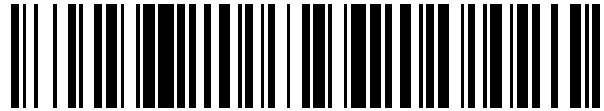


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 512**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2008 E 08781438 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2171444**

54 Título: **Procedimiento de análisis de glóbulos blancos**

30 Prioridad:

**05.07.2007 US 958382 P**

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

**26.05.2015**

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)  
One Becton Drive  
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**GOLDBERG, EDWARD**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 536 512 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**

Procedimiento de análisis de glóbulos blancos

**Antecedentes**

5 Los marcadores de superficie celular permiten la identificación de fenotipos característicos de estados tanto sanos como de enfermedad, por ejemplo Maecker y col., J. Clin. Immunol., 20: 391 - 399 (2000); Rothe y col., Leukemia, 10: 877 - 895 (1996); Reilly y col., J. Clin. Pathol., 54: 508 - 511 (2001). Dichos marcadores normalmente se miden mediante tinción de una muestra celular con una selección de anticuerpos marcados específicos de diferentes marcadores, seguido de análisis multiparamétricos mediante obtención de imágenes o mediante citometría de flujo, por ejemplo Stewart, Immunophenotyping (Wiley-Liss, 2000). Adicionalmente, J. Wang-Rodriguez y col., Transfusion 10 40(1):25 - 34 (2000) describen procedimientos para evaluar la modulación inmunitaria tras transfusiones de sangre alogénicas en lactantes. Las muestras de sangre se analizaron para determinar las subpoblaciones de linfocitos usando citometría de flujo tras tinción de fluorescencia doble. El documento WO2006/056061 describe procedimientos usando ligandos específicos de los linfocitos T no expuestos previamente, marcadores CD3, CD4, CD45RA, junto con ligandos específicos de CD31 para identificar, clasificar y purificar linfocitos T no expuestos 15 previamente. Cada uno de estos ligandos se marca con un colorante fluorescente distinto, en particular CD3 se marcan con PECy7 y CD45RA se marcan con PECy5. En el documento EP-A-317156 se describe la detección e identificación de diferentes linajes y estadios del desarrollo celular en una muestra de células hematopoyéticas usando dos tipos de anticuerpos monoclonales que están conjugados con diferentes fluorocromos que tienen distintos espectros de emisión. D.L. Morris y col., J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 37(1):37 - 46 (1997) describen inmunotipado de subpoblaciones de linfocitos de rata con los anticuerpos fluorescentes. P. Mikolajczak y col., Drug and Alcohol Dependence 60(3): 303 - 309 (2000) describen la medición del número absoluto y relativo de linfocitos en subpoblaciones específicas (CD3, CD4, CD8, NK, CD45RA) mediante citometría de flujo. J. Nicholson y col., Cytometry 26:227 - 230 (1996) divulgan el uso de anticuerpos CD45/CD3/CD4 marcados de forma diferente para 20 inmunofenotipado citométrico, que requiere una medición de la dispersión lateral. De un modo similar, Berrington, J. E. y col., Chem. Exp. Immunol. 140(2):289 - 292 divulgan la determinación de subpoblaciones de linfocitos usando anticuerpos marcados de forma diferente. Por último, a partir de K. Morikara y col., Scand. J. Immunol. 34(3): 273 - 283 (1991) se sabe que CD45RA se expresa en casi todos los linfocitos B. Los análisis multiparamétricos con anticuerpos marcados, o inmunofenotipado, han sido particularmente útiles para identificar distintas clases 25 funcionales y de desarrollo de glóbulos blancos, lo que tiene importantes aplicaciones en la clasificación de enfermedades relacionadas con la sangre, tales como leucemias y linfomas, y en el control del estado de individuos afectados por VIH. En la última aplicación, es particularmente deseable medir el número absoluto por unidad de volumen de sangre de linfocitos T colaboradores, así como el número relativo de dichas células entre los linfocitos totales. Estas mediciones mediante inmunofenotipado suponen un reto porque los marcadores de superficie celular característicos de estas células son compartidos en grados variables por los glóbulos blancos que no son linfocitos. 30 En consecuencia, la mayoría de los abordajes actuales para la identificación de poblaciones de linfocitos requiere la medición de al menos una propiedad celular, como la dispersión de luz frontal o lateral cuando se usa un sistema de flujo, además de mediciones basadas en los marcadores de superficie celular. Sería altamente ventajoso, en particular para aplicaciones en los puntos de cuidados de bajo coste, si se dispusiera de procedimientos y composiciones para analizar glóbulos blancos, en particular linfocitos, y sus respectivas subpoblaciones en base a 35 los marcadores de superficie celular.

**Sumario de la invención**

La invención proporciona procedimientos y composiciones para analizar glóbulos blancos. En el primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para enumerar los recuentos absolutos de linfocitos en una muestra de sangre, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

45 combinar dicha muestra con un primer compuesto de unión marcado con un colorante fluorescente específico de un marcador específico de linfocitos T que es CD2 o CD3 y un segundo compuesto de unión marcado con un colorante fluorescente específico de CD45RA en una mezcla, en el que dicho primer compuesto de unión y dicho segundo compuesto de unión están marcados con el mismo colorante fluorescente;

50 medir las señales de fluorescencia a partir de dichos compuestos de unión marcados con colorante fluorescente que se han unido a células en dicha muestra; y

en ausencia de una medición de la dispersión lateral, enumerando los linfocitos en dicha muestra. Los linfocitos en la muestra de sangre, combinados con dichos compuestos marcados forman una subpoblación distinguible en base a la cantidad de compuestos marcados que se unen específicamente a sus superficies, de modo que se permite la detección y enumeración de dichos linfocitos.

55 En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar el porcentaje de linfocitos T colaboradores en una muestra de sangre, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

combinar dicha muestra con un primer compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de un marcador específico de linfocitos T que es CD2 o CD3 y un segundo compuesto de unión marcado con colorante

fluorescente específico de CD45RA en una mezcla, en el que dicho primer compuesto de unión y dicho segundo compuesto de unión están marcados con un primer colorante fluorescente, y un tercer compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de CD4, en el que dicho tercer compuesto de unión está marcado con un colorante fluorescente que es distinto de dicho primer colorante fluorescente;

- 5 medir las señales de fluorescencia a partir de dichos compuestos de unión marcados con colorante fluorescente que se han unido a células en dicha muestra; enumerar los linfocitos en dicha muestra;

en ausencia de una medición de dispersión lateral, enumerar los linfocitos T colaboradores en dicha muestra y determinar el porcentaje de linfocitos T colaboradores en dicha muestra.

- 10 En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de un kit que comprende un primer compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de un marcador específico e linfocitos T que es CD2 o CD3 y un segundo compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de CD45RA, en el que dicho primer compuesto de unión y dicho segundo compuesto de unión están marcados con el mismo colorante fluorescente, para enumerar los recuentos absolutos de linfocitos en una muestra de sangre de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto anterior o para determinar el porcentaje de linfocitos T colaboradores en una muestra de sangre de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto anterior. La invención proporciona un procedimiento conveniente y eficaz para identificar linfocitos, para recuentos absolutos o en porcentaje de las mediciones de los glóbulos blancos, en una muestra de sangre únicamente en base a los marcadores de superficie, sin la necesidad de mediciones basadas en la dispersión de luz para distinguir los linfocitos de otros tipos de glóbulos blancos, tales como monocitos o granulocitos. La invención es particularmente adecuada para usar con dispositivos de identificación celular basada en imágenes para proporcionar mediciones del porcentaje de las poblaciones CD4+ en muestras de sangre entera.

**Breve descripción de las figuras**

- 25 Las Figs. 1A muestra un gráfico de dispersión de las intensidades del dispersador de luz lateral y las intensidades de fluorescencia de los glóbulos blancos marcados siendo un primer y un segundo compuesto de unión dos anticuerpos, uno con especificidad para CD45RA y una especificidad para CD3. Ambos anticuerpos están marcados con ficoeritrina (PE) y las mediciones se realizaron con un citómetro de flujo.

La Fig. 1B muestra un histograma de los recuentos frente a la intensidad de señal solo para los linfocitos de la Fig. 1A, en el que los picos de los histogramas solapantes corresponden a las líneas de identificación que conectan los picos con sus respectivos números de identificación 100, 102 y 104.

- 30 La Fig. 1C contiene una tabulación de los datos de recuentos correspondientes a los gráficos de las Figs. 1A y 1B.

La Fig. 2A contiene una tabulación de los datos de recuentos mostrados en el gráfico de la Fig. 2B.

- 35 La Fig. 2B muestra un gráfico de dispersión bidimensional de intensidades fluorescentes de glóbulos blancos marcados con tres compuestos de unión, siendo el primer compuesto de unión específico de CD4 y estando marcado con APC, y siendo el segundo y el tercer compuesto de unión dos anticuerpos, uno específico de CD45RA y uno específico de CD3, y estando ambos anticuerpos marcados con PE. Las mediciones se realizaron con un citómetro de flujo.

- 40 La Fig. 3A muestra un gráfico de dispersión bidimensional de intensidades fluorescentes de glóbulos blancos marcados con tres compuestos de unión, siendo el primer compuesto de unión específico de CD4 y estando marcado con PE, y siendo el segundo y el tercer compuesto de unión dos anticuerpos, uno específico de CD45RA y uno específico de CD3, y estando ambos anticuerpos marcados con APC. Las mediciones se realizaron con un microscopio de imágenes de bajo aumento.

La Fig. 3B contiene una tabulación de los datos mostrados en la Fig. 3A, así como los datos comparativos de un ensayo disponible comercialmente (TriTest) para los linfocitos CD4+.

**Descripción detallada de la invención**

- 45 La puesta en práctica de la presente invención puede usar, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), biología celular, tecnología de inmunoensayo, microscopía, análisis de imagen y química analítica, que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen el marcaje de células biológicas, la inmunotinción de células biológicas, la detección de señales fluorescentes, el análisis de imagen y la selección de fuentes de iluminación y componentes de detección de la señal óptica. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en los manuales estándar de laboratorios, tales como Robinson et al. (Editores) Current Protocols in Cytometry (John Wiley & Sons, 2007); Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, (ambos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Owens y col., (Editores), Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice: Quality Assurance for Quantitative Immunophenotyping (Wiley-Liss, 1994); Ormerod (Editor) Flow Cytometry: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); Coon, Diagnostic Flow Cytometry (Williams & Wilkins, 1991); Riley y col.,

Clinical Applications of Flow Cytometry (Igaku-Shoin Medical Publication, 1993); Stewart y Nicholson (Editores) Immunophenotyping (Wiley-Liss, 2000); Murphy, Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging (Wiley-Liss, 2001); Shapiro, Practical Flow Cytometry, Cuarta Edición (Wiley-Liss, 2003); y Herman y col., Fluorescence Microscopy, 2ª Edición (Springer, 1998).

5 Se divulga una composición de tinción celular que comprende una mezcla de al menos dos compuestos de unión  
 marcados, no específico de CD45RA y uno específico de un marcador de superficie celular común a los linfocitos T,  
 preferentemente un marcador específico de linfocitos T, tales como CD2 o CD3. Las proporciones relativas de cada  
 compuesto de unión en la composición puede variar ampliamente y dependen de factores bien conocidos por los  
 10 expertos en la técnica, incluyendo el número esperado de marcadores en cada tipo celular, la especificidad de los  
 compuestos de unión para los marcadores, la estabilidad de los conjugados marcador-compuesto de unión y la  
 naturaleza del marcador usado. Los compuestos de unión marcados usados con la invención están disponibles  
 fácilmente de fuentes comerciales o mediante ensamblaje usando técnicas convencionales, tales como las  
 divulgadas en las referencias anteriores. Preferentemente, los compuestos de unión usados en la invención están  
 15 marcados con moléculas que son capaces de generar una señal óptica. Preferentemente, la señal óptica es una  
 señal fluorescente generada por una o más moléculas colorantes fluorescentes unidas a un compuesto de unión.

Un procedimiento de la invención se puede implementar mediante, o incluir, las etapas siguientes: (a) combinar en  
 condiciones de unión del compuesto de unión una muestra de sangre con al menos un primer compuesto de unión  
 específico de al menos los linfocitos T y un segundo compuesto de unión distinto del primer compuesto de unión, en  
 el que el segundo compuesto de unión es específico de moléculas CD45RA, siendo el primer y el segundo  
 20 compuestos de unión capaces de generar una primera señal óptica; (b) medir la primera señal óptica generada por  
 el primero y el segundo compuestos de unión sobre las células en la muestra; y (c) determinar los linfocitos en la  
 muestra mediante los valores de la primera señal óptica a partir del primero y segundo compuestos de unión. De  
 acuerdo con el procedimiento, los linfocitos corresponderán a las células con los valores de señal altos. Como se  
 usa en el presente documento, "condiciones de unión del compuesto de unión" significa las condiciones de reacción  
 25 que permiten, y preferentemente maximizan, la unión específica de los compuestos de unión a sus respectivas  
 moléculas diana. Dichas condiciones incluyen condiciones tanto físicas como químicas, tales como pH, sal y  
 temperatura. Las condiciones químicas se pueden controlar mediante el uso de tampones, por ejemplo tampón  
 fosfato, y agentes quelantes. Preferentemente, los compuestos de unión son anticuerpos monoclonales, por lo que  
 las condiciones para maximizar la especificidad son bien conocidas por los expertos en la técnica.

30 Los compuestos de unión se combinan con una muestra usando técnicas convencionales. Normalmente, los  
 compuestos de unión se combinan en condiciones de unión al anticuerpo en un vaso de reacción, que puede ser un  
 tubo de ensayo convencional o un pocillo de microtitulación, tras lo cual se le deja incubar durante un tiempo  
 suficiente para permitir la formación de complejos estables entre los compuestos de unión y sus moléculas diana  
 respectivas, si están presentes. La selección de volúmenes, los tipos de tampón y las concentraciones y otros  
 35 ingredientes de reacción son bien conocidos por los expertos en la técnica, como se ilustra en las referencias  
 anteriores. Una muestra analizada mediante el procedimiento de la invención puede ser cualquier muestra de sangre  
 que contenga linfocitos, incluyendo, por ejemplo, sangre entera, sangre entera que se ha procesado para eliminar  
 componentes, aislado glóbulos blancos y fluidos linfáticos. Preferentemente, la muestra usada es sangre entera; es  
 decir, sangre retirada de un organismo o paciente individual sin procesamiento o tratamiento previo al análisis. Las  
 40 guías para realizar mediciones con muestras de sangre entera se proporcionan en las siguientes referencias  
 ilustrativas, patentes de EE.UU. 4.882.284; 5.627.037; 6.951.727 y 4.727.020.

En algunas realizaciones en las que se está analizando sangre entera se puede incluir una etapa opcional para  
 retirar o eliminar los glóbulos rojos de una muestra con objeto de eliminar o reducir su interferencia en la detección  
 de glóbulos blancos. En una realización, dicha eliminación se consigue lisando los glóbulos rojos de la muestra. La  
 45 persistencia de los eritrocitos en la muestra de sangre entera después de la etapa de tinción puede complicar los  
 esfuerzos posteriores para medir el fluoróforo unido específicamente a las células nucleadas de la muestra. Por  
 tanto, en dichas circunstancias, los procedimientos de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, después de  
 la etapa de incubación con el anticuerpo y antes de la adquisición de datos mediante citometría de flujo, una etapa  
 adicional de lisar los eritrocitos en la muestra. En la técnica se conocen una serie de agentes que sirven de forma  
 50 simultánea para lisar glóbulos rojos y fijar las células nucleadas en una muestra de sangre entera, sin interferir con la  
 unión del anticuerpo a las células nucleadas. Estos agentes se describen en, entre otros, las patentes de EE.UU. N°  
 4.654.312; 4.902.613; 5.510.267; 5.516.695; 5.648.225 y el documento EP-A-161770. Varios de estos agentes están  
 disponibles comercialmente, incluyendo la solución de lisado para FACS™ (Becton Dickinson Immunocytometry  
 Systems, San Jose, Calif., N° de catálogo 349202) y Whole Blood Lysing Solution (Caltag Laboratories, Inc.,  
 55 Burlingame, Calif., N° de catálogo GAS-10). La duración mínima de la incubación con el reactivo de lisis depende de  
 si, después de la lisis, se pueden eliminar los residuos mediante centrifugación.

#### Marcadores

Los marcadores ópticos usados con la invención pueden incluir la unión directa o indirecta de restos fluorescentes,  
 restos colorimétricos y restos quimioluminiscentes a los compuestos de unión. Las revisiones de metodologías de  
 60 marcaje que proporcionan guías para la selección y fijación de marcadores a compuestos de unión incluyen  
 Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Novena Edición (Molecular Probes, Inc.,

Eugene, 2002); Keller y Manak, DNA Probes, 2ª Edición (Stockton Press, New York, 1993) y Hermanson, Bioconjugate Techniques (Academic Press, New York, 1996). Colorantes concretos aplicables a la invención se divulgan en la siguiente muestra de referencias: Menchen y col., patente de EE.UU. 5.188.934 (colorantes de 4,7-diclorofluoresceína); Begot y col., patente de EE.UU. 5.366.860 (colorantes de rodamina de resolución espectral);  
 5 Lee y col., patente de EE.UU. 5.847.162 (colorantes de 4,7-diclororodamina); Khanna y col., patente de EE.UU. 4.318.846 (colorantes de fluoresceína sustituidos con éter); Lee y col., patente de EE.UU. 5.800.996 (colorantes de transferencia de energía); Lee y col., patente de EE.UU. 5.066.580 (colorantes de xanteno) y Mathies et al. patente de EE.UU. 5.688.648 (colorantes de transferencia de energía). El marcaje también se puede realizar con puntos  
 10 cuánticos, como los divulgados en las siguientes patentes y publicaciones de patentes: 6.322.901; 6.576.291; 6.423.551; 6.251.303; 6.319.426; 6.426.513; 6.444.143; 5.990.479; 6.207.392; 2002/0045045 y 2003/0017264. Como se usa en el presente documento, la expresión "resto generador de señal fluorescente" significa un medio de  
 15 señalización que transporta la información a través de las propiedades de absorción fluorescente y/o emisión de una o más moléculas. Dichas propiedades fluorescentes incluyen intensidad de fluorescencia, periodo de vida de la fluorescencia, características del espectro de emisión y transferencia de energía. En un aspecto, los marcadores ópticos de la invención son restos generadores de señal fluorescente.

Otros fluoróforos incluyen, entre otros, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 647, BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY  
 20 TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, Cascade Blue, Cascade Yellow, Dansyl, lisamina rodamina B, Marina Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 514, Pacific Blue, rodamina 6G, verde rodamina, rojo rodamina, tetrametilrodamina, Texas Red (disponible en Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EE.UU.), y Cy2, Cy3.5, Cy5.5, y Cy7 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ EE.UU. y otros).

También se pueden usar fluoróforos en tándem de transferencia de energía respondedora a fluorescencia (FRET), tales como PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, PE-Rojo Texas y APC-Cy7; también colorantes PE-Alexa  
 25 (610, 647, 680) y colorantes APC-Alexa. PerCP se describe en la patente de EE.UU. 4.876.190. Los fluoróforos en tándem de transferencia de energía ("fluoróforos en tándem", "colorantes en tándem", "tinciones tricolor" han ampliado recientemente las elecciones del fluoróforo disponible para análisis de citometría de flujo de un láser o de múltiples colores. La tinción en tándem con PE-CY5 demuestra ser particularmente adecuada para el análisis  
 30 tricolor. El resto R-PE, excitado por la luz de 488 nm de un láser de ion argón, sirve como donante de energía, y CY5 actuando como aceptor de energía, brilla a 670 nm, fácilmente distinguible de la emisión de FITC y PE. Los fluoróforos de cianuro se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.268.486; 4.337.063; 4.404.289; 4.405.711; y en Mujumdar y col., Bioconj. Chem. 4:105 - 111 (1993); Southwick y col., Cytometry 11:418 - 430 (1990); Ernst y col., Cytometry 10:3 - 10 (1989); y Mujumdar y col., Cytometry 10:11 - 19 (1989), y fluoróforos en tándem de transferencia  
 35 de resonancia de energía con cianina se describen en, entre otros, la patente de EE.UU. N° 5.714.386 y en Waggoner y col., Ann. NY Acad Sci. 677:185 - 193 (1993) y Lansdorp y col., Cytometry 12:723 - 30 (1991).

#### Detección y enumeración de células marcadas

Después teñir las células en una muestra con los compuestos de unión se pueden medir las señales ópticas, especialmente las señales fluorescentes, mediante diversos instrumentos convencionales, en particular  
 40 microscopios y citómetros de flujo. La determinación de los números absolutos o relativos de los linfocitos o una subpoblación de linfocitos en una muestra se puede realizar identificando un subconjunto de datos que forma un grupo distinguible dentro de la totalidad de los datos. La identificación de grupos claros en los datos univariados o multivariados es bien conocida por los expertos en la técnica, en particular para los datos adquiridos a partir de mediciones usando un citómetro de flujo, como se ilustran mediante las referencias siguientes: Bagwell y col., J. Histochem. Cytochem., 27: 293 - 296 (1979); Young, J. Histochem. Cytochem., 25: 935 - 941 (1977); Cox y col.,  
 45 Cytometry, 9: 291 - 298 (1988); Roederer y col., Cytometry, 45: 37 - 41 (2001); y Roederer y col., Cytometry, 45: 47 - 55 (2001). Normalmente, la enumeración de los tipos celulares usando citómetros de flujo o microscopios automáticos incluye establecer parámetros de acotamiento, por ejemplo valores superiores e inferiores de la señal de los uno o más marcadores ópticos usados, que son característicos de los tipos de células de interés. Después, el instrumento tabula automáticamente los tipos de células correspondientes a los parámetros seleccionados.

Las guías para el uso de un citómetro de flujo para implementar los procedimientos de la invención se proporcionan en las referencias siguientes: Flow Cytometry: A Practical Approach, 2ª edición., M. G. Ormerod (ed.), Oxford University Press, 1997; Handbook of Flow Cytometry Methods, J. Paul Robinson (ed.), John Wiley & Sons (1993); Current Protocols in Cytometry, J. Paul Robinson (ed.), John Wiley & Sons (October 1997, con actualizaciones  
 50 periódicas); Becton Dickinson Cytometry Source Book, Becton Dickinson Immunocytometry Systems (1998, con actualizaciones periódicas)(San Jose, Calif.).

Microscopios de ejemplo para análisis basados en los portaobjetos de las muestras incluyen un iCyte™ Automated Imaging Cytometer (CompuCyte Corp., Cambridge, MA) (por ejemplo, Kamensky y col., Cytometry, 12A: 381 (1991)); un microscopio Axioplan 2 MOT (Carl Zeiss, Goettingen, Alemania), por ejemplo equipado con una lámpara de mercurio de 100 W, cámara de 12 bit Axiocam CCD y un mostrador de objetos motorizado y un cambiador de  
 60 filtros.

Kits para poner en práctica procedimientos de la invención

En la comercialización de los procedimientos descritos en el presente documento, determinados kits para la detección de tipos celulares específicos usando compuestos de unión marcados serán particularmente útiles. Dicho kit de ensayo comprende normalmente uno o más reactivos, tales como uno o más compuestos de unión marcados, empaquetados en un envase, tal como, sin limitaciones, un vial, tubo o frasco, en un envase adecuado para distribución comercial, tal como, sin limitaciones, una caja, una bolsa sellada, un paquete de tipo blíster y un cartón. En particular, los kits se divulgan para identificar y contra linfocitos en sangre entera, en el que los kits comprenden un primer compuesto de unión específico para CD45RA y un segundo compuesto de unión específico de un marcador de superficie celular habitual para los linfocitos T, en los que los compuestos de unión primero y segundo tienen el mismo marcador. El marcador de la superficie celular frecuente en los linfocitos T es un marcador específico de linfocitos T, tal como CD2 o CD3. Preferentemente, los compuestos de unión primero y segundo se marcan con un colorante fluorescente, tal como un colorante fluorescente seleccionado de los indicados anteriormente. En una realización concreta de la invención, los compuestos de unión se marcan preferentemente con un colorante fluorescente seleccionado del grupo que consiste en ficoeritrina (PE), proteína peridina clorofila Cy5.5 (PerCP-Cy5.5), PE-Cy7, alofocianina (APC), Alexa Fluor 647, Cy5, APC-Cy5.5, APC-Cy7 o APC-Alexa Fluor 750. Más preferentemente, dicho grupo consiste en ficoeritrina (PE), proteína peridina clorofila Cy5.5 (PerCP-Cy5.5), PE-Cy7, alofocianina (APC), APC-Cy5.5 o APC-Cy7.

Los kits son divulgados para determinar el porcentaje de uno o más tipos dentro de una muestra de glóbulos blancos, por ejemplo contenidos en una muestra de sangre entera. En una realización, dichos kits comprenden (i) un primero y un segundo compuesto de unión como se ha descrito anteriormente, (ii) un tercer compuesto de unión específico de un marcador específico de monocitos, tales como CD14, en el que una porción de dicho tercer compuesto de unión se marca con el mismo marcador óptico como el primero y el segundo compuesto de unión (un primer marcador óptico) y marcándose el resto con un marcador óptico distinto (un segundo marcador óptico) y (iii) un cuarto compuesto de unión específico de un marcador específico de granulocitos, tal como CD15, en el que dicho cuarto compuesto de unión se marca con el segundo marcador óptico. En otra realización, los terceros compuestos de unión se marcan con un marcador óptico (un tercer marcador óptico) distinto de los marcadores ópticos primero y segundo. Esta última realización puede ser útil para distinguir mejor las tres poblaciones de glóbulos blancos, por ejemplo como puede ser necesario para algunas elecciones de procedimientos de detección, marcadores ópticos y compuestos de unión. En una realización el primero, segundo y/o tercer marcador óptico son marcadores fluorescentes. Para el kit anterior, preferentemente, un primer marcador óptico es PerCP y un segundo marcador óptico es APC. En el último kit, preferentemente, un primer marcador óptico es PerCP, un segundo marcador óptico es APC y un tercer marcador óptico es PE-Cy5.5. En otras realizaciones, dichos marcadores ópticos pueden intercambiarse entre los respectivos compuestos de unión para formas adicionales de las composiciones y kits.

Los constituyentes de los kits se pueden envasar juntos o por separado y cada constituyente puede presentarse en uno o más tubos o viales, o en forma de cartucho, según sea adecuado. Los constituyentes, de forma independiente o juntos, se pueden envasar en cualquier estado útil, incluyendo, sin limitaciones, en un estado deshidratado, liofilizado, gasificado o acuoso. Los kits pueden estar en forma de un cartucho desechable que tiene los compuestos de unión incorporados en cámaras de reacción adecuadas como reactivos desecados. En particular, dichos reactivos desecados se pueden incorporar como películas y/o recubrimientos dentro de dicho cartucho.

**Ejemplos**

Se prepararon varios ejemplos de los compuestos de unión marcados y se analizaron en muestras de sangre entera de individuos normales. Se usaron reactivos disponibles comercialmente (por ejemplo, BD Biosciences, San Jose, CA) y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A menos que se indique lo contrario, se realizaron mediciones de la intensidad fluorescente y de la dispersión en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA). Se combinaron 50 µl de sangre entera con 20 µl del anticuerpo anti-CD45RA marcado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA), 20 µl del anticuerpo anti-CD3 marcado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA), 5 µl del anticuerpo anti-CD16 marcado con PE-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA), 5 µl del anticuerpo anti-CD56 marcado con APC (BD Biosciences, San Jose, CA) y 20 µl del anticuerpo anti-CD20 marcado con PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, San Jose, CA), tras lo cual se realizaron las mediciones de la dispersión lateral y de la fluorescencia de PE con un citómetro de flujo FACSCanto. Las porciones de los datos resultantes de las mediciones se muestran en la Fig. 1A. El recuadro (106) indica un grupo correspondiente a linfocitos. La Fig. 1B muestra los datos de linfocitos en recuentos frente al histograma de fluorescencia de PE en el que se indican las subpoblaciones en los linfocitos totales (100) de linfocitos (102 para CD16+ o CD56+ y 104 para CD20+). Las células de dispersión alta y fluorescencia de PE baja (108) corresponden a componentes no linfocitarios de los glóbulos blancos, tales como granulocitos y monocitos. La Fig. 1C es una tabla que proporciona los datos de los recuentos correspondientes a las Figs. 1A y 1B.

En otro experimento, se combinaron 50 µl de sangre entera con 20 µl del anticuerpo anti-CD45RA marcado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA), 20 µl del anticuerpo anti-CD3 marcado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, San Jose, CA), 5 µl del anticuerpo anti-CD4 marcado con APC (BD Biosciences, San Jose, CA), tras lo cual se realizaron las mediciones de la fluorescencia de APC y PE con un citómetro de flujo FACSCanto. Como se muestra en la Fig. 2B se producen grupos claramente distinguibles de datos de fluorescencia correspondientes a

linfocitos o a su subpoblación. Los linfocitos corresponden a una fluorescencia de PE elevada en la región (200) que es distinguible de las células con valores bajos de fluorescencia de PE (por ejemplo, los grupos 206 y 208). Entre los linfocitos (200), los linfocitos CD4+ se muestran en el grupo de fluorescencia de APC alta PE alta (202), mientras que los linfocitos no CD4+ se muestran en un grupo de fluorescencia de APC baja PE alta claramente distinguible.

5 Grupos separados de fluorescencia de PE baja APC alta (206) y de fluorescencia APC baja PE baja (208) corresponden a monocitos y granulocitos, respectivamente.

En otro experimento, se combinaron 50  $\mu$ l de sangre entera con 20  $\mu$ l del anticuerpo anti-CD45RA marcado con APC (BD Biosciences, San Jose, CA), 20  $\mu$ l del anticuerpo anti-CD3 marcado con APC (PE)(BD Biosciences, San Jose, CA), 5  $\mu$ l del anticuerpo anti-CD4 marcado con PE (BD Biosciences, San Jose, CA), tras lo cual se realizaron las mediciones de la fluorescencia de APC y PE con un microscopio de imagen a bajo aumento. Los datos de imagen se recogieron de las células teñidas dispuestas sobre un portaobjetos con una cámara CCD. Los datos de imagen tanto de la fluorescencia de PE como de la fluorescencia de APC se recogieron de modo que se recolectaran los valores de intensidad de PE y APC para cada célula en un campo definido del portaobjetos. Un gráfico de la dispersión de dichos datos se muestra en la Fig. 3A, en el que el grupo de datos en la región (300) corresponde a linfocitos CD4+ y el grupo de datos en la región (302) corresponde a linfocitos no CD4+. La Fig. 3B es una tabulación de los recuentos de los tipos celulares indicados en base a las mediciones de imagen y los recuentos usando un ensayo de tinción disponible comercialmente (TriTest, BD Biosciences, San Jose, CA) realizando las mediciones de la fluorescencia usando un citómetro de flujo.

En un experimento adicional, el compuesto de unión era un anticuerpo anti-CD45RA marcado con FITC y los componentes de un kit disponible comercialmente (TriTest CD3/4/45) que contiene anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, y anti-CD45 marcados con PE. Se combinaron 50  $\mu$ l de sangre entera con 20  $\mu$ l de un cóctel de tinción (TriTest solo) o 25  $\mu$ l del cóctel de tinción (reactivo TriTest más tinción de CD45RA) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual se añadieron 450  $\mu$ l de agente de lisado de glóbulos rojos (FACSLyse, BD Biosciences, San Jose, CA). Tras 15 minutos adicionales de incubación, la muestra resultante se analizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur. Como con los ejemplos anteriores, los gráficos de dispersión de la fluorescencia de PE frente a la fluorescencia de FITC muestran que los grupos de linfocitos son claramente distinguibles de otras células y que el grupo de linfocitos CD4+ es claramente distinguible de los linfocitos no CD4+.

### Definiciones

En general, los términos usados en el presente documento no definidos de otro modo específicamente tienen significados correspondientes a su uso convencional en los campos relacionados con la invención, incluyendo química analítica, bioquímica, biología molecular, biología celular, microscopía y análisis de imágenes, tal como se representa en los siguientes tratados: Alberts y col., *Molecular Biology of the Cell*, Cuarta edición (Garland, 2002); Nelson y Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Cuarta edición (W.H. Freeman, 2004); Murphy, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging* (Wiley-Liss, 2001); Shapiro, *Practical Flow Cytometry*, Cuarta edición (Wiley-Liss, 2003); Owens et al. (Editores), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice: Quality Assurance for Quantitative Immunophenotyping* (Wiley-Liss, 1994); y Ormerod (Editor) *Flow Cytometry: A Practical Approach* (Oxford University Press, 2000). "Anticuerpo" o "inmunoglobulina" significa una proteína, producida de forma natural o sintética por medios recombinantes o químicos, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno o determinante antigénico concreto. Los anticuerpos normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Da compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios separados de forma regular. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable ( $V_H$ ) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable ( $V_L$ ) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno. En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varios de estas pueden además dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. "Fragmento de anticuerpo", y todas las variantes gramáticas del mismo, como se usa en el presente documento, se define como una porción de un anticuerpo intacto que comprenden el sitio de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, en la que la porción carece de los dominios constantes de la cadena pesada (es decir, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> y CH<sub>4</sub>, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria consistente en una secuencia no interrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominado en el presente documento "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena sencilla"), incluidas, sin limitaciones (1) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) (2) polipéptidos de cadena sencilla que solo contienen un dominio variable de cadena ligera o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de la cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociada y (3) polipéptidos de cadena sencilla que sólo contiene una región variable de cadena pesada o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociada, y estructuras

- multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpo. La expresión "anticuerpo monoclonal" (AcMo) como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada AcMo está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en cuanto a que pueden sintetizarse mediante cultivo de hibridoma, no contaminados con otras inmunoglobulinas. Las guías en la producción y selección de anticuerpos para usar en inmunoensayos se pueden encontrar en textos y manuales disponibles con facilidad, por ejemplo Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988); Howard y Bethell, *Basic Methods in Antibody Production and Characterization* (CRC Press, 2001); y Wild, editor, *The Immunoassay Handbook* (Stockton Press, New York, 1994).
- 5 "Determinante antigénico" o "epítomo" significa un sitio sobre la superficie de una molécula, normalmente una proteína, a la que se une una única molécula de anticuerpo; generalmente, una proteína tiene varios o muchos determinantes antigénicos diferentes y reacciona con anticuerpos de muchas especificidades diferentes. Un determinante antigénico preferido es un sitio de fosforilación de una proteína.
- 10 "Compuesto de unión" significa un compuesto que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana concreta. Ejemplos de los compuestos de unión incluyen anticuerpos, lectinas, ácidos nucleicos y aptámeros, por ejemplo Sharon y Lis, *Lectins*, 2ª Edición (Springer, 2006); Klussmann, *The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications* (John Wiley & Sons, New York, 2006). Preferentemente, los compuestos de unión son anticuerpos y, más preferentemente, los compuestos de unión son anticuerpos monoclonales. "CD2" significa una molécula de superficie celular del sistema de diferenciación antigénica (CD), también conocido como T11 o LFA-2, que se expresa en los linfocitos T, los timocitos y las células NK, y que funciona como molécula de adhesión, que se une a CD58 (LFA-3). Preferentemente, CD2 hace referencia a la molécula de CD2 humana.
- 15 "CD3" significa una molécula de superficie celular del sistema de diferenciación antigénica (CD) también conocido como T3, que se expresa en linfocitos T y en timocitos, y que se asocia con el receptor del antígeno de linfocitos T (TCR), necesaria para la expresión en la superficie celular de una transducción de señal mediante el TCR. Sus dominios citoplásmicos contienen motivos de ITAM y se unen a las tirosina quinasas citoplásmicas. Preferentemente, CD3 hace referencia a la molécula de CD3 humana.
- 20 "CD4" significa una molécula de la superficie celular del sistema de diferenciación antigénica (CD), también conocida como T4 o L3T4, que se expresa en subpoblaciones de timocitos, linfocitos T colaboradores e inflamatorios (aproximadamente dos tercios de los linfocitos T periféricos), monocitos, macrófagos y que funciona como correceptores para las moléculas del MHC de clase II, se une a Lck sobre la cara citoplásmica de la membrana. CD4 es un receptor para la gp120 del VIH-1 y del VIH-2. Preferentemente, CD4 hace referencia a la molécula de CD4 humana.
- 25 "CD45RA" significa una molécula de superficie celular del sistema de diferenciación antigénica (CD) que se expresa en los linfocitos B, subpoblaciones de linfocitos T (linfocitos T no expuestos previamente) y monocitos, y que es una variante de corte y empalme de CD45 que contiene el exón A. Preferentemente, CD45RA hace referencia a la molécula de CD45RA humana.
- 30 "CD56" significa una molécula de superficie celular del sistema de diferenciación antigénica (CD), también conocida como NKH-1, que se expresa sobre células NK y que es una variante de corte y empalme de la molécula de adhesión celular neural (NCAM). Preferentemente, CD56 hace referencia a la molécula de CD56 humana.
- 35 "Complejo" como se usa en el presente documento significa un ensamblaje o agregado de moléculas en contacto directo o indirecto entre sí. En un aspecto, "contacto", o más particularmente, "contacto directo" en referencia a un complejo de moléculas o en referencia a la especificidad o a la unión específica significa que dos o más moléculas están suficientemente cerca como para que interacciones no covalentes de atracción, tales como fuerzas de Van der Waals puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrófobas, dominen la interacción de las moléculas. En dicho aspecto, un complejo de moléculas es estable en cuanto a que dichas condiciones de ensayo, el complejo es termodinámicamente más favorable que un estado no agregado y no en complejo de sus moléculas componentes. Como se usa en el presente documento, "complejo" normalmente se refiere a un agregado estable de dos o más proteínas. En un aspecto, un "complejo" hace referencia a un agregado estable de dos proteínas, tales como un anticuerpo unido específicamente a un determinante antigénico de una proteína diana.
- 40 "Reactivos desecados" significan reactivos de ensayo, tales como tampones, sales, compuestos activos, tales como enzimas y cofactores, o compuestos de unión, tales como anticuerpos o aptámeros que se proporcionan en una formulación deshidratada con el objetivo de una vida de almacenamiento mejorada, facilidad de transporte y manipulación y mejor almacenamiento. La naturaleza, la composición y el procedimiento de producir reactivos desecados varían ampliamente y la formulación y la producción de dichos materiales las conocen bien los expertos
- 45
- 50
- 55



en la técnica, como se pone de manifiesto mediante las referencias siguientes. Franks y col., patente de EE.UU. 5.098.893; Cole, patente de EE.UU. 5.102.788; Shen y col., patente de EE.UU. 5.556.771; Trembl y col., patente de EE.UU. 5.763.157; De Rosier y col., patente de EE.UU. 6.294.365; Buhl y col., patente de EE.UU. 5.413.732; McMillan, publicación de patente de EE.UU. 2006/0068398; McMillan y col., publicación de patente de EE.UU. 2006/0068399; Schwegman et al. (2005), Pharm. Dev. Technol., 10: 151 - 173; y Nail et al. (2002), Pharm. Biotechnol., 14: 281 - 360. Los reactivos desecados incluyen partículas sólidas y/o semisólidas, polvos, comprimidos, cristales, películas y recubrimientos que se fabrican de diversas formas. En un aspecto, los reactivos desecados son recubrimientos o películas liofilizadas en las paredes internas de los vasos o dentro de una cámara de un cartucho desechable para llevar a cabo un ensayo de acuerdo con la invención. Los reactivos desecados pueden incluir excipientes que normalmente son sustancias inertes añadidas a un material con el fin de conferir al material una consistencia o forma adecuada. Los expertos en la técnica conocen un gran número de excipientes y pueden comprender una serie de estructuras químicas diferentes. Ejemplos de excipientes que se pueden usar en la presente invención incluyen hidratos de carbono, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, melazitosa, dextrano y manitol; proteínas tales como BSA, gelatina y colágeno; y polímeros tales como PEG y polivinilpirrolidona (PVP). La cantidad total de excipiente en la partícula liofilizada puede comprender uno o varios compuestos. En algunas realizaciones, el tipo de excipiente es un factor en el control de la cantidad de higroscopia de un reactivo desecado. La disminución de la higroscopia puede potenciar la integridad de un reactivo desecado y las capacidades crioprotectoras. No obstante, eliminar toda el agua de dicha composición tendría efectos perjudiciales sobre dichos componentes de la reacción, proteínas, por ejemplo, que requieren ciertas cantidades de agua unida con el fin de mantener las conformaciones adecuadas.

"Marcador específico de granulocitos" significa cualquier molécula que está presente en todos, o sustancialmente todos, los granulocitos, pero que está sustancialmente ausente de otros tipos de glóbulos blancos. Marcadores específicos de granulocitos de ejemplo incluyen las moléculas siguientes: 1C3, 3C4, 6D10, 2B2, 8C5, fosfatasa alcalina, calprotectina, CD18, CD15, CD16, CD24, CD32, CD34, CD45, CD66b, CEACAM8, DH59B, EMR3, proteína catiónica eosinófila, factor de granulocitos, GMP, Gr-1 (Ly-G6), elastasa de granulocitos, HIS48, IL-8, fosfatasa alcalina leucocitaria, LRG, mieloperoxidasa y NKH1. Preferentemente, los marcadores específicos de granulocitos son moléculas de superficie celular. Más preferentemente, los marcadores específicos de granulocitos son los equivalentes humanos de los marcadores indicados anteriormente. Todavía más preferentemente, un marcador específico de granulocitos es CD15.

"Kit" significa cualquier sistema de suministro para suministrar materiales o reactivos para llevar a cabo un procedimiento de la invención. En el contexto de los ensayos para analizar glóbulos blancos, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de ensayo (por ejemplo, sondas y anticuerpos de marcaje auxiliares en los contenedores adecuados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más envases (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Dichos contenidos se pueden suministrar en el recipiente previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer contenedor puede contener tampones y un vaso o cubeta de reacción para usar en un ensayo, mientras que un segundo contenedor puede contener sondas. Componentes adicionales opcionales pueden incluir un aparato de extracción de muestras, por ejemplo dispositivos de punción de la piel para exponer cantidades pequeñas de sangre o frotis germicidas.

"Marcador específico de monocitos" significa cualquier molécula que está presente en todos, o sustancialmente todos, los monocitos, pero que está sustancialmente ausente de otros tipos de glóbulos blancos. Marcadores específicos de monocitos de ejemplo incluyen las moléculas siguientes: 125I-WVH-1, 63D3, CB12, CD11a, CD14, CD15, CD54, CD62L, CD163, citidina desaminasa, DH59B, receptores de Fc, Flt-1, hMGL, Ki-M1p, Leu-7, lisozima, fosfatasa ácida leucocitaria resistente a tartrato, receptores de manosilo, aglutinina de cacahuete, tromboplastina, timidina fosforilasa, TNF y urokinasa. Preferentemente, los marcadores específicos de monocitos son moléculas de superficie celular. Más preferentemente, los marcadores específicos de monocitos son los equivalentes humanos de los marcadores indicados anteriormente. Todavía más preferentemente, un marcador específico de monocitos es CD14.

"Muestra" significa una cantidad de material de muestra de sangre en la que se busca la detección o medición de células diana, partículas, esferas y/o analitos. Una muestra de sangre puede incluir un espécimen de origen sintético. Las muestras de sangre pueden ser de animal, incluyendo un ser humano, y se pueden obtener de todas las diversas familias de animales domésticos, así como animales silvestres o salvajes, incluyendo animales tales como ungulados, osos, peces y roedores. Estos ejemplos no se tienen que considerar como limitantes de los tipos de muestra aplicables al procedimiento de la presente invención. El Los términos "muestra" y "especimen", se usan indistintamente. "Específico" o "especificidad" en referencia a la unión de una molécula a otra molécula significa el reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre las dos moléculas, junto con sustancialmente menos reconocimiento, contacto o formación de complejos de dicha molécula con otras moléculas. En un aspecto, "específico", en referencia a la unión de una primera molécula a una segunda molécula, significa que en la medida en que la primera molécula reconoce y forma un complejo con otras moléculas en una reacción o muestra, forma el número más grande de los complejos con la segunda molécula. Preferentemente, este número más grande es al menos treinta por ciento. Generalmente, las moléculas implicadas en un acontecimiento de unión específico tienen áreas sobre sus superficies y/o en el caso de las proteínas en las cavidades, lo que da lugar a un reconocimiento

5 específico entre las moléculas que se unen entre sí. Ejemplos de unión específica incluyen interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones enzima-sustrato, formación de dúplex o triplex entre polinucleótidos y/u oligonucleótidos e interacciones receptor-ligando. Como se usa en el presente documento, "contacto" en referencia a especificidad o unión específica significa que dos moléculas están lo bastante cerca que las interacciones químicas no covalentes débiles, como las fuerzas de Van der Waal, los puentes de hidrógeno, las interacciones de apilamiento de bases, las interacciones iónicas e hidrofóbicas dominan la interacción de las moléculas.

10 "Resolubles espectralmente" en referencia a una pluralidad de marcadores, o colorantes, fluorescentes, significa que las bandas de emisión fluorescentes de los colorantes son lo suficientemente distintas, por ejemplo no solapantes, que los compuestos de unión a los que los respectivos colorantes están unidos se pueden distinguir en base a la señal fluorescente generada por los respectivos colorantes mediante sistemas de fotodetección convencionales, por ejemplo usando un sistema estándar de filtros, espejos, dicoicos, tubos fotomultiplicadores o fotodiodos tales como se describen en las referencias siguientes: Wheeless y col., *Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis* (Academic Press, New York, 1985); Shapiro (citado anteriormente).

15 "Marcador específico de linfocitos T" significa cualquier molécula que está presente en todos, o sustancialmente todos, los linfocitos T, pero que está sustancialmente ausente de otros tipos de glóbulos blancos. Marcadores específicos de linfocitos T de ejemplo incluyen las moléculas siguientes: CD1a, CD1d, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD25, CD38, CD45RO, CD72, CD134, CD150, CRTAM, FOXP3, FT2, GPCA, HML-1, HT23A, Leu-22, Ly-2, Ly-m22, MICG, MRC OX-8, MRC OX-22, OX40, PD-1, RT6, TCR, Thy-1 (CD90) y TSA-2. Preferentemente, los marcadores específicos de linfocitos T son moléculas de la superficie celular. Más preferentemente, los marcadores  
 20 específicos de linfocitos T son los equivalentes humanos de los marcadores indicados anteriormente. Todavía más preferentemente, los marcadores específicos de linfocitos T son moléculas CD2 o CD3.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para enumerar los recuentos absolutos de linfocitos en una muestra de sangre, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
  - 5 combinar dicha muestra con un primer compuesto de unión marcado con un colorante fluorescente específico de un marcador específico de linfocitos T que es CD2 o CD3 y un segundo compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de CD45RA en una mezcla, en el que  
dicho primer compuesto de unión y dicho segundo compuesto de unión están marcados con el mismo colorante fluorescente;
  - 10 medir las señales de fluorescencia de dichos compuestos de unión marcados con colorante fluorescente que se han unido a células en dicha muestra; y  
en ausencia de una medición de la dispersión lateral, enumerar los linfocitos en dicha muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos primer y segundo compuestos de unión son anticuerpos.
3. Un procedimiento para determinar el porcentaje de linfocitos T colaboradores en una muestra de sangre, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
  - 15 combinar dicha muestra con un primer compuesto de unión marcado con un colorante fluorescente específico de un marcador específico de linfocitos T que es CD2 o CD3 y un segundo compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de CD45RA en una mezcla, en el que  
dicho primer compuesto de unión y dicho segundo compuesto de unión están marcados con un primer colorante fluorescente y dicho tercer compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de CD4, en el que dicho tercer compuesto de unión está marcado con un colorante fluorescente que es distinto de dicho primer colorante fluorescente;
  - 20 medir las señales de fluorescencia a partir de dichos compuestos de unión marcados con colorante fluorescente que se han unido a células en dicha muestra; enumerar los linfocitos en dicha muestra;
  - 25 en ausencia de una medición de la dispersión lateral, enumerar los linfocitos T colaboradores en dicha muestra; y  
determinar el porcentaje de linfocitos T colaboradores en dicha muestra.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dichos primer, segundo y tercer compuestos de unión son anticuerpos.
- 30 5. Uso de un kit que comprende un primer compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de un marcador específico de linfocitos T que es CD2 o CD3 y un segundo compuesto de unión marcado con colorante fluorescente específico de CD45RA, en el que dicho primer compuesto de unión y dicho segundo compuesto de unión están marcados con el mismo colorante fluorescente, para enumerar los recuentos absolutos de linfocitos en una muestra de sangre de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1.
- 35 6. El uso de la reivindicación 5, en el que dichos primer y segundo compuestos de unión son anticuerpos.

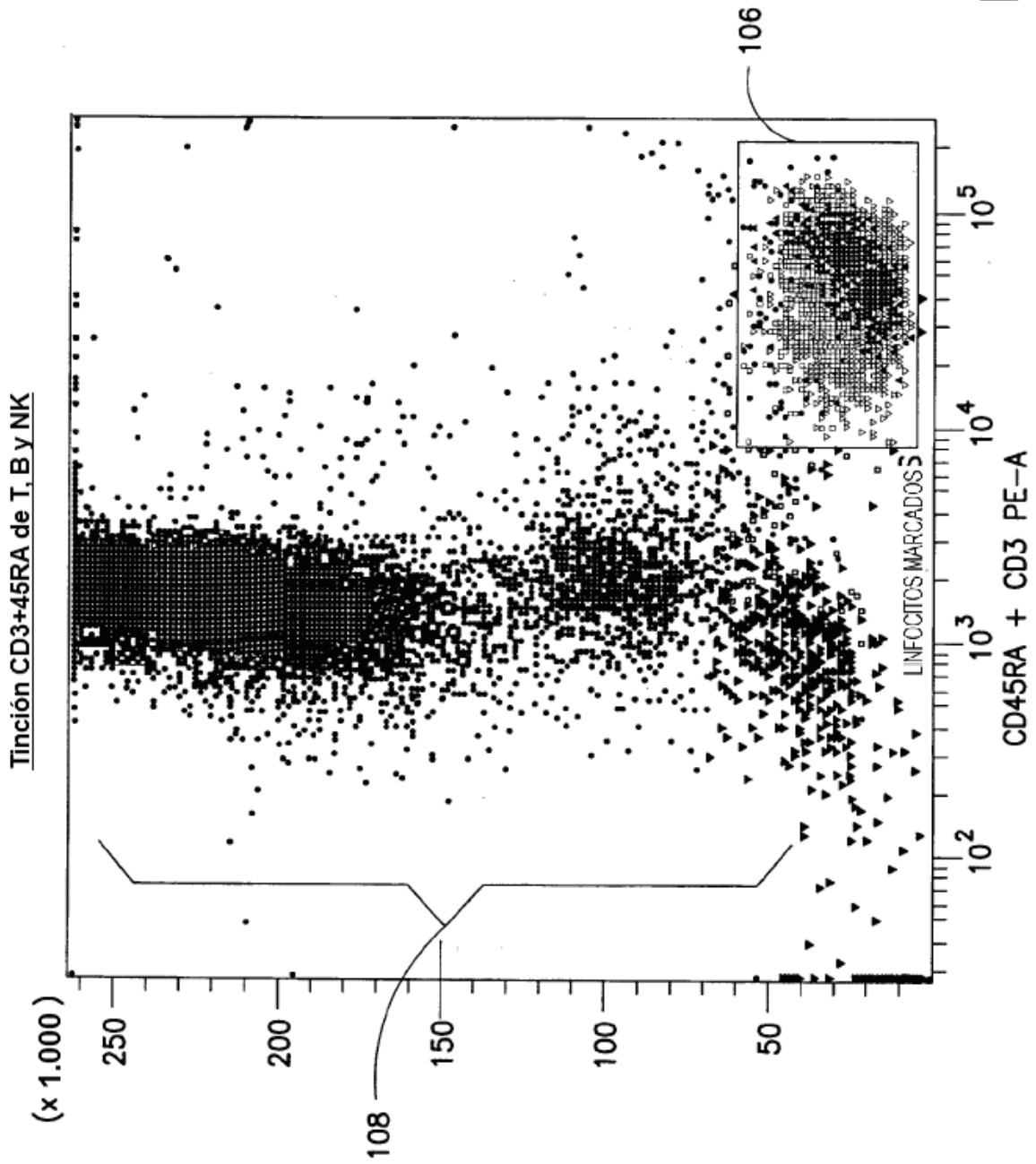
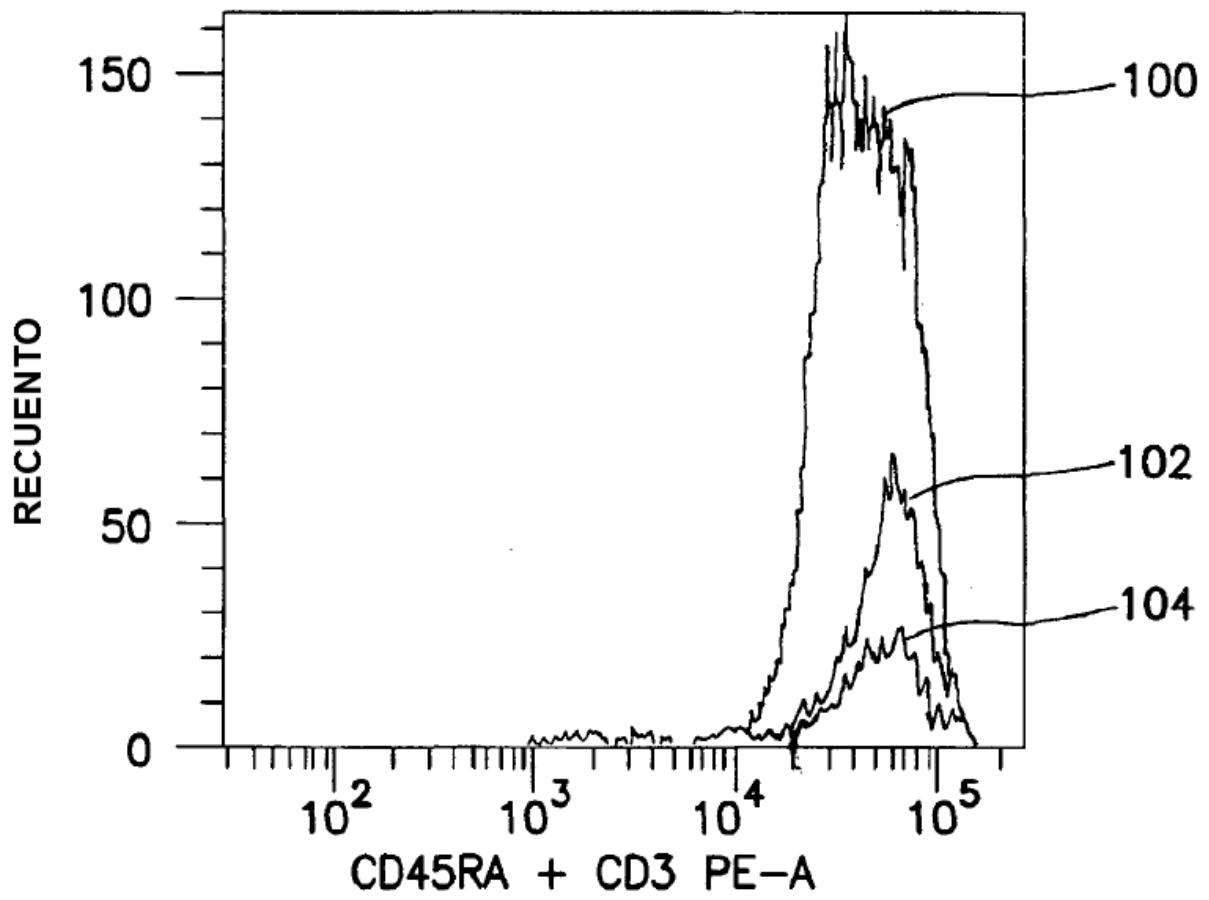


FIG.1A

TINCIÓN CD3+45RA de T, B y NK



**FIG.1B**

TUBO : ACQ 1

| POBLACIÓN                   | NºACONTECIMIENTOS | %PARENTAL |
|-----------------------------|-------------------|-----------|
| • TODOS LOS ACONTECIMIENTOS | 20.000            |           |
| ▼ LINFOCITOS                | 6.320             | 31,8      |
| □ CD16+                     | 1.009             | 16,0      |
| ▼ (100)                     | 5.736             | 90,8      |
| ▲ CD20+ (104)               | 545               | 8,6       |
| □ CD56+                     | 1.361             | 21,5      |
| □ CD16 OR CD56 (102)        | 1.464             | 23,2      |
| ⊗ NO (LINFOCITOS MARCADOS)  | 584               | 9,2       |

FIG.1C

TUBO : ACQ 1

| POBLACIÓN                 | NºACONTECIMIENTOS | %PARENTAL |
|---------------------------|-------------------|-----------|
| TODOS LOS ACONTECIMIENTOS | 20.000            |           |
| LINFOCITOS (200)          | 5.681             | 28,4      |
| CD3+CD45RA (204)          | 5.300             | 93,3      |
| CD4 (202)                 | 2.381             | 41,9      |
| MONOS (206)               | 1.531             | 7,7       |
| GRANS (208)               | 11.893            | 59,5      |

FIG.2A

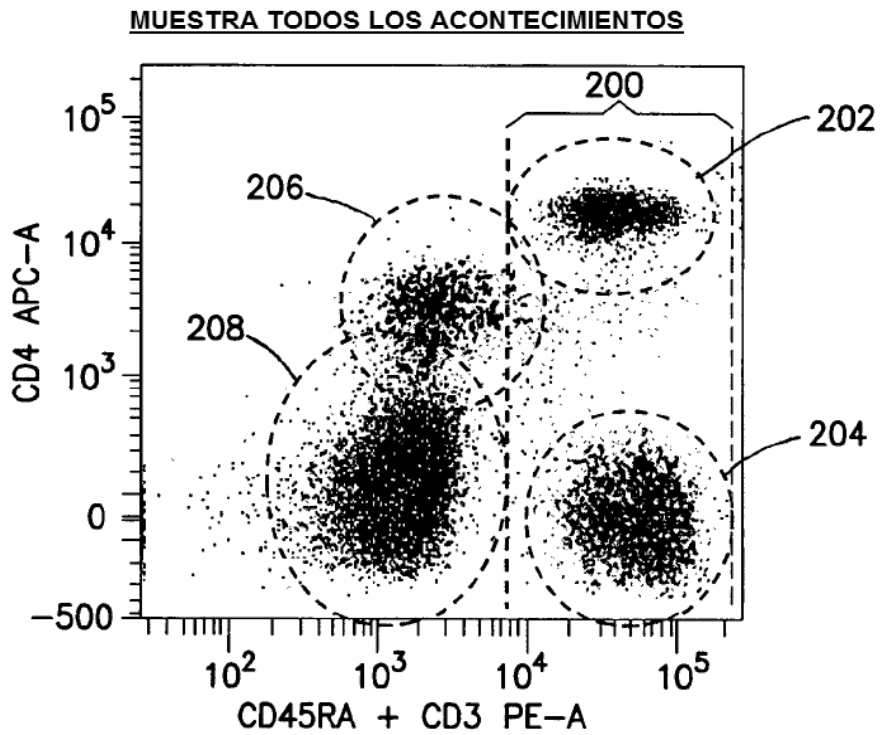


FIG.2B

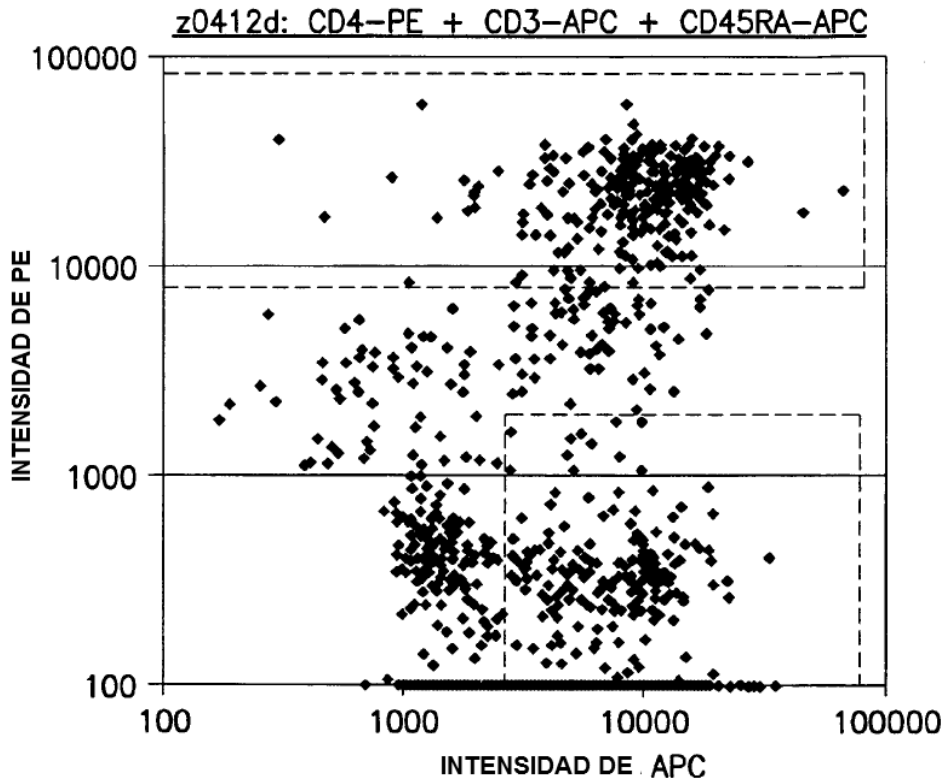


FIG.3A

| Donante | Imagen |      | TriTest |      | Rendimiento |         |
|---------|--------|------|---------|------|-------------|---------|
|         | CD4+   | CD4- | CD4+    | CD4- | CD4+        | CD4-    |
| D5050   | 423    | 307  | 435     | 281  | 97,24%      | 109,25% |
| D1440   | 590    | 298  | 600     | 286  | 98,33%      | 104,20% |
| D1810   | 266    | 345  | 295     | 345  | 90,17%      | 100,00% |
| D3075   | 292    | 391  | 308     | 423  | 94,81%      | 92,43%  |
| D5135   | 286    | 367  | 286     | 354  | 100,00%     | 103,67% |
| D1440   | 640    | 302  | 695     | 331  | 92,09%      | 91,24%  |
| D1440   | 613    | 286  | 681     | 324  | 90,01%      | 88,27%  |
| D5165   | 277    | 325  | 307     | 327  | 90,23%      | 99,39%  |
| D5165   | 271    | 303  | 301     | 320  | 90,03%      | 94,69%  |
| D5165   | 282    | 316  | 297     | 317  | 94,95%      | 99,68%  |
| D3030   | 272    | 481  | 286     | 582  | 95,10%      | 82,65%  |
| D5180   | 336    | 612  | 332     | 613  | 101,20%     | 99,84%  |
| PROM.   |        |      |         |      | 94,51%      | 97,11%  |
| SD      |        |      |         |      | 0,04        | 0,07    |

FIG.3B