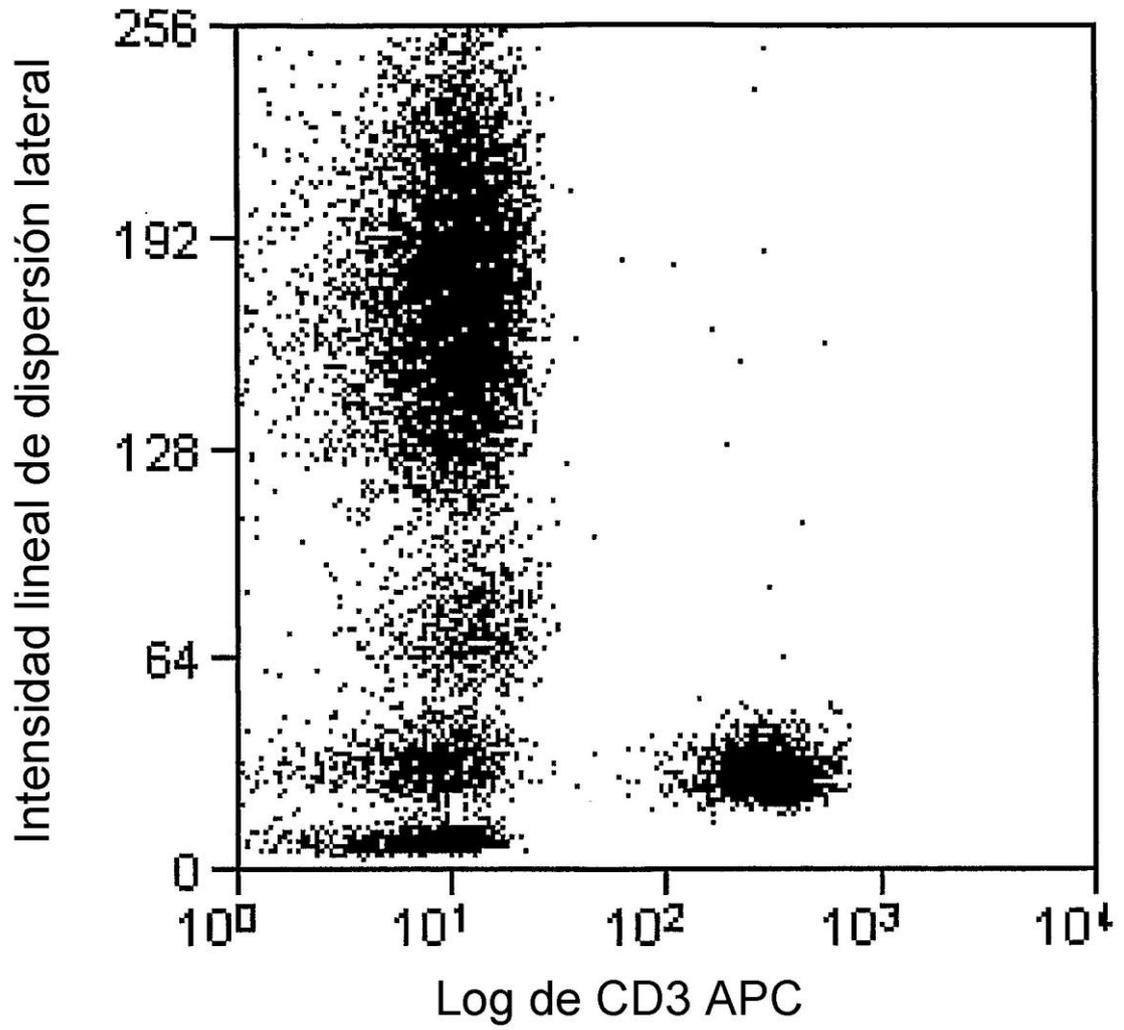


FIGURA 2H

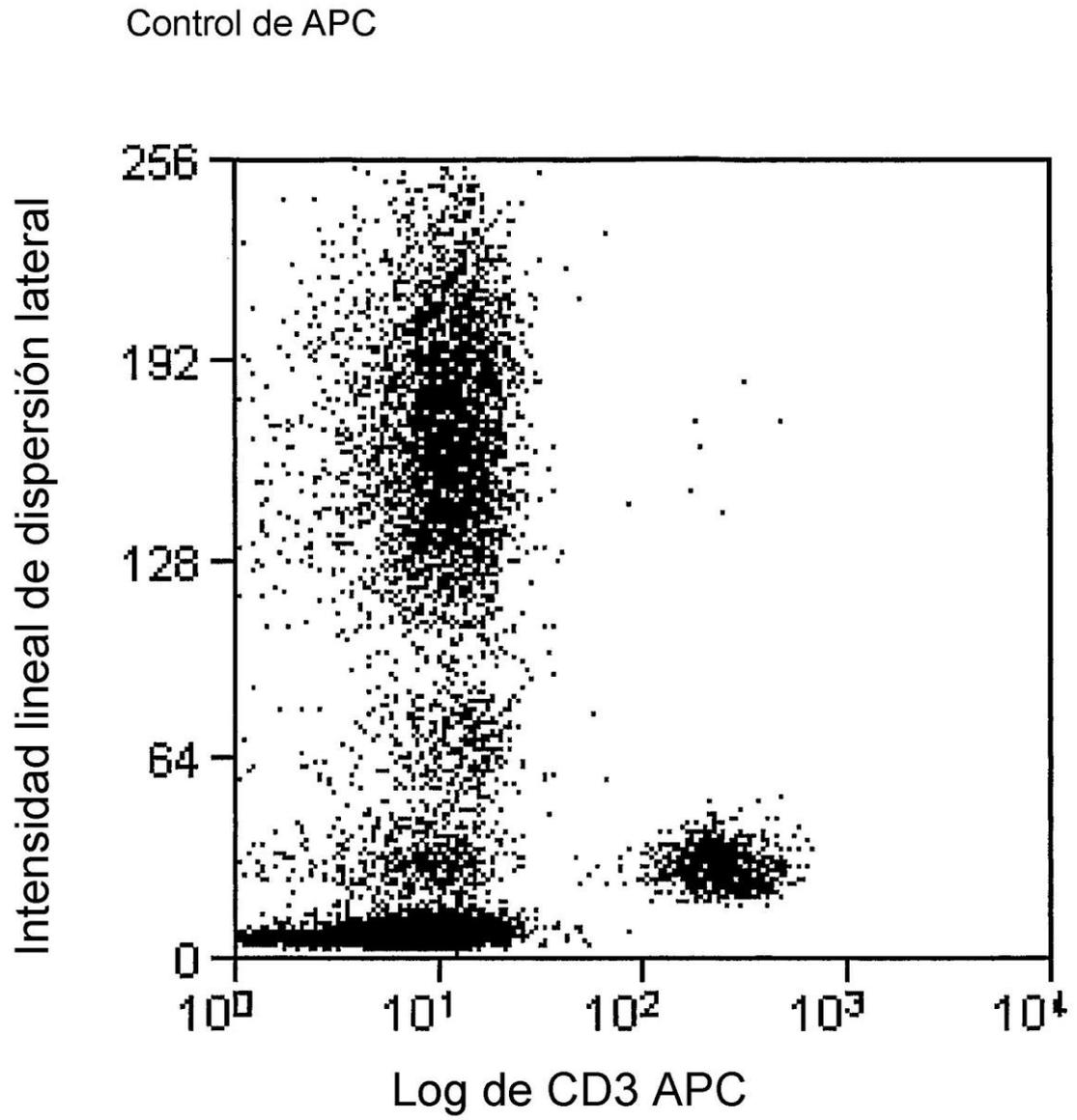


FIGURA 2I

Control de Dual 1

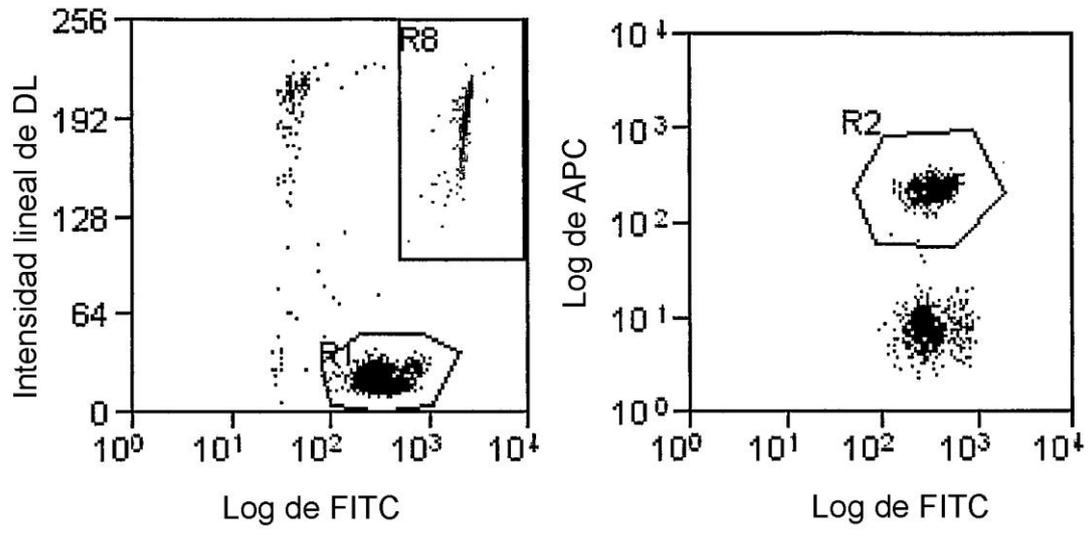


FIGURA 2J

Matriz de Dual 1

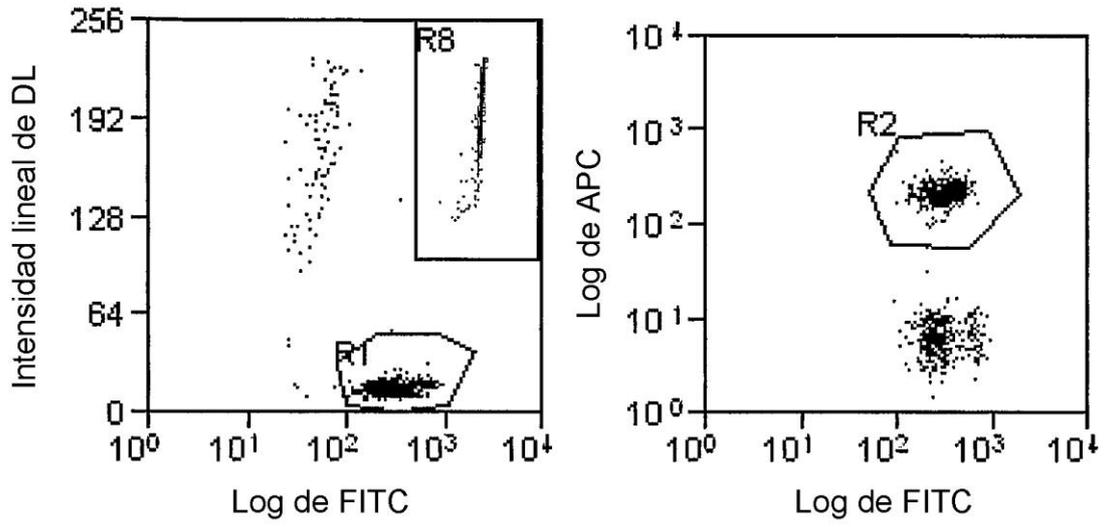


FIGURA 2K

Control de Dual 2

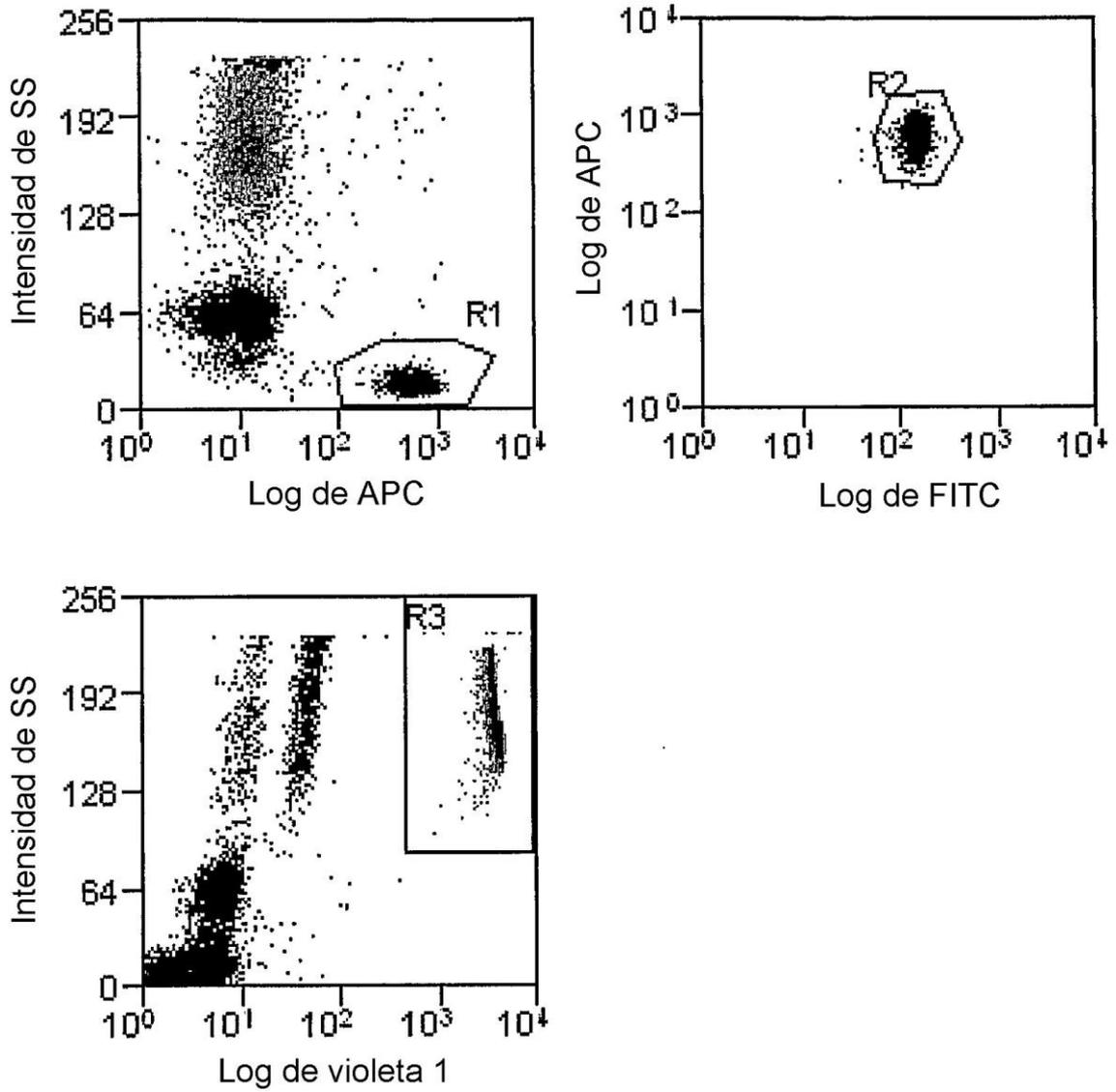


FIGURA 2L

Matriz de Dual 2

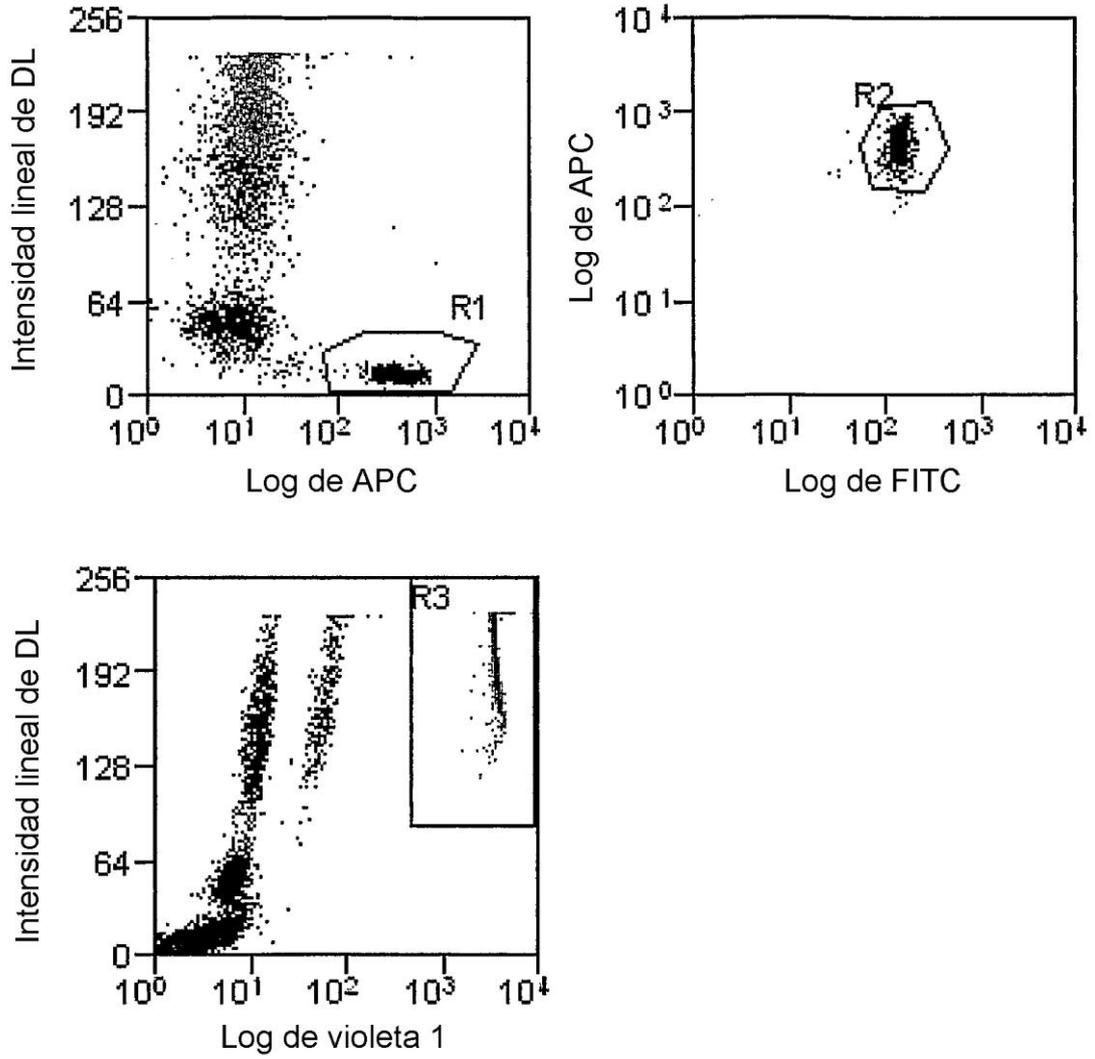


FIGURA 2M

Control de Dual 3

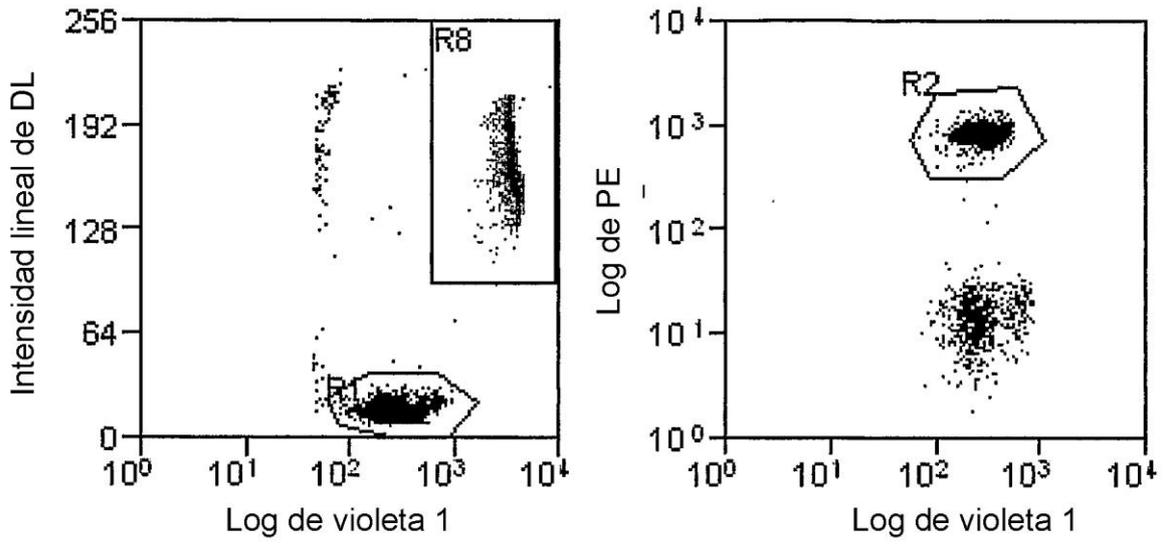


FIGURA 2N

Matriz de Dual 3

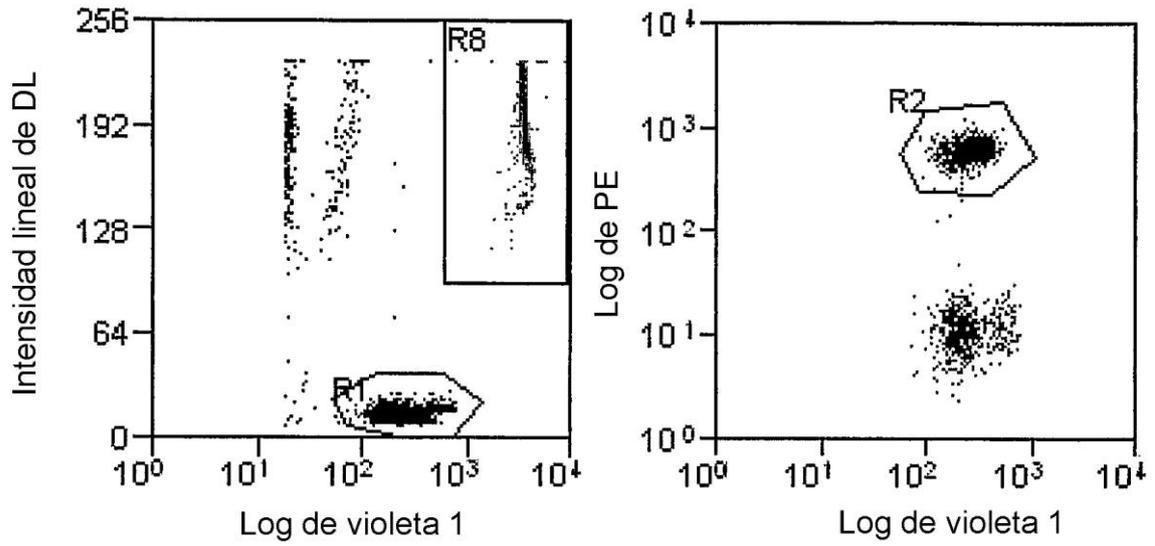


FIGURA 20

Control de Dual 4

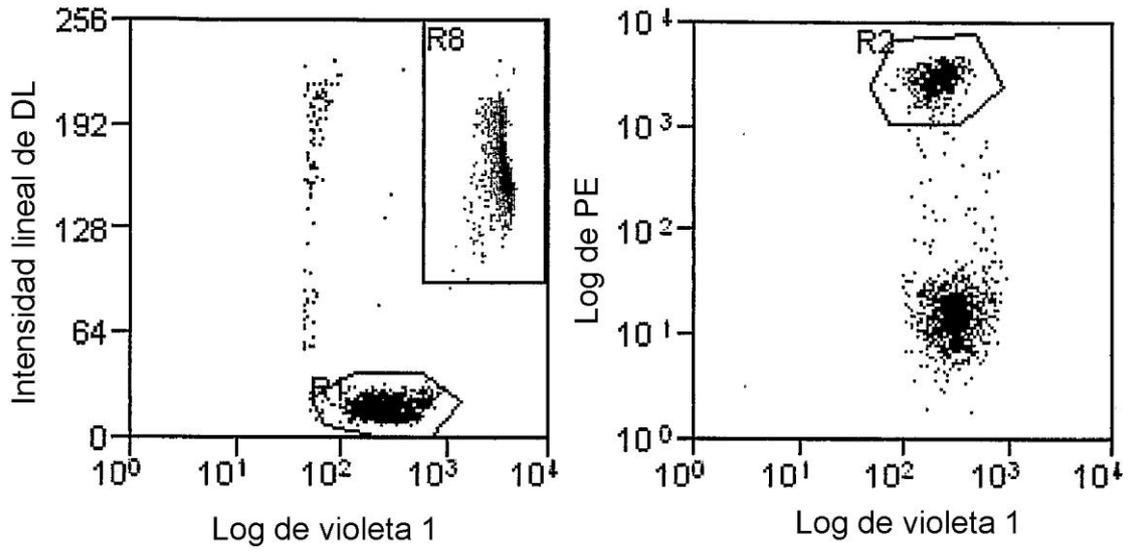


FIGURA 2P

Matriz de Dual 4

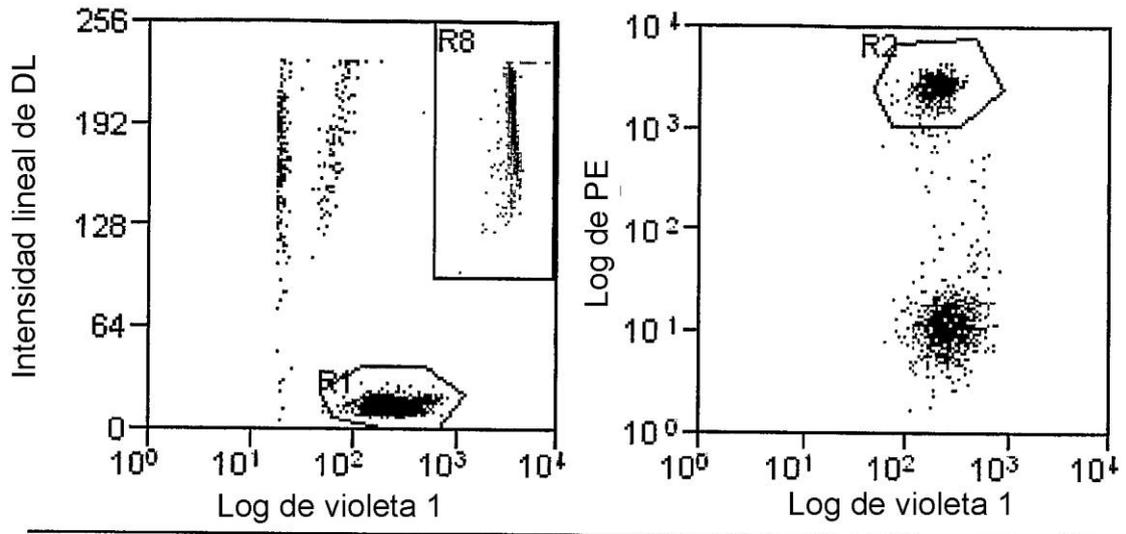


FIGURA 3A

CDC3 FITC

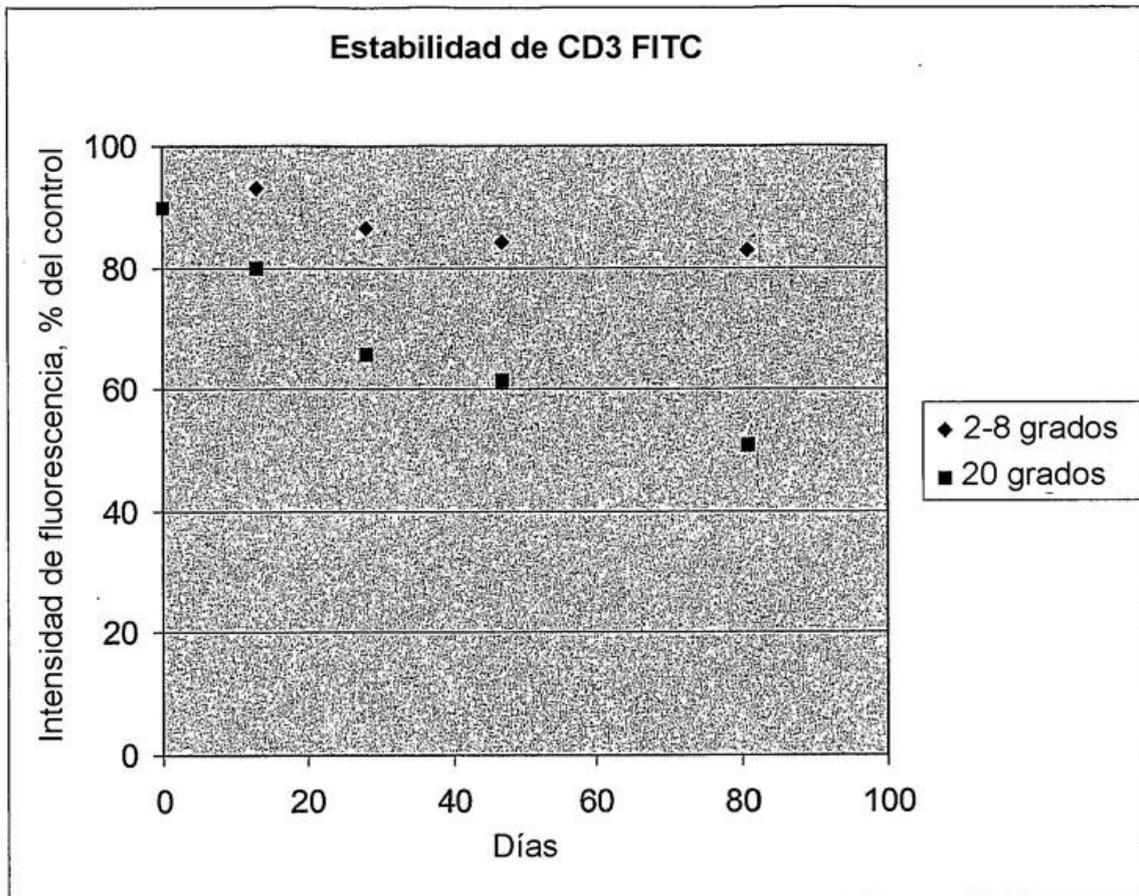


FIGURA 3B

CDC3 RPE

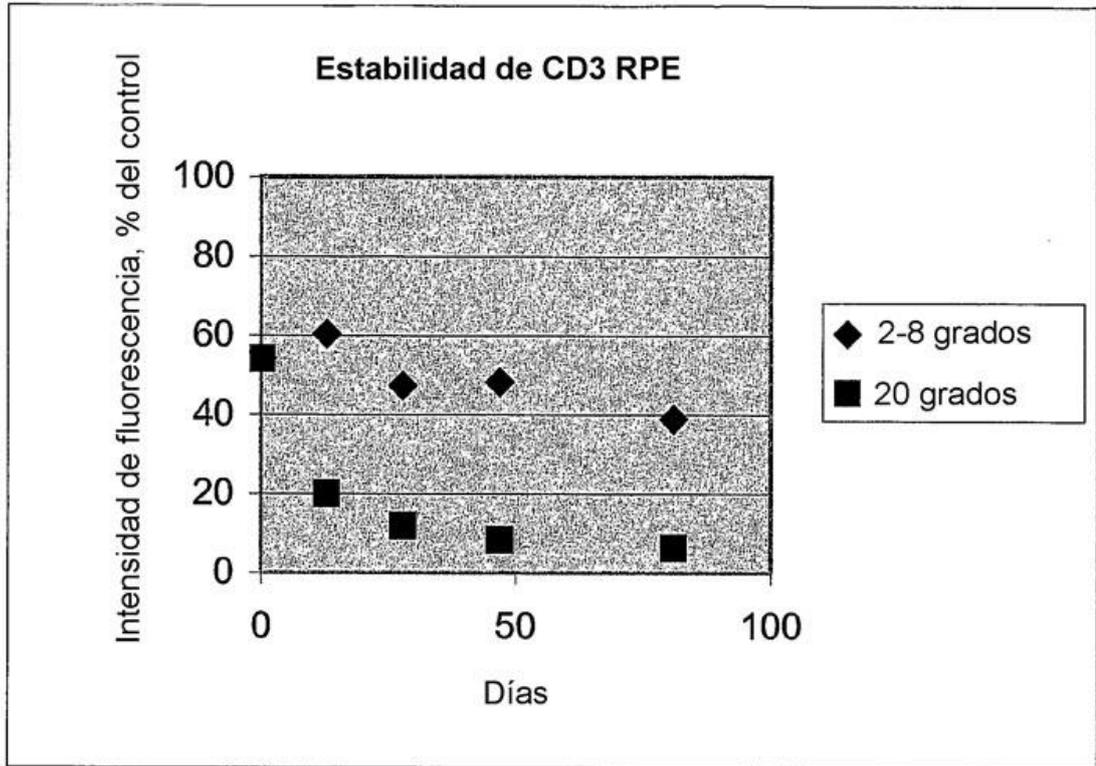
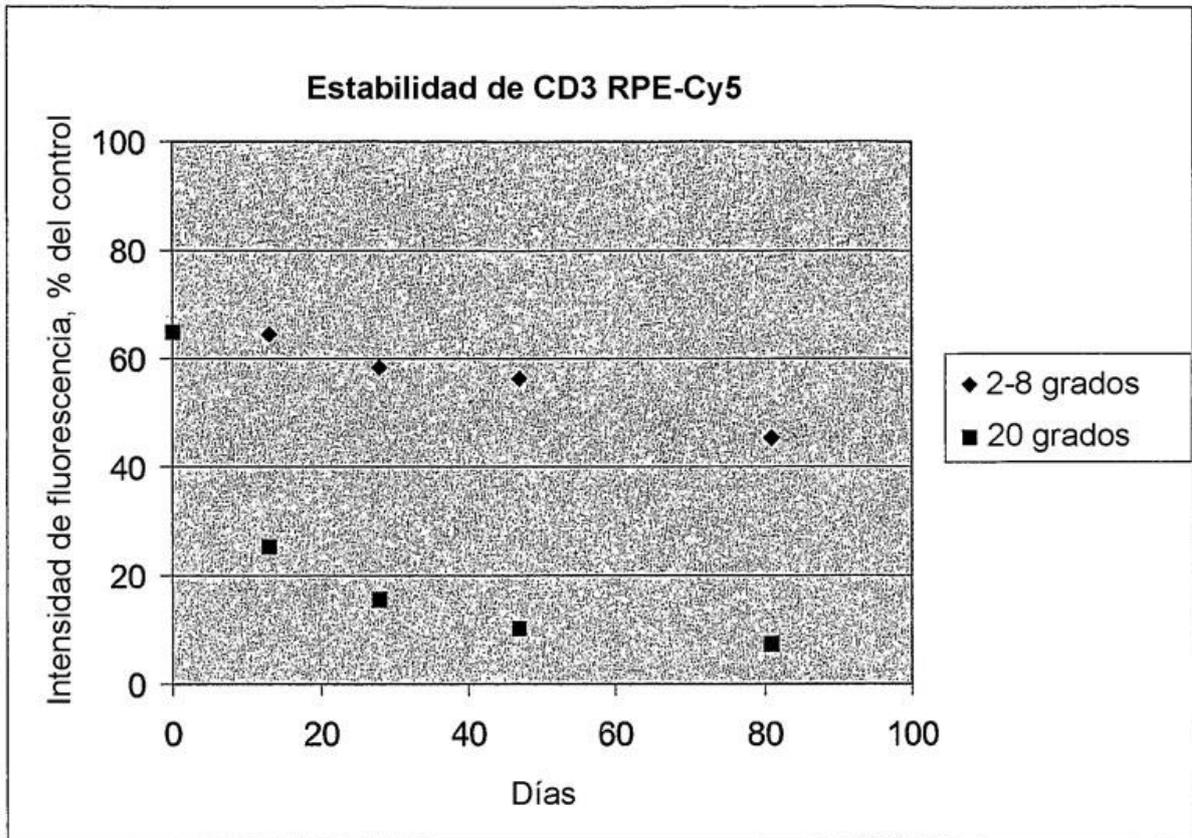


FIGURA 3C



CDC3 RPE-Cy5

FIGURA 3D

CDC3 APC

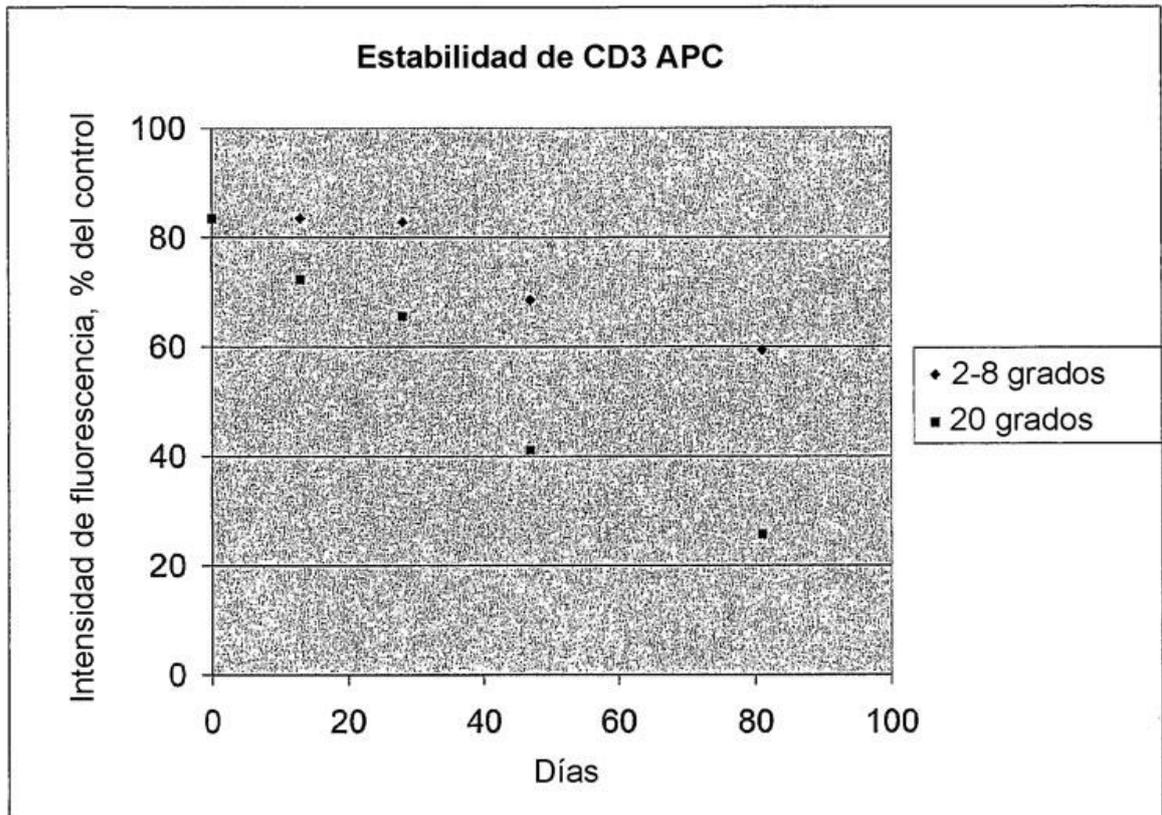


FIGURA 3E

CD3-FITC/CD4-FITC

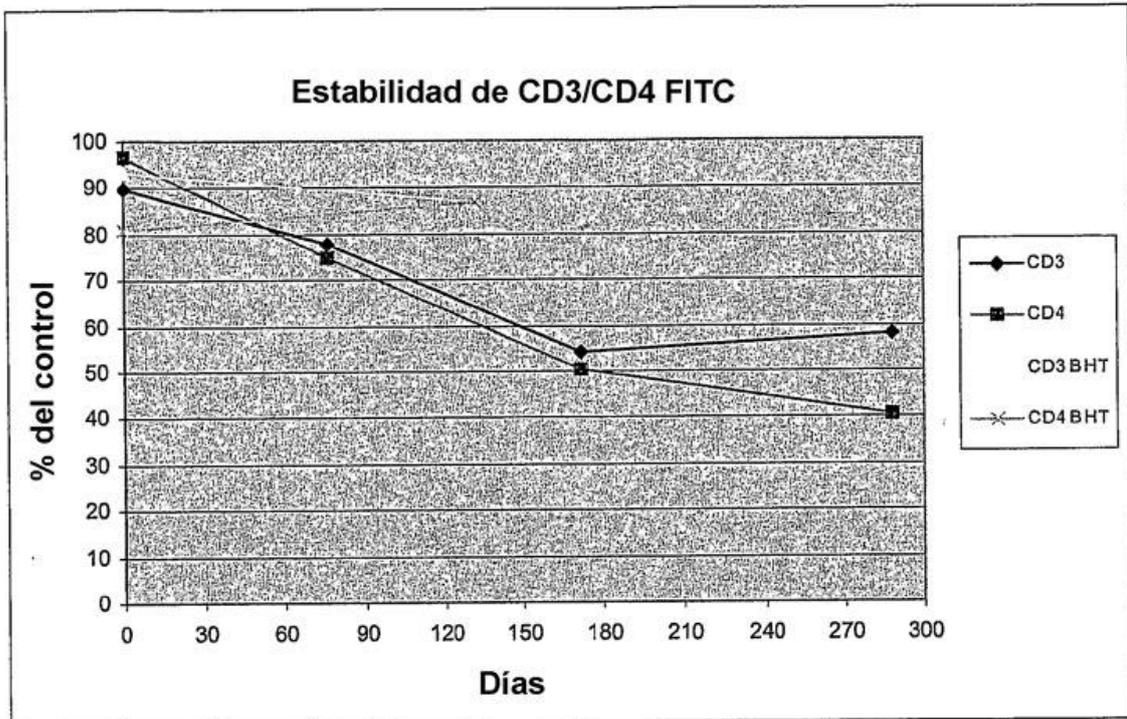


FIGURA 3F

CD3-APC/CD4-APC

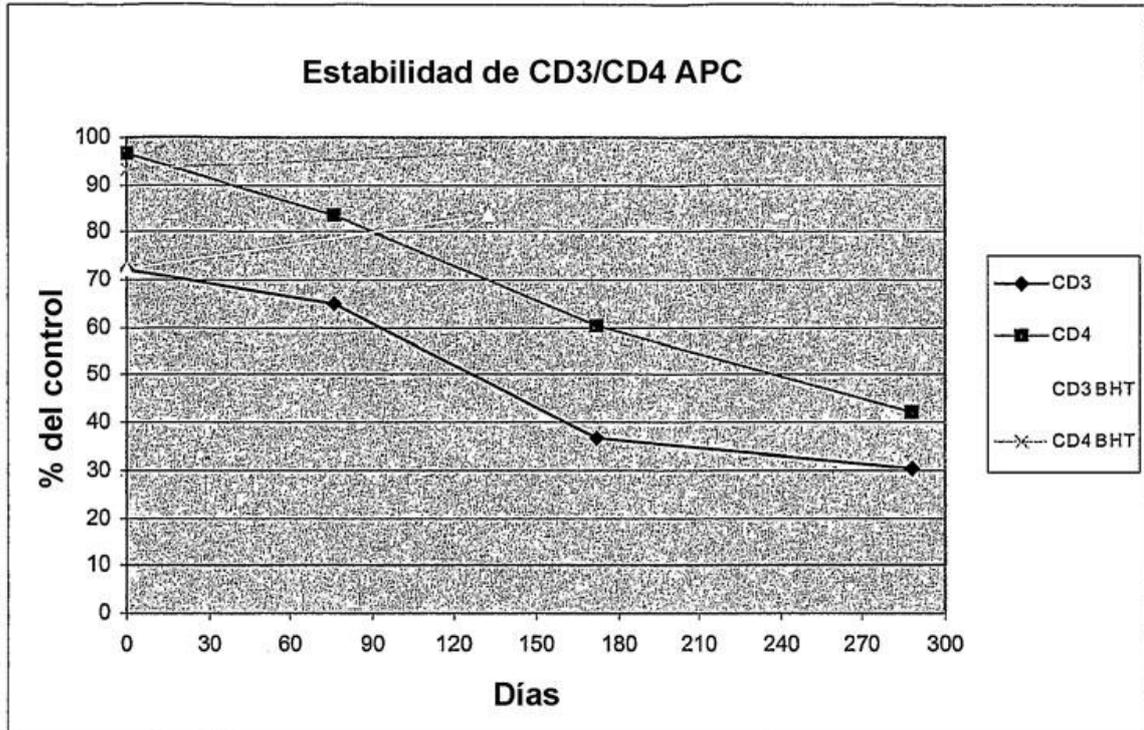


FIGURA 3G

CD3-PB

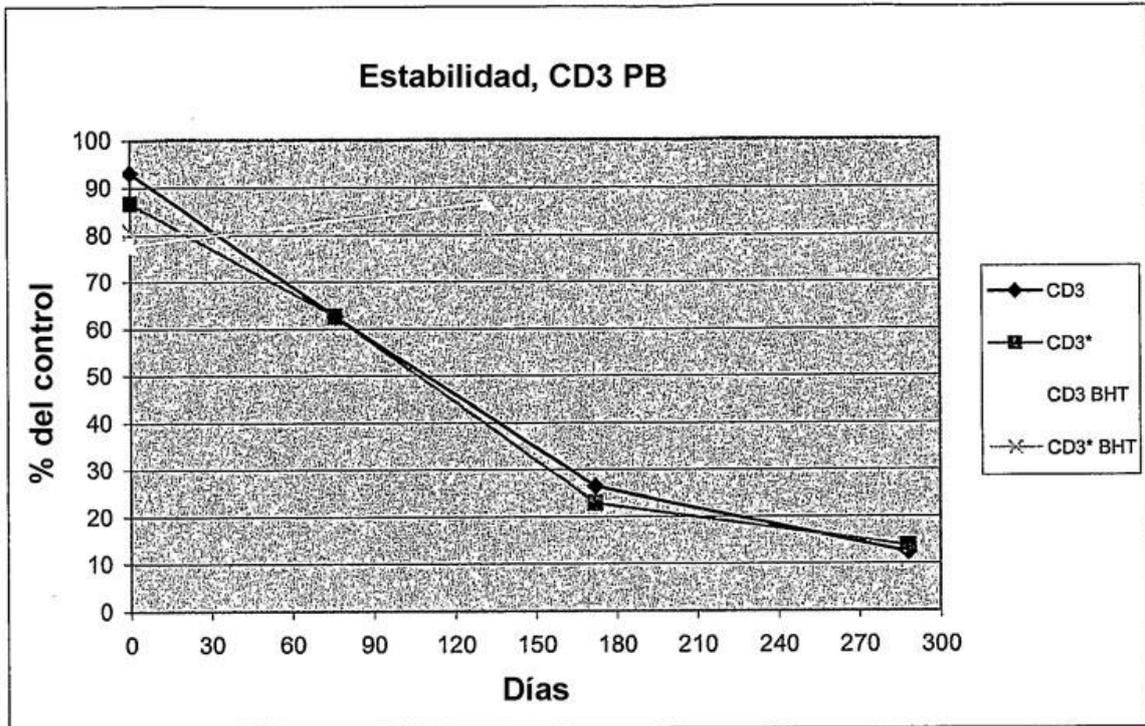


FIGURA 3H

CD4-RPE/CD8-RPE

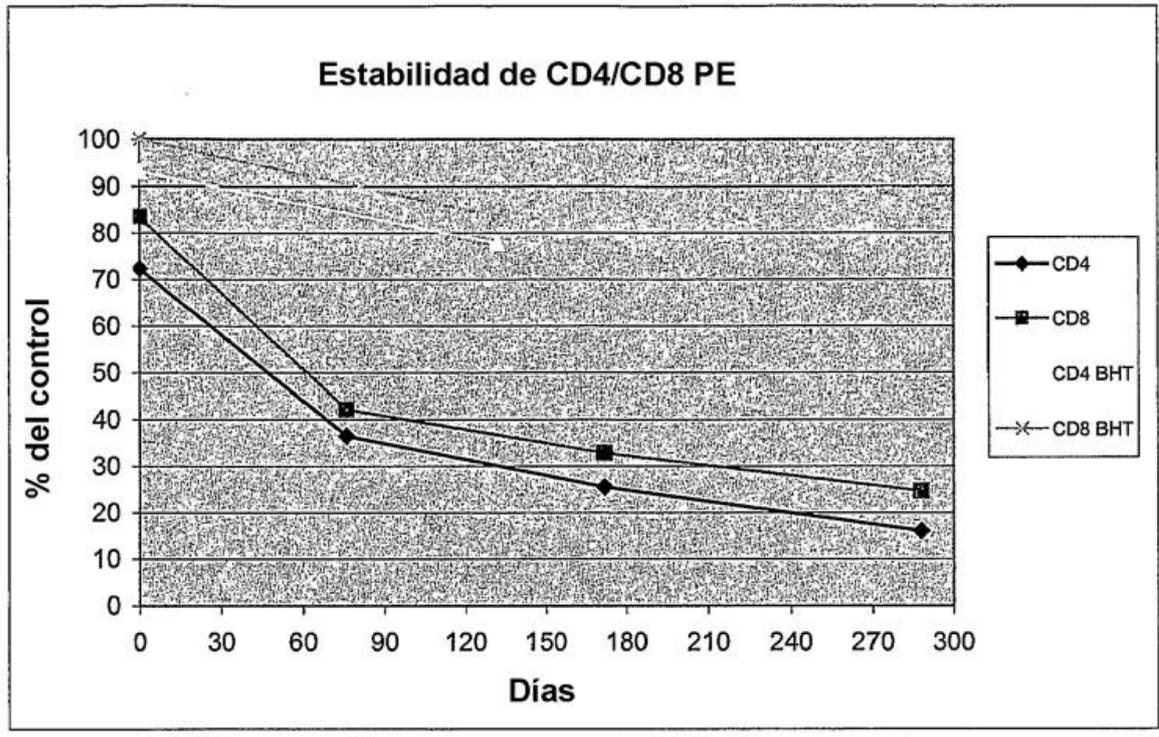


FIGURA 4A

CD3 RPE-A680 Día 0

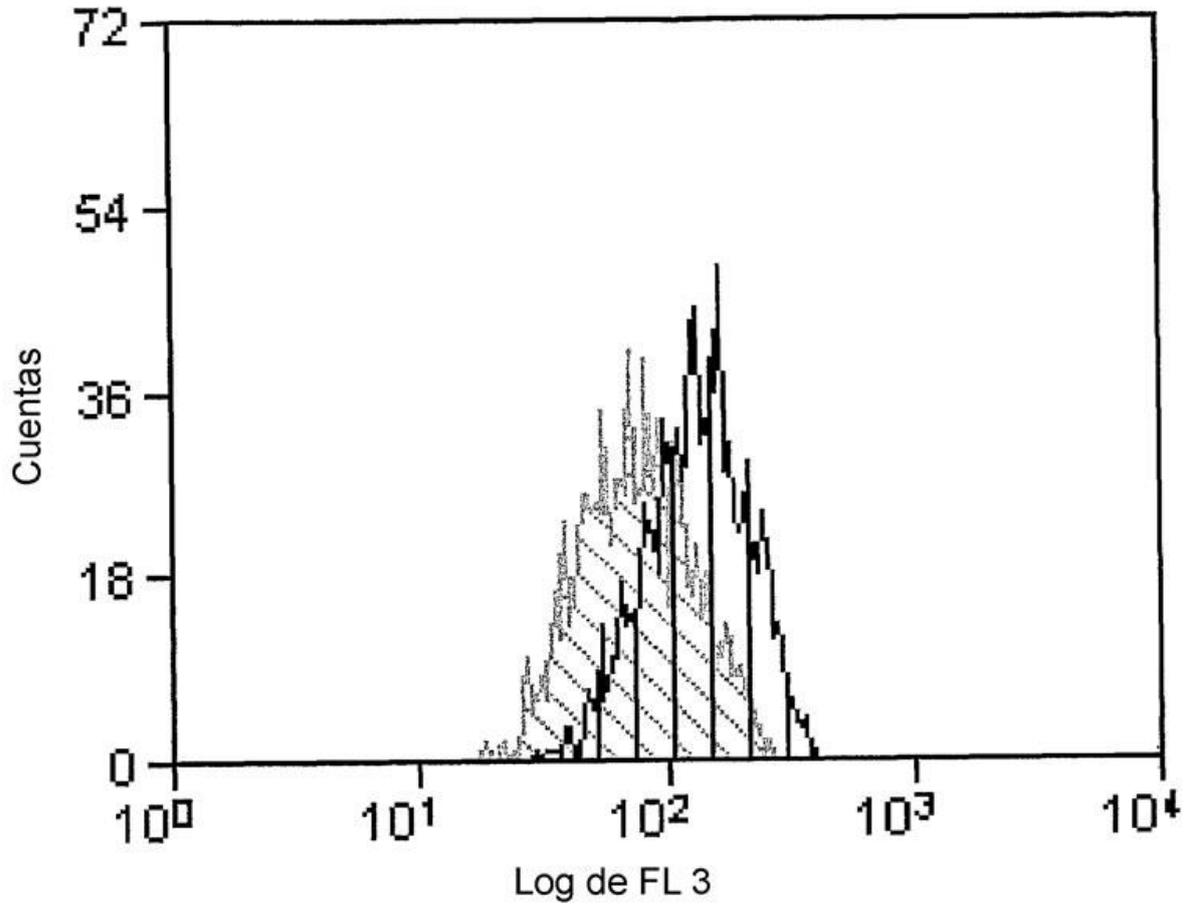


FIGURA 4B

CD3 RPE-A680 Día 8

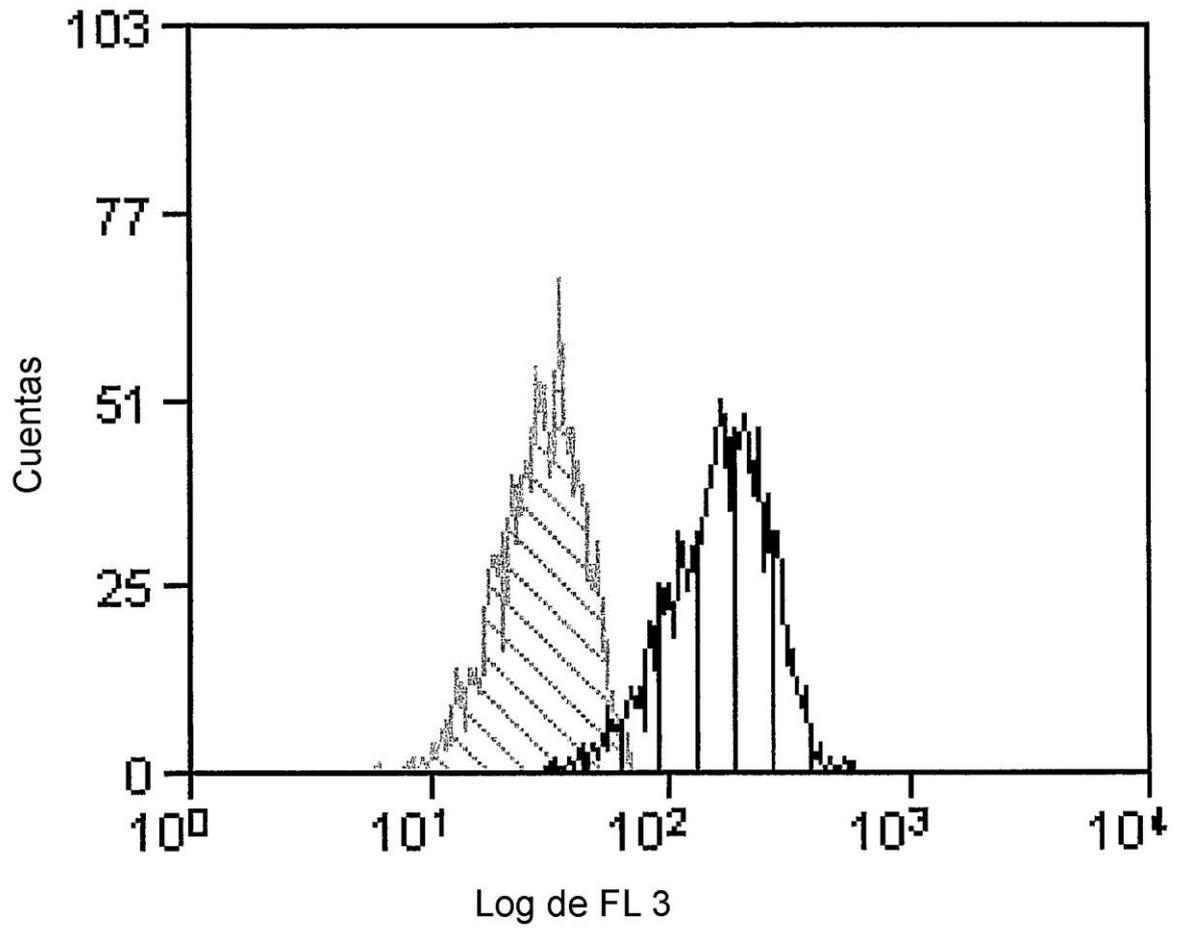


FIGURA 4C

CD4 FITC Día 0

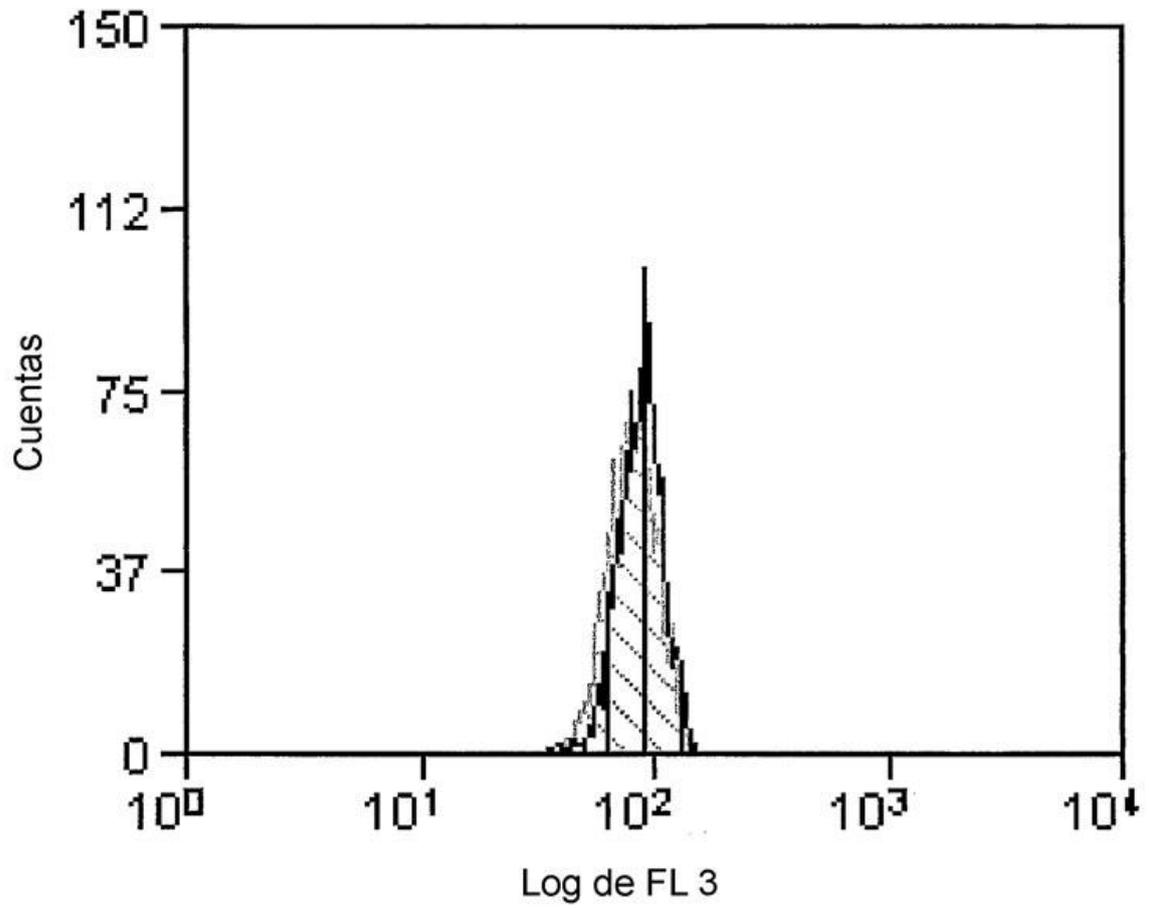


FIGURA 4D

CD4 FITC Día 8

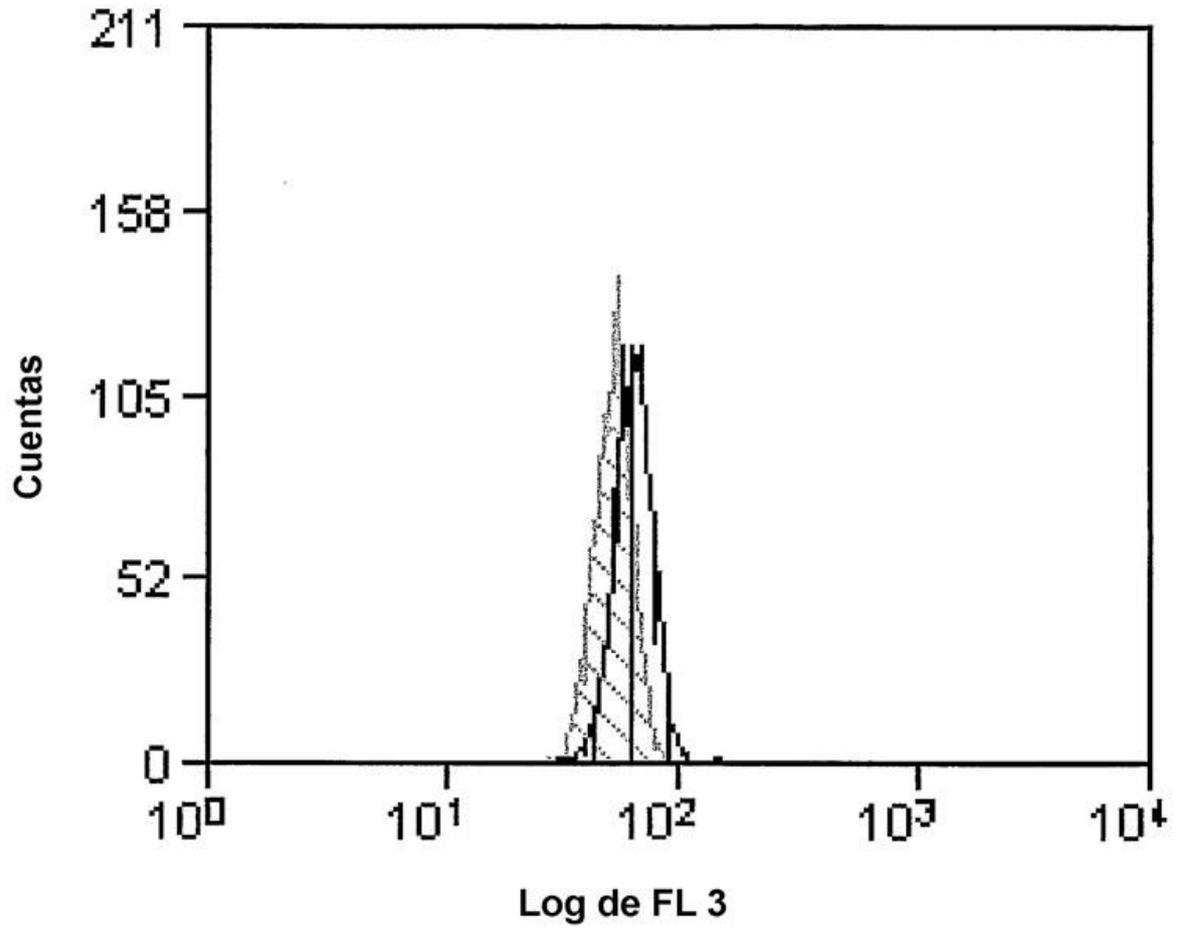


FIGURA 5A

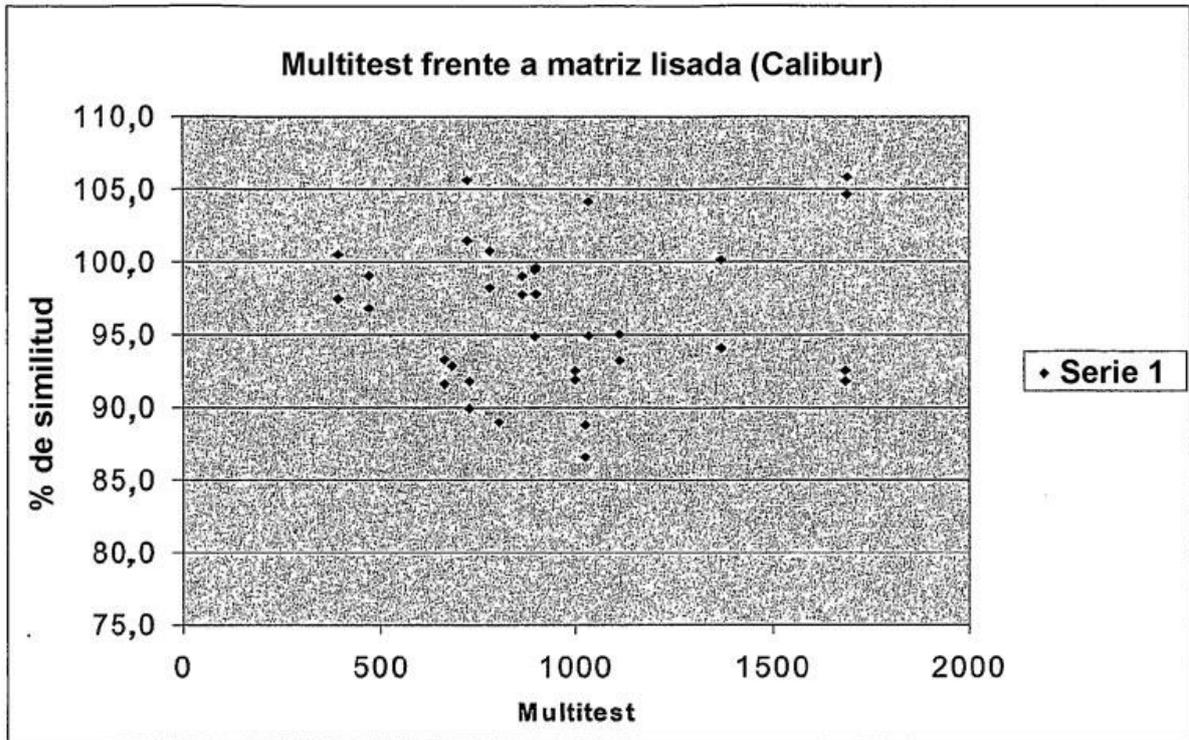


FIGURA 5B

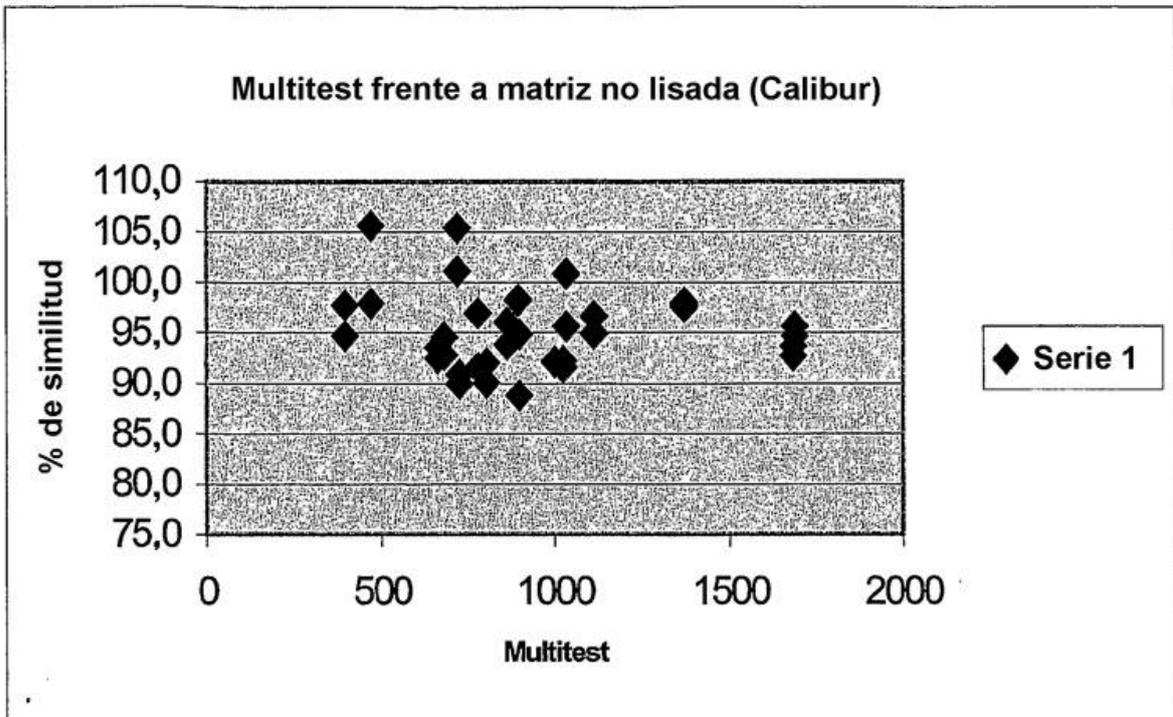


FIGURA 5C

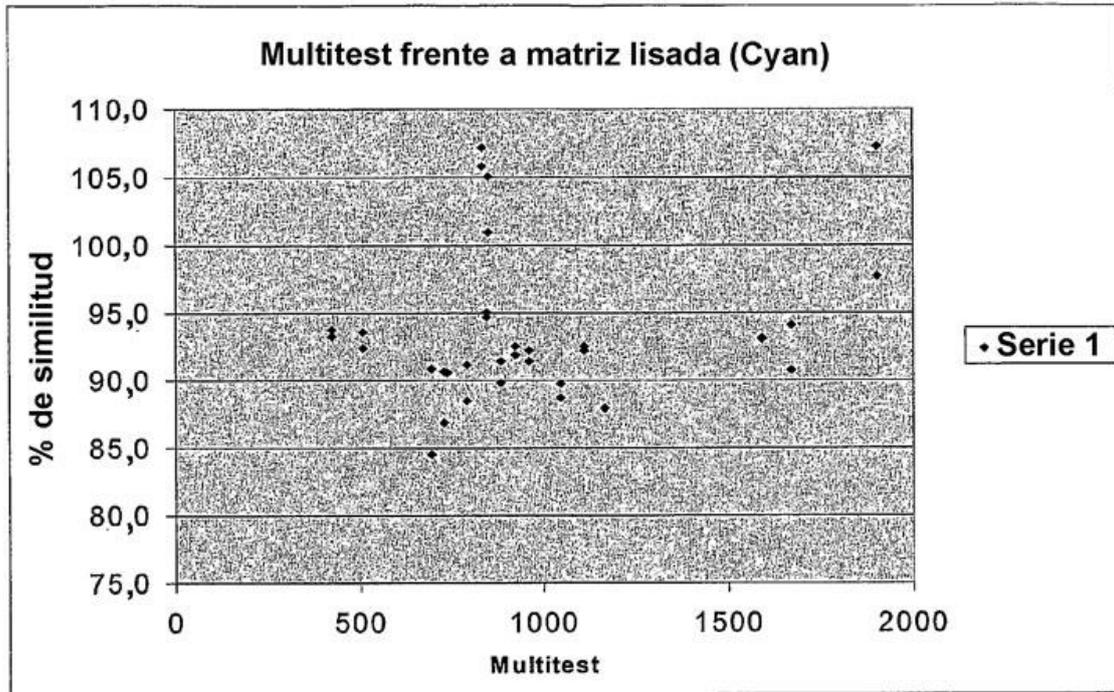


FIGURA 5D

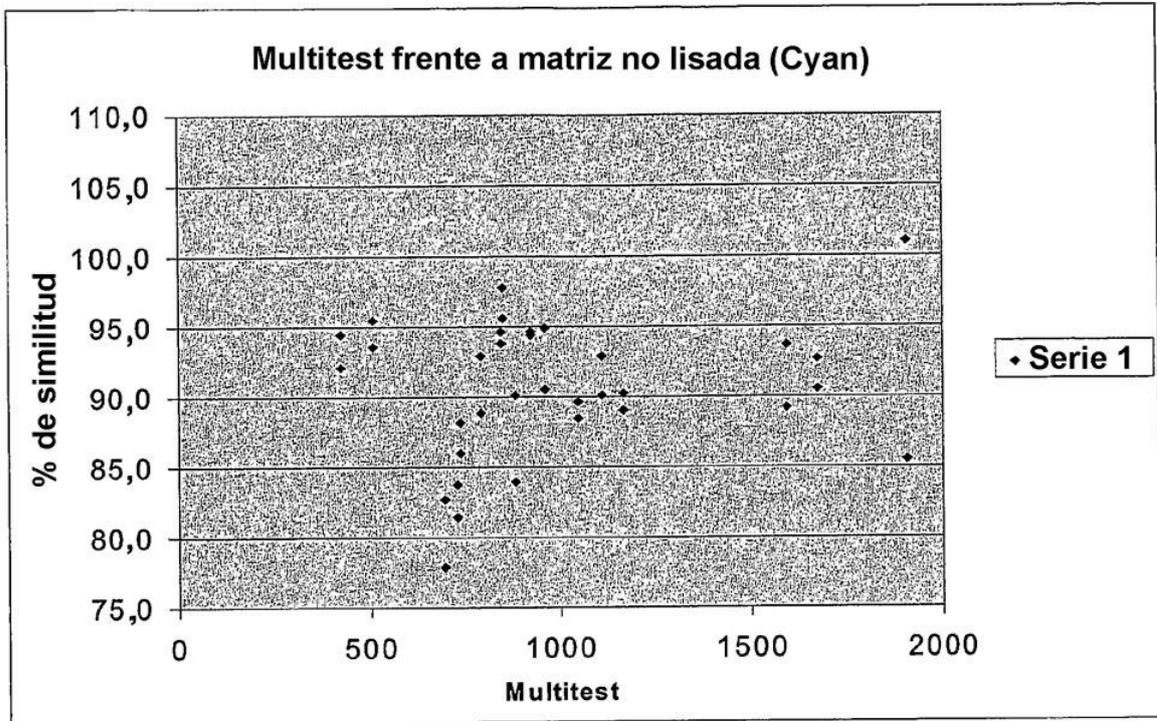


FIGURA 5E

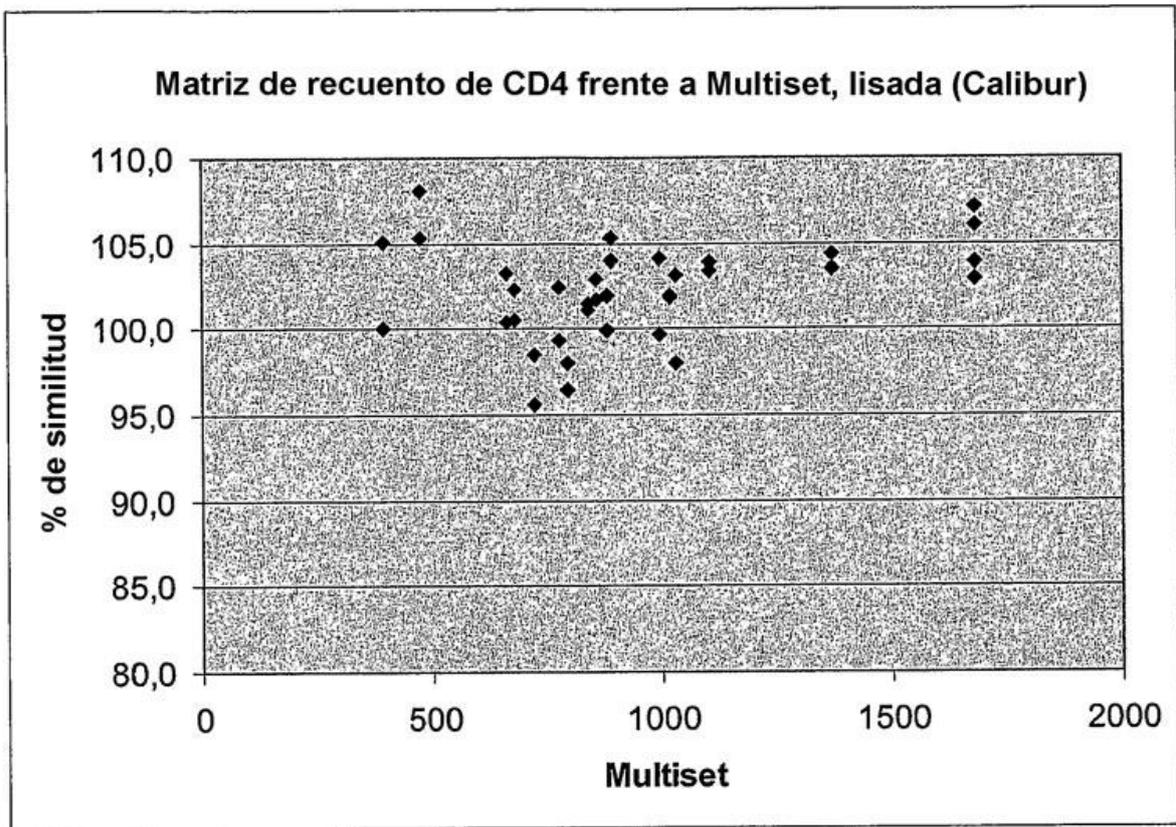


FIGURA 5F

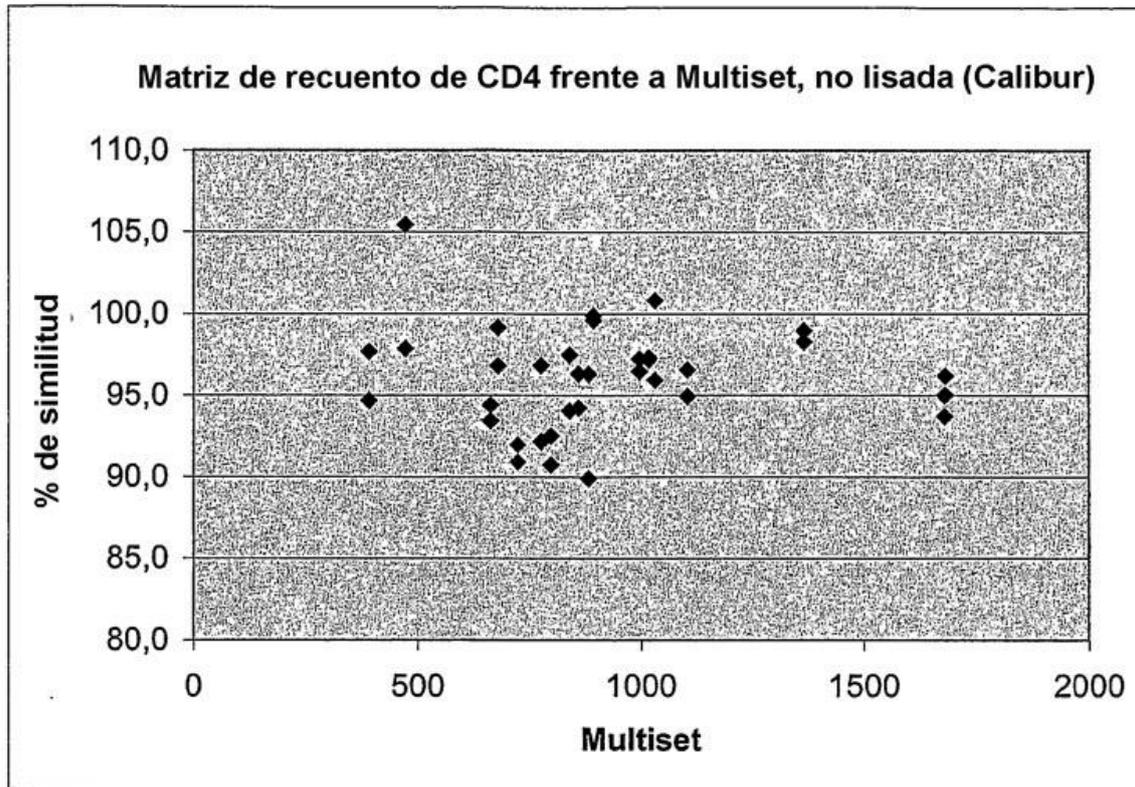


FIGURA 5G

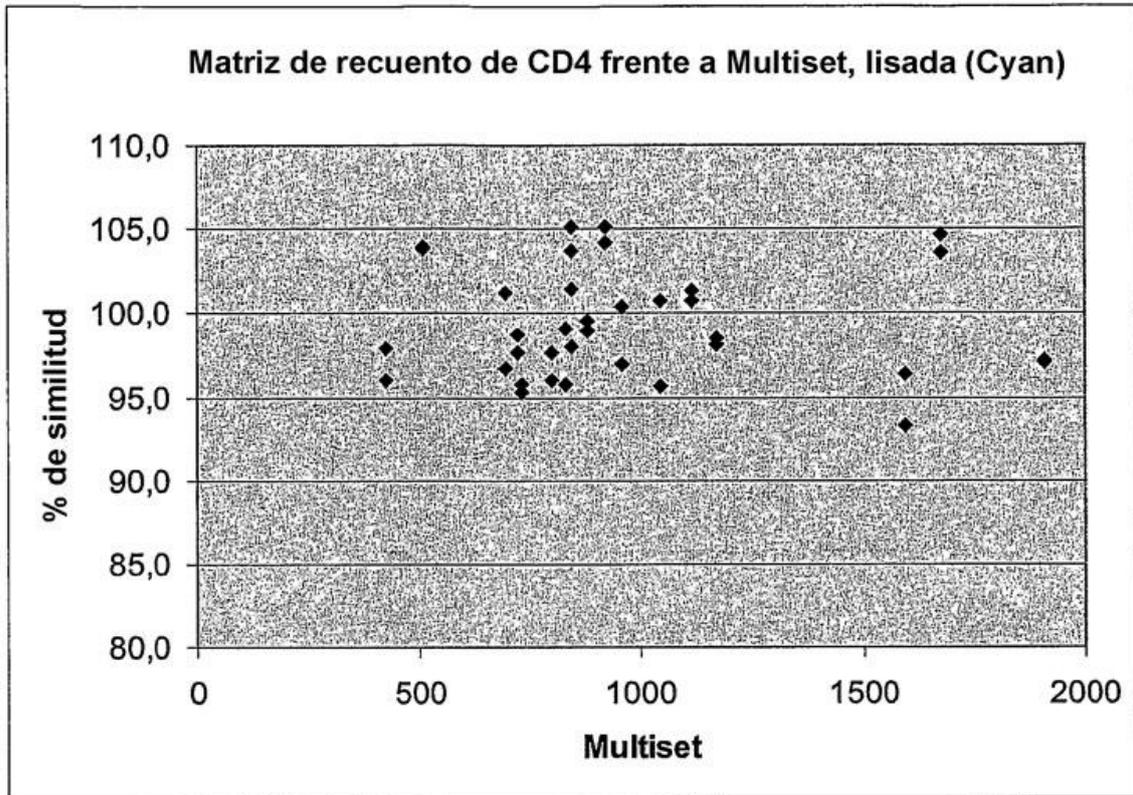


FIGURA 5H

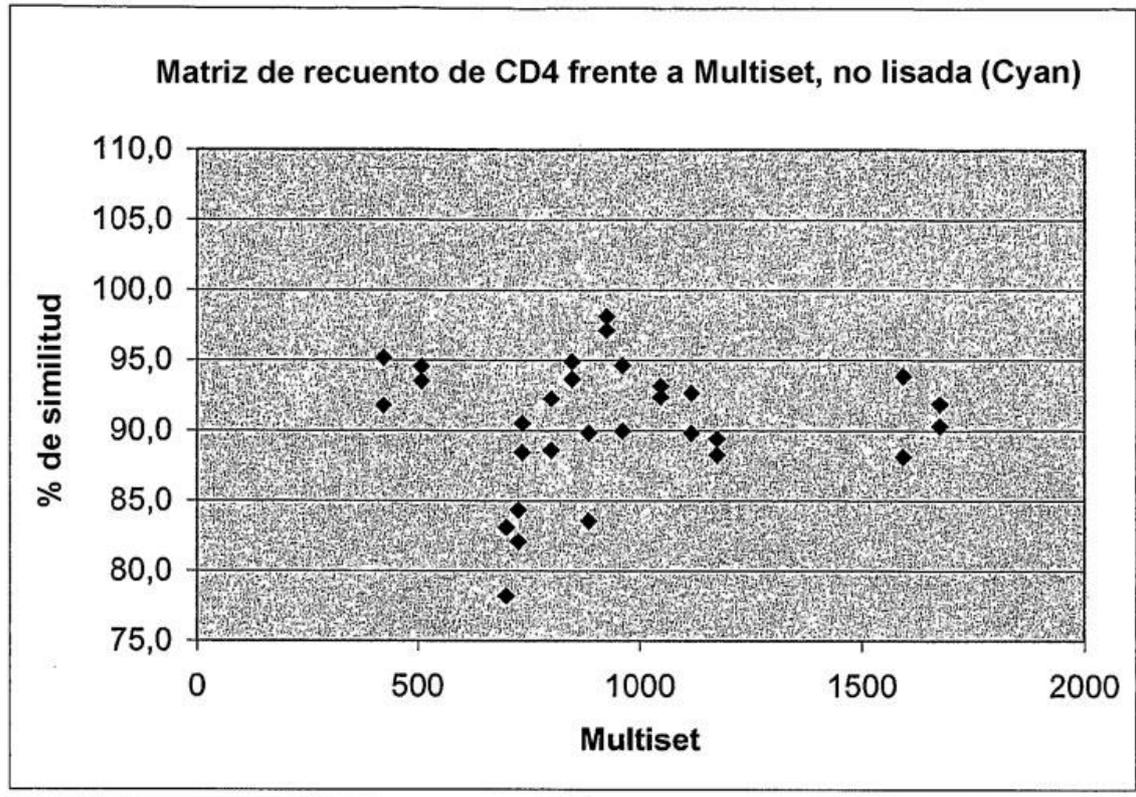


FIGURA 6A

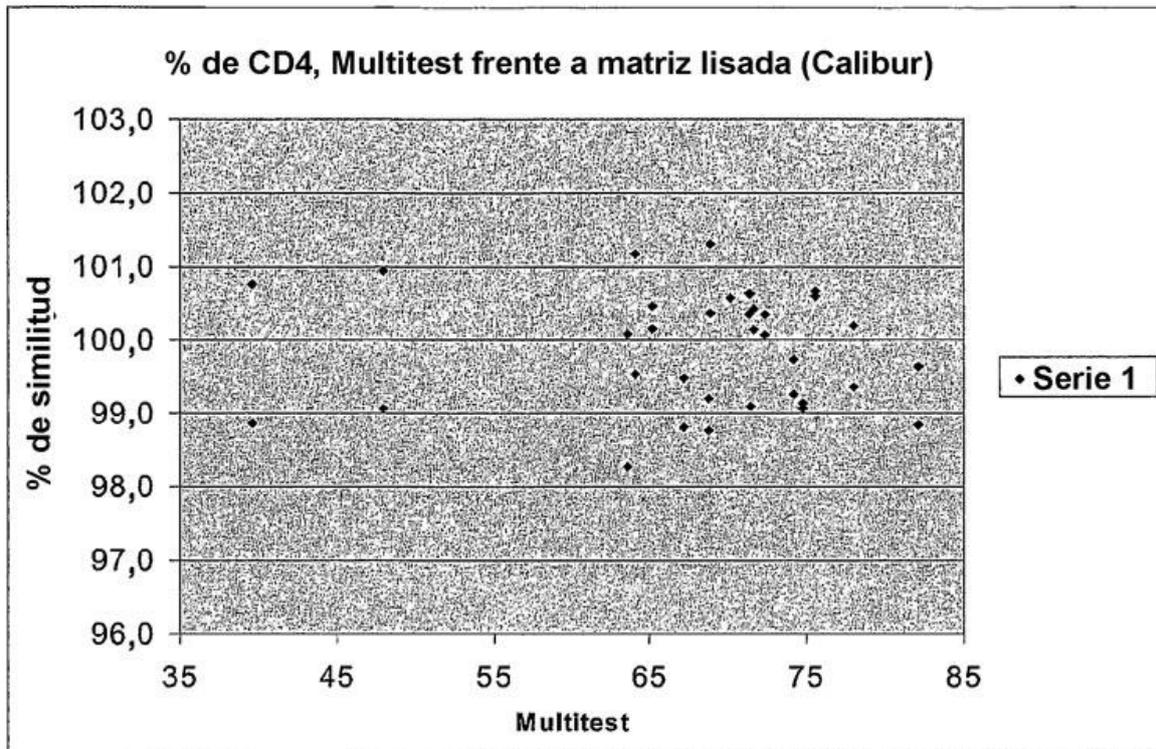


FIGURA 6B

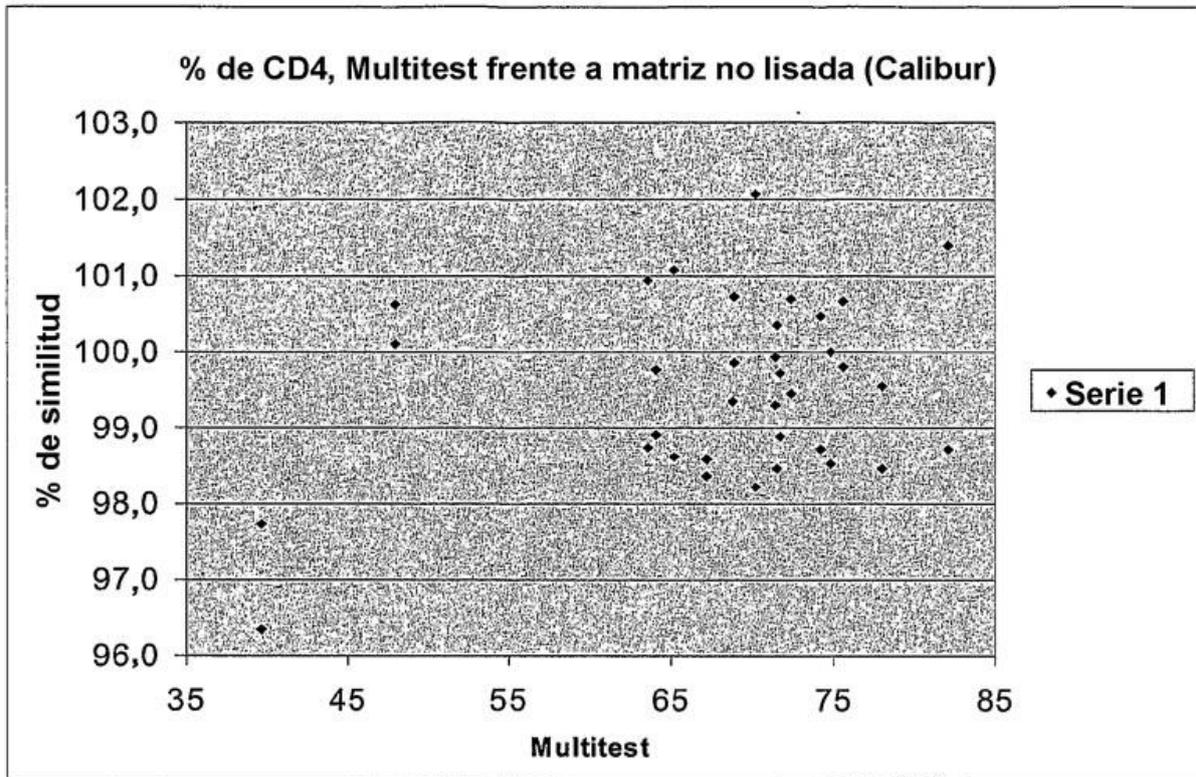


FIGURA 6C

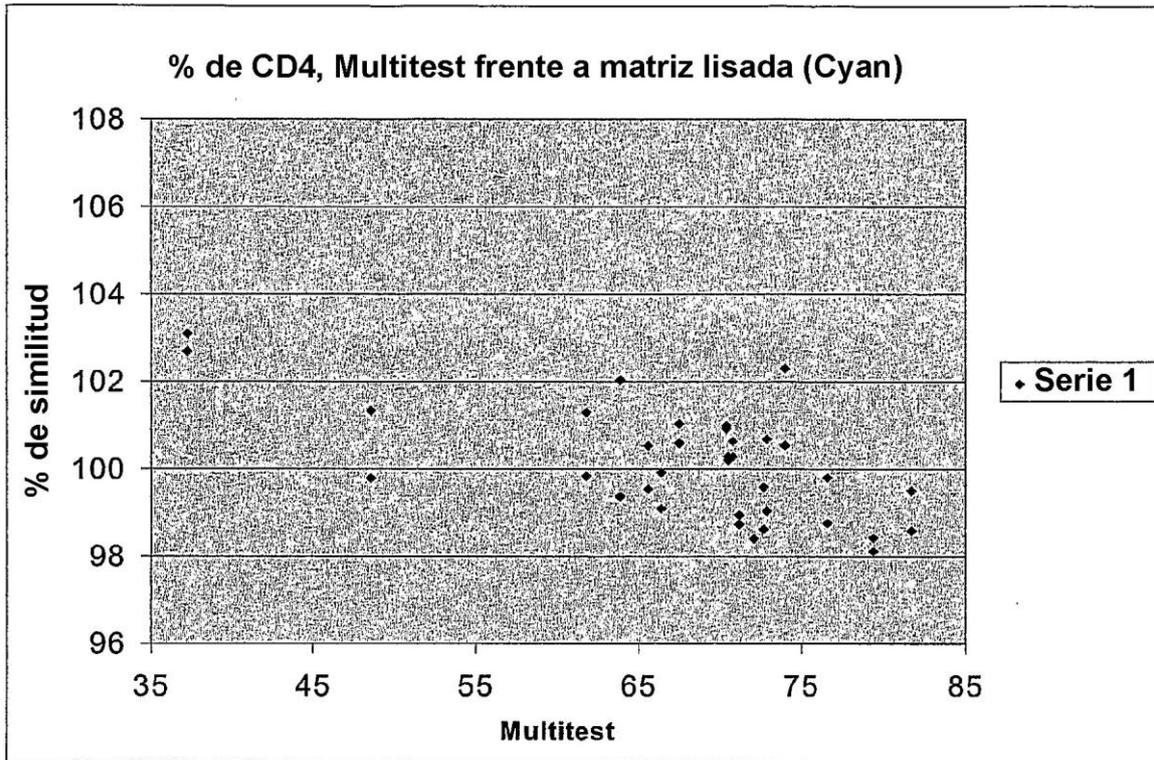


FIGURA 6D

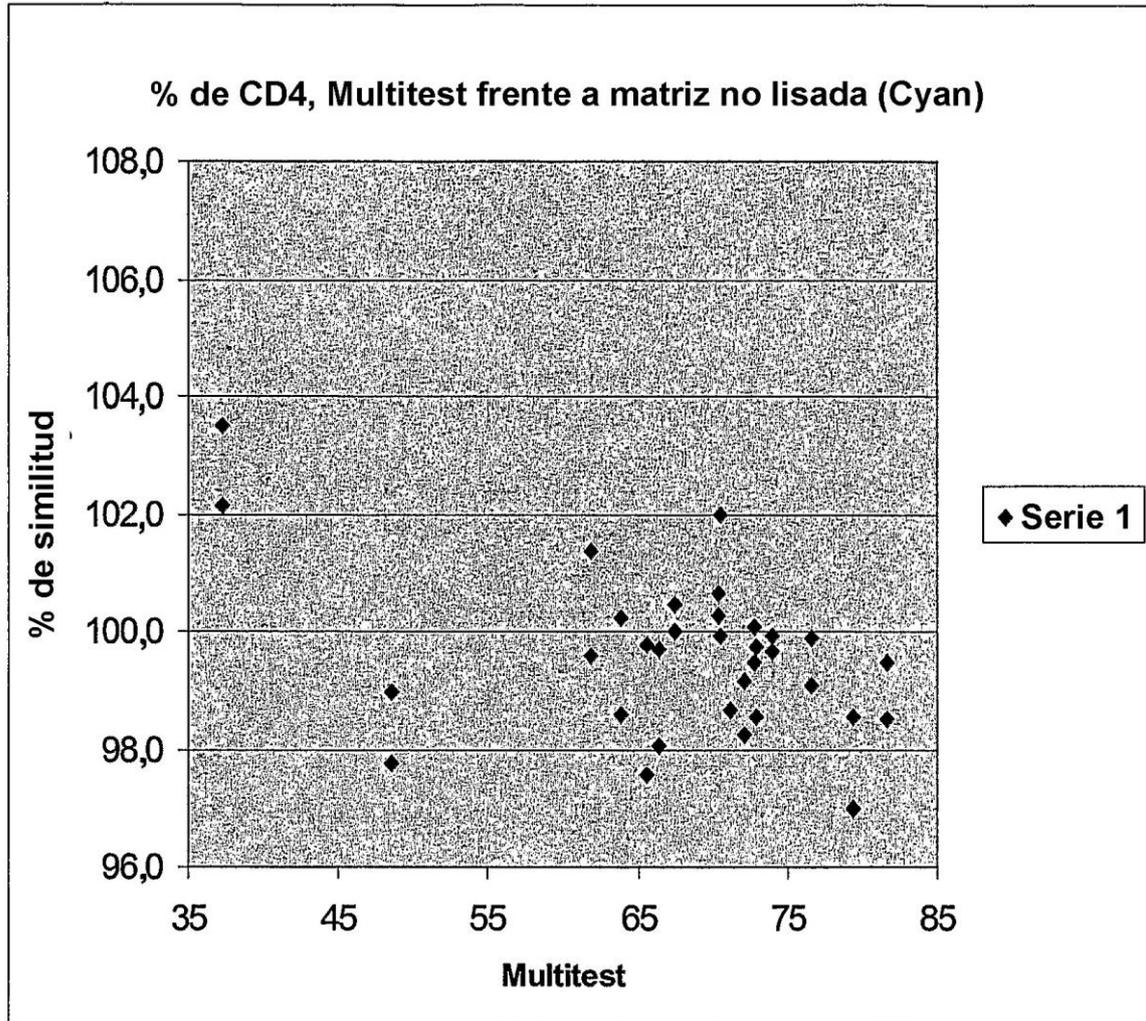


FIGURA 7

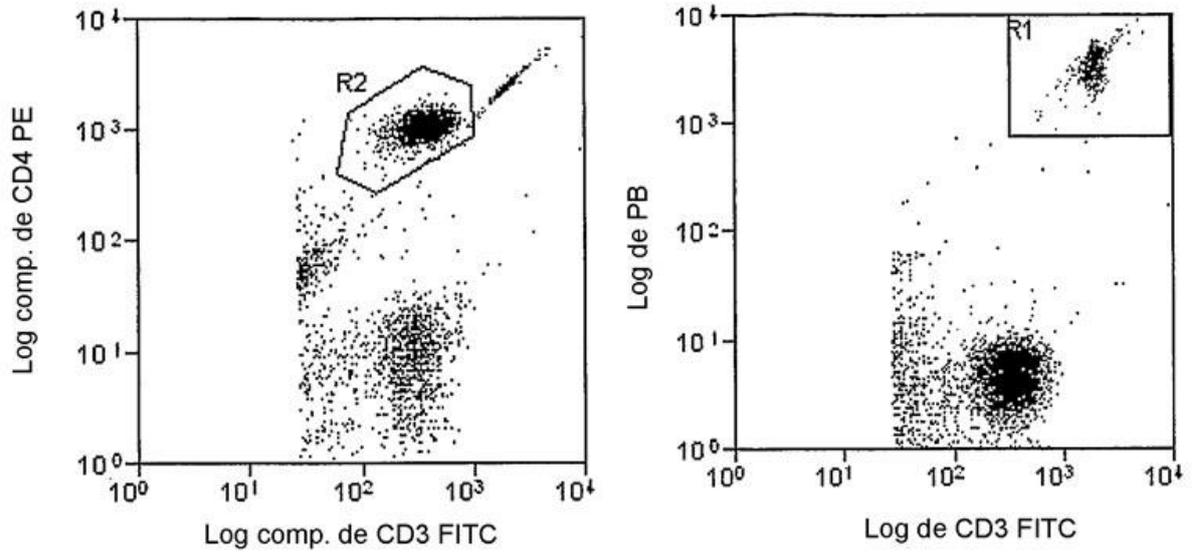


FIGURA 8

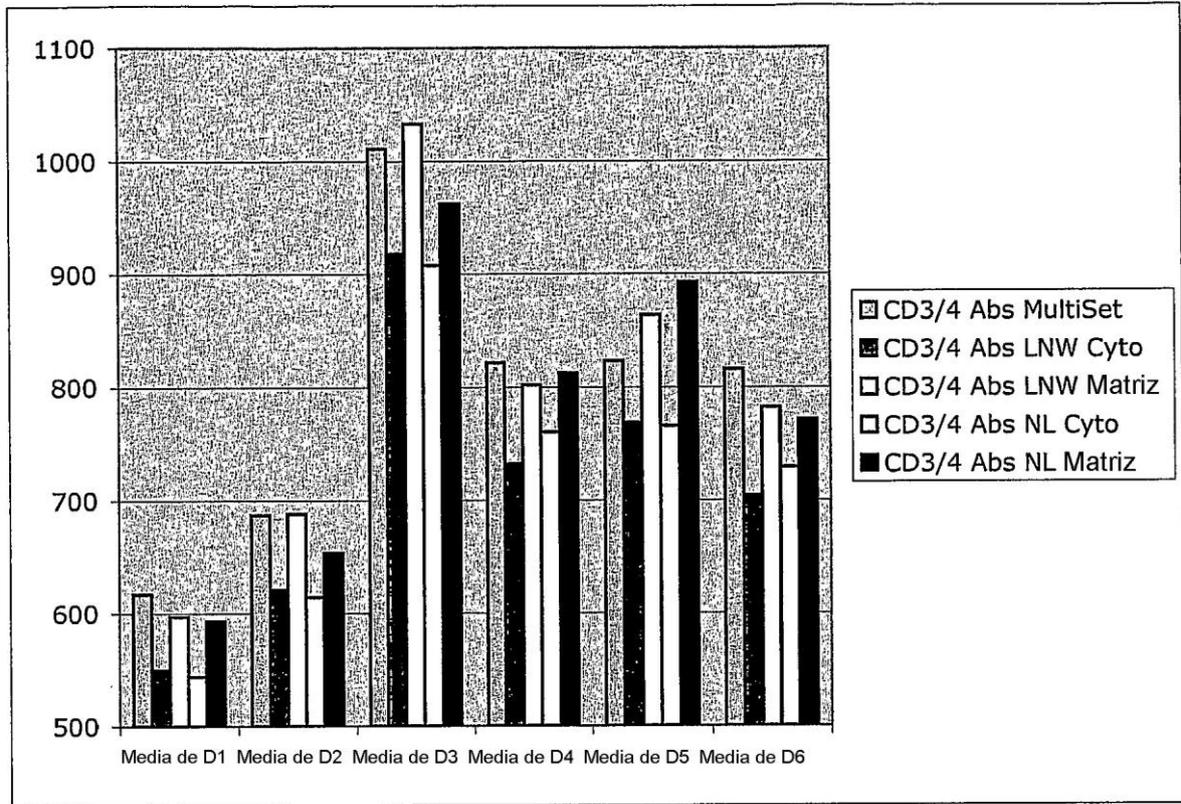


FIGURA 9

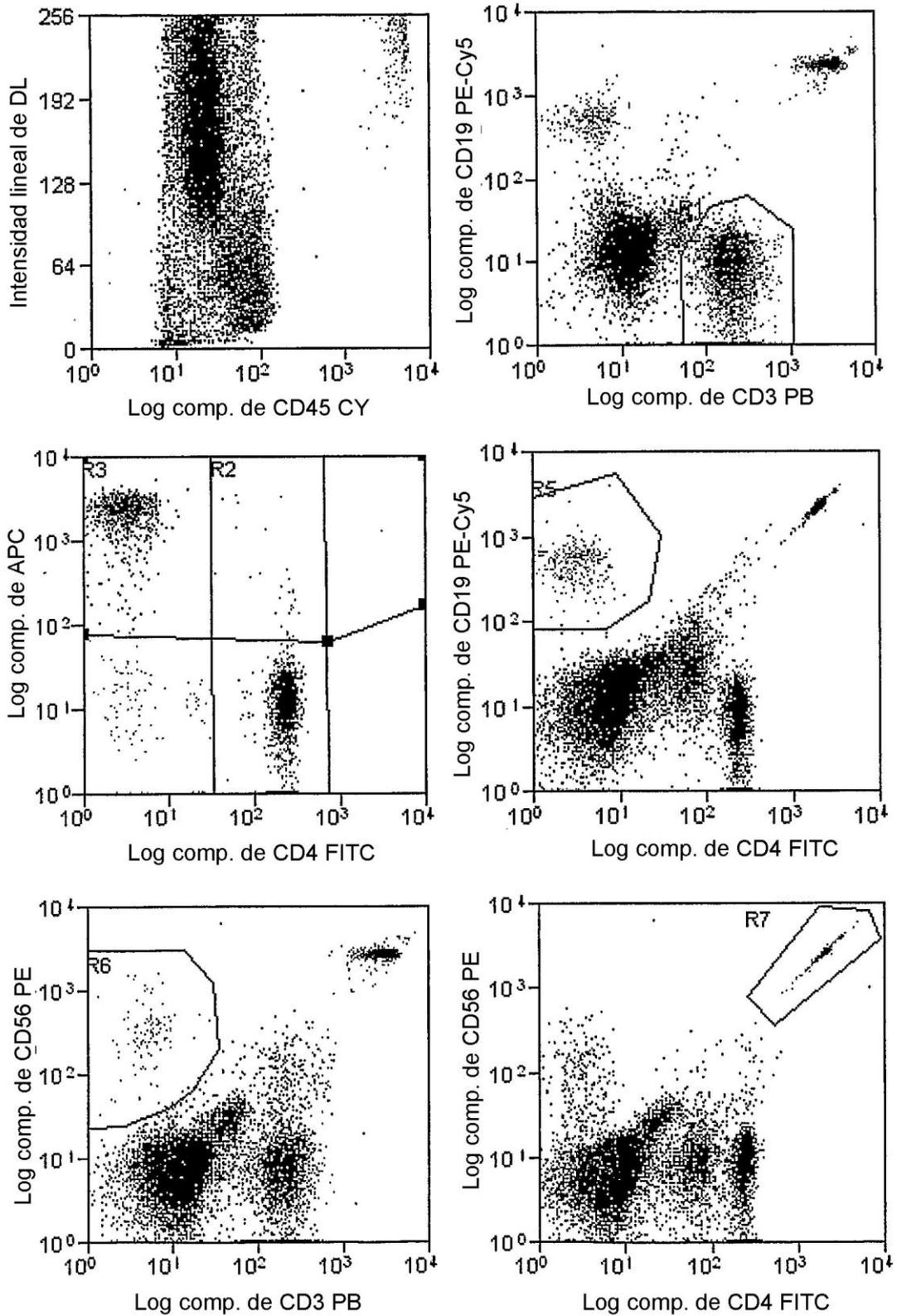


FIGURA 10

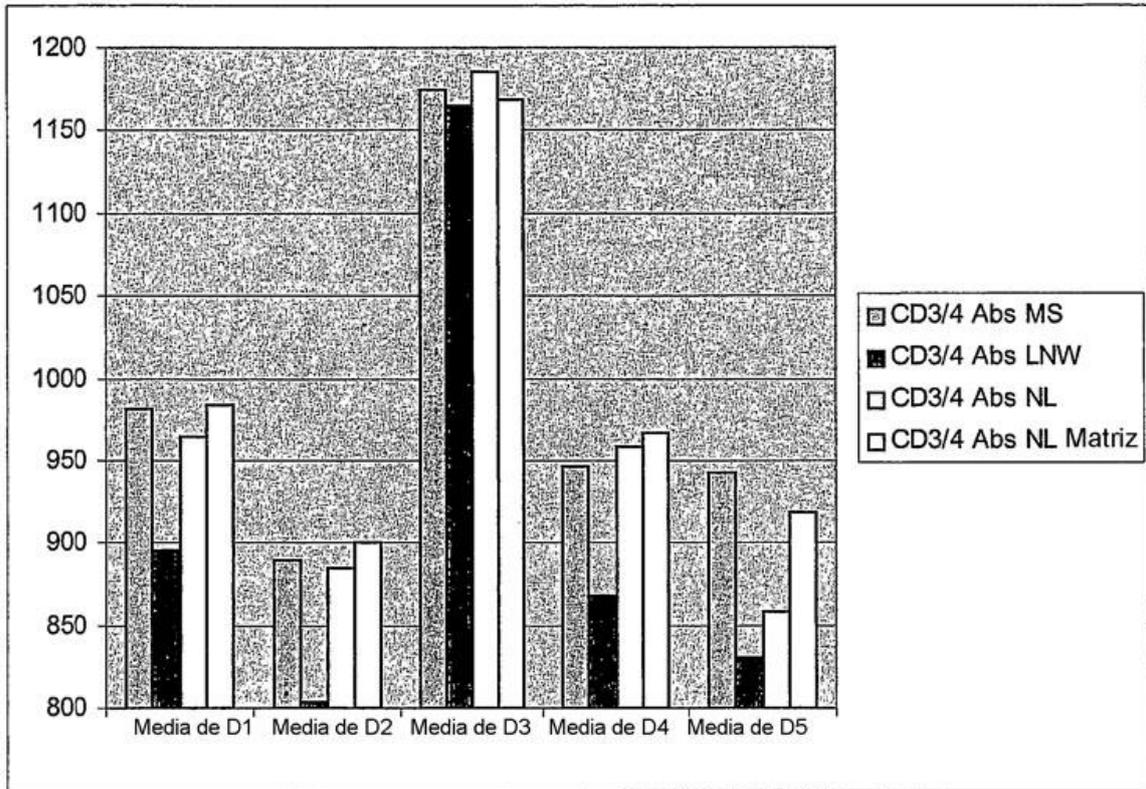


FIGURA 11A

Control

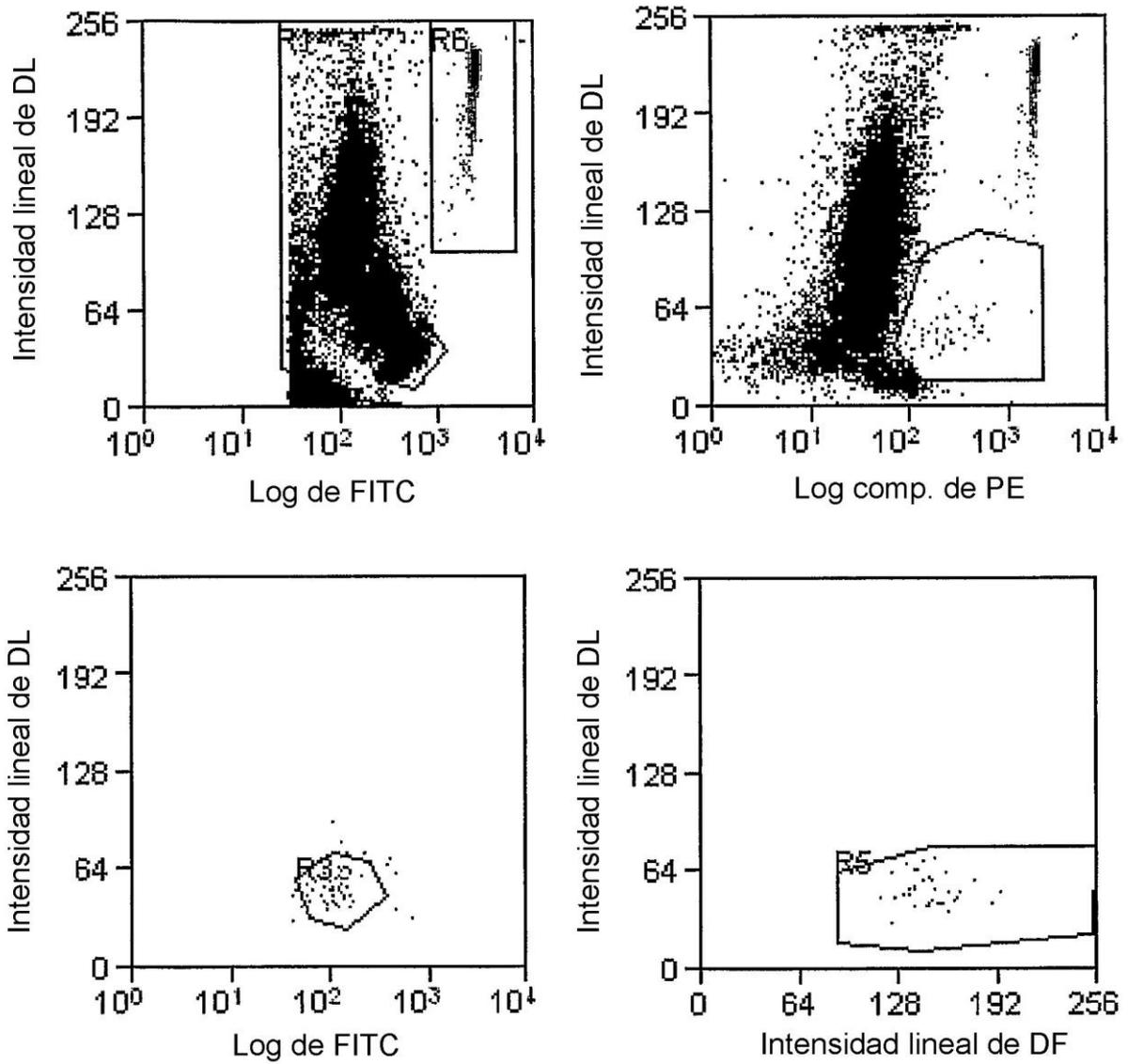


FIGURA 11B

Matriz

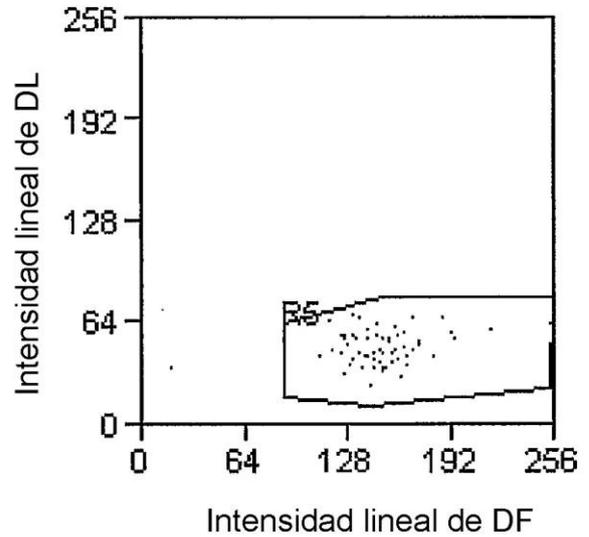
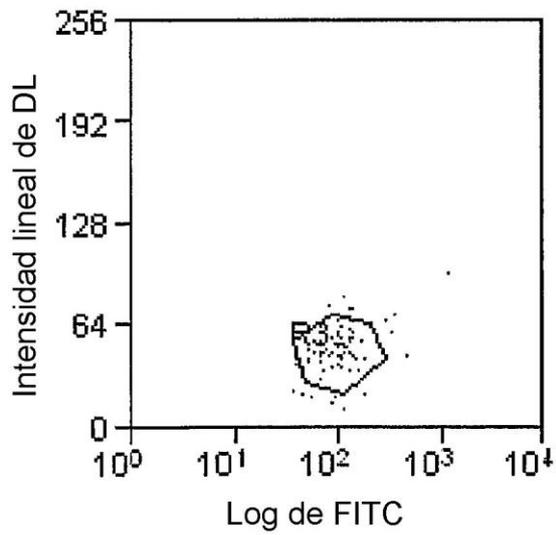
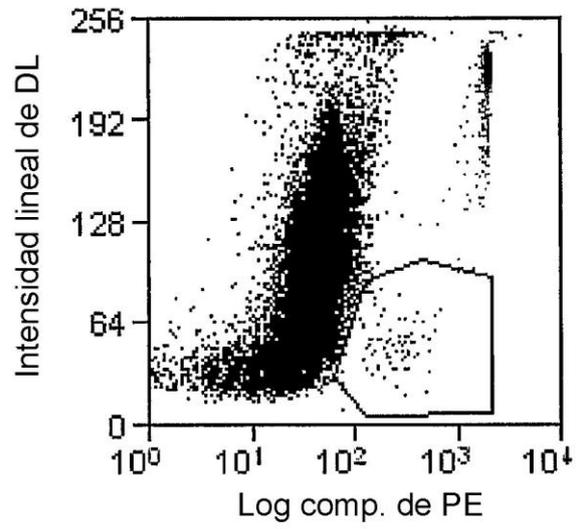
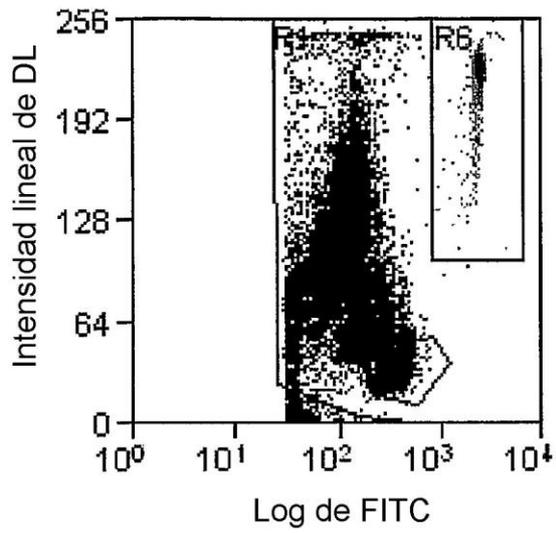


FIGURA 12A

Control

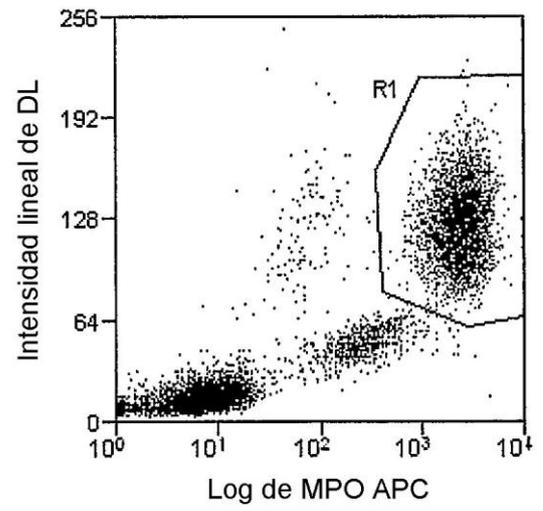
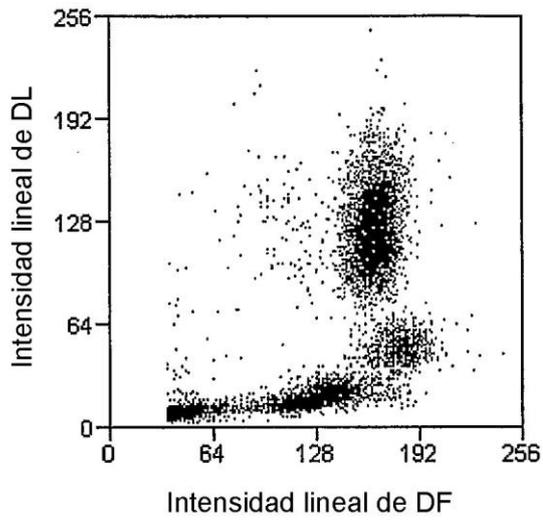


FIGURA 12B

Matriz

