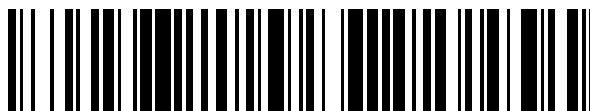


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 695**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/49** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2008 PCT/JP2008/061572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2008 WO09001868**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2008 E 08777588 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2166353**

54 Título: **Reactivo y kit de reactivos para el análisis de leucocitos primitivos**

30 Prioridad:

**25.06.2007 JP 2007166609**

**27.03.2008 JP 2008084137**

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

**04.10.2018**

73 Titular/es:

**SYSMEX CORPORATION (100.0%)**

**5-1, WAKINOHAMA-KAIGANDORI 1-CHOME**

**CHUO-KU**

**KOBE-SHI, HYOGO 651-0073, JP**

72 Inventor/es:

**KATAOKA, YUKIKO;**

**TSUJI, TOMOHIRO;**

**OGUNI, SHINICHIRO;**

**YOSHIDA, AYUMU y**

**ABE, MASAKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 684 695 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****Reactivo y kit de reactivos para el análisis de leucocitos primitivos****5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un reactivo y un kit de reactivos para clasificar y contar leucocitos en una muestra biológica.

**10 Técnica anterior**

15 Las células sanguíneas se producen en la médula ósea, se diferencian de células inmaduras a células maduras y migran a la sangre periférica. En sujetos sanos, los leucocitos inmaduros no aparecen en la sangre periférica. Sin embargo, en algunos casos, aparecen leucocitos inmaduros en sangre periférica de pacientes que sufren leucemia, metástasis de cáncer en la médula ósea, mieloma múltiple, infección grave o similares. Por lo tanto, es muy importante clasificar y medir los leucocitos maduros e inmaduros en muestras biológicas para diagnosticar estas enfermedades.

20 Un reactivo descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada Núm. Hei 10(1998)-206423 es conocido como reactivo para medir leucocitos inmaduros. Este reactivo se mezcla con una muestra biológica para formar una muestra de medición, la muestra de medición obtenida se introduce en un citómetro de flujo y los leucocitos maduros e inmaduros de la muestra se clasifican y cuentan respectivamente en función de la información óptica obtenida aplicando luz que tiene una longitud de onda específica. Además, los leucocitos inmaduros se pueden clasificar adicionalmente en mieloblastos, granulocitos inmaduros y similares y se pueden medir respectivamente.

25 El documento EP1004880 se refiere a reactivos y a un método para la discriminación y el recuento de eritroblastos en muestras de sangre periférica o relacionadas con el sistema circulatorio. Los reactivos incluyen un agente hemolítico para disolver eritrocitos en una muestra de fluido corporal y para acondicionar leucocitos y eritroblastos en la muestra para que sean adecuados para su tinción, e incluyen al menos un colorante fluorescente seleccionado para teñir leucocitos y eritroblastos diferencialmente. Los reactivos incluyen adicionalmente tensioactivo añadido al agente hemolítico.

35 El documento US2003/0219850 describe un método automático para analizar células de médula ósea nucleadas que comprende dividir una muestra de fluido de médula ósea con dos muestras, siendo tratada una muestra con un primer agente de lisis y una primera solución de tinción y siendo tratada la otra muestra con un segundo agente de lisis y una segunda solución de tinción; y medir cada muestra en un citómetro de flujo utilizando una luz dispersada y fluorescencia que permite clasificar y contar leucocitos, células eritroides y partículas de lípidos, así como células mieloides maduras, células linfoides y células mieloides inmaduras, y calcular el número de células mieloides así como la proporción de células mieloides y células eritroides. El documento US 5.389.549 describe reactivos para permitir que los leucocitos se clasifiquen y se cuenten como productos lisados de eritrocitos y actúen sobre los leucocitos para estabilizarlos. Los reactivos contienen tensioactivos basados en polioxi-etileno, y pueden contener agentes hiperosmóticos o hipoosmóticos y agentes solubilizantes. El documento EP0525398 se refiere a un método que comprende preparar una muestra para analizar eliminando influencias de eritrocitos de una muestra hematológica sin cambiar morfológicamente los leucocitos añadiendo una primera solución acuosa de baja presión osmótica que comprende un tampón para ajustar el valor de pH dentro de una región ácida y una segunda solución acuosa que comprende un agente compensador de la osmolaridad y un tampón para proporcionar un valor de pH adecuado para la tinción, añadiendo adicionalmente opcionalmente una sal, que se disocia en iones en soluciones acuosas para controlar la conductividad eléctrica de la solución acuosa a un nivel preferible, al tiempo que daña las membranas celulares de los eritroblastos contenidos en dicha muestra; y teñir los leucocitos con al menos cuatro colorantes.

**Descripción de la invención****55 Problemas que debe resolver la invención**

60 En el análisis de células sanguíneas utilizando el reactivo convencional, cuando las células sanguíneas deben medirse con un citómetro de flujo, por ejemplo, la región de señal de los residuos de eritrocitos lisados (fantasmas de eritrocitos) y la región señal de mieloblastos se solapan parcialmente, en algunos casos. En los análisis que utilizan dicho reactivo, incluso cuando se analiza una muestra de sangre que no contiene mieloblastos, la señal de los residuos de eritrocitos se reconoce incorrectamente como la señal de los mieloblastos, por lo que podría no obtenerse el resultado de análisis preciso de las células sanguíneas. Por ejemplo, la sangre periférica de pacientes que padecen las enfermedades específicas tales como mieloma múltiple, cáncer de las vías biliares, peritonitis, diabetes, nefritis glomerular, pleuresía o similares no contiene mieloblastos. Sin embargo, cuando las células sanguíneas se analizan en sangre periférica tomada de tales pacientes utilizando el reactivo convencional, ha

habido algunos casos en los que se detecta una señal en la región donde se detectan los mieloblastos en el diagrama de dispersión. Se considera que la razón de esto es que los eritrocitos en la muestra de tales pacientes específicos no se lisan adecuadamente, a diferencia de los eritrocitos en la muestra de sujetos sanos o pacientes con enfermedades distintas a las descritas anteriormente. Existe una posibilidad de diagnósticos y tratamientos falsos si la cantidad de mieloblastos detectados en la sangre periférica es más alta que su cantidad real. Según se utiliza en la presente memoria, el término "fantasma de eritrocitos" significa eritrocitos que perdieron su hemoglobina como resultado de la reacción de una muestra de sangre y un reactivo para el análisis de sangre, pero no se contrajeron lo suficiente.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un reactivo que permita clasificar y contar los leucocitos inmaduros de manera más precisa incluso cuando se analicen muestras de sangre de pacientes con enfermedades específicas tales como las descritas anteriormente.

### Medios para resolver los problemas

Los autores de la presente invención han realizado estudios intensivos para resolver los problemas anteriormente descritos y han encontrado que los problemas anteriores se pueden resolver disminuyendo la presión osmótica del reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros hasta un nivel inferior al que se ha utilizado convencionalmente.

Se ha considerado que el reactivo convencional para el análisis de leucocitos inmaduros es adecuado para tener la presión osmótica similar a la de los leucocitos inmaduros y los leucocitos maduros con el fin de evitar la lisis de estas células sanguíneas en el momento de la medición.

Sin embargo, ahora se encuentra que la precisión del análisis de muestras biológicas de pacientes que padecen enfermedades específicas tales como mieloma múltiple, cáncer de las vías biliares, peritonitis, diabetes, nefritis glomerular, pleuresía o similares mejora cuando se utiliza un reactivo de análisis que tiene una presión osmótica sorprendentemente baja en comparación con los conocimientos técnicos comunes. Por ejemplo, utilizando el reactivo de análisis que tiene baja presión osmótica, los mieloblastos y los eritrocitos lisados podrían discriminarse más claramente. Por otra parte, sorprendentemente, ahora se encuentra que el reactivo de análisis de la presente invención hace posible distinguir leucocitos inmaduros de leucocitos maduros tan claro como lo hace el reactivo convencional que tiene alta presión osmótica, incluso para muestras biológicas de pacientes que padecen enfermedades distintas de las enfermedades específicas anteriores. Por ejemplo, se encuentra que pueden evitarse fantasmas de eritrocitos utilizando el reactivo de análisis de la presente invención.

Dependiendo de los especímenes, hay algunos casos en los que la señal de los mieloblastos y la señal de los basófilos se superponen incluso cuando se utiliza un reactivo que tiene baja presión osmótica. Debido a esto, existía la posibilidad de que se identifiquen mieloblastos en la sangre periférica del sujeto sano, aunque no existan mieloblastos en la misma que conduzcan a un resultado falso. Este problema adicional de que las señales de los mieloblastos y los basófilos se solapan podría resolverse disminuyendo las concentraciones de tensioactivo y agente solubilizante en el reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros al nivel más bajo que el que se ha considerado convencionalmente. En consecuencia, es posible distinguir más claramente los basófilos de los mieloblastos incluso en muestras de sangre que contienen una gran cantidad de basófilos utilizando el reactivo de la presente invención. Además, la disminución de las concentraciones de un tensioactivo y un agente solubilizante permite la clasificación de leucocitos maduros en al menos tres especies en condiciones de baja presión osmótica.

La presente invención proporciona el objeto de estudio como se expone en una cualquiera y todas las reivindicaciones 1 a 14 adjuntas.

Un aspecto de la presente invención es un reactivo como se menciona en las reivindicaciones para el análisis de leucocitos inmaduros que comprende:

- un agente tensioactivo que puede dañar las membranas celulares de los eritrocitos y los leucocitos maduros,
  - un agente solubilizante que puede reducir las células sanguíneas dañadas y
  - un colorante para teñir el ácido nucleico,
- en donde el reactivo tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg.

Otro aspecto de la presente invención es un kit de reactivos como se describe en las reivindicaciones para el análisis de leucocitos inmaduros que comprende:

- un primer reactivo que comprende un tensioactivo que puede dañar las membranas celulares de eritrocitos y leucocitos maduros y un agente solubilizante que puede contraer las células sanguíneas dañadas y que tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg, y
- un segundo reactivo que comprende un colorante para teñir el ácido nucleico.

Un aspecto adicional de la presente invención es un método como se describe en las reivindicaciones

adjuntas para clasificar leucocitos inmaduros que comprende las etapas de:

5 mezclar una muestra biológica que posiblemente contiene leucocitos inmaduros con un reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros que comprende un agente tensioactivo que puede dañar las membranas celulares de eritrocitos y leucocitos maduros, un agente solubilizante que puede contraer las células sanguíneas dañadas y un colorante para teñir ácido nucleico y que tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg, para teñir el ácido nucleico de los leucocitos maduros, y  
 10 medir al menos la luz dispersada y al menos la fluorescencia de los leucocitos inmaduros tratados en la etapa anterior para clasificar los leucocitos inmaduros basándose en las diferencias en las intensidades de la luz dispersada y la fluorescencia.

**Efecto de la invención**

15 El reactivo y el kit de reactivos para el análisis de leucocitos inmaduros de la presente invención permiten una clasificación y recuento más preciso de leucocitos inmaduros y leucocitos maduros en comparación con el reactivo convencional, incluso cuando se analizan muestras biológicas de pacientes que padecen enfermedades específicas tales como mieloma múltiple, cáncer de las vías biliares, peritonitis, diabetes, nefritis glomerular, pleuritis o similares.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es una representación esquemática que muestra un ejemplo de un citómetro de flujo que puede utilizarse para análisis de leucocitos inmaduros utilizando el reactivo o kit de reactivos de la presente invención.  
 25 La Fig. 2 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 1.  
 La Fig. 3 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 2.  
 La Fig. 4 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 3.  
 La Fig. 5 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 4.  
 30 La Fig. 6 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 5.  
 La Fig. 7 representa un diagrama de dispersión obtenido en el ejemplo 6.  
 La Fig. 8 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 7.  
 La Fig. 9 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 8.  
 La Fig. 10 representa un diagrama de dispersión obtenido en el Ejemplo 9.  
 35 La Fig. 11 representa un diagrama de dispersión obtenido en el ejemplo 10.

**Descripción de los números de referencia**

- 6 Boquilla
- 21 Fuente de luz
- 40 22 Lente colimadora
- 23 Celda de flujo
- 24 Lente condensadora
- 25 Placa con diafragma
- 26 Detector de luz dispersada frontal
- 45 27 Lente condensadora
- 28 Espejo dicróico
- 28' Filtro
- 29 Detector de luz dispersada lateral
- 30 Placa con orificio
- 50 31 Detector de fluorescencia lateral
- 32, 33 y 34 Amplificadores
- 35 Sección de análisis

**Mejor modo para llevar a cabo la invención**

55 El reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros de la presente realización (denominado en lo sucesivo "reactivo") permite clasificar los leucocitos contenidos en una muestra biológica en leucocitos maduros e inmaduros y contarlos respectivamente. También hace posible clasificar los leucocitos maduros en al menos tres especies, tales como linfocitos, monocitos, granulocitos, basófilos y similares, y contarlos respectivamente. Adicionalmente, el presente  
 60 reactivo permite clasificar adicionalmente los leucocitos inmaduros en granulocitos y mieloblastos inmaduros y contarlos con precisión, respectivamente.

El término "leucocitos inmaduros" según se utiliza en la presente memoria se refiere a leucocitos inmaduros que existen habitualmente en la médula ósea y no se producen en la sangre periférica del sujeto sano. Los leucocitos

inmaduros incluyen, por ejemplo, mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos y similares. En algunos casos, los promielocitos, mielocitos y metamielocitos se denominan colectivamente "granulocitos inmaduros". Los mieloblastos incluyen células precursoras hematopoyéticas leucocíticas tales como células madre de la serie mieloide (CFU-GEMN), células formadoras de colonias de neutrófilos y macrófagos (CFU-GM), células formadoras de colonias de eosinófilos (CFU-EOS) y similares.

La muestra biológica que se debe analizar con el reactivo de la presente realización no está limitada siempre que comprenda leucocitos e incluya, por ejemplo, sangre, urea, producto aspirado de médula ósea, una muestra tomada en aféresis y similares.

El reactivo de la presente realización comprende el tensioactivo que puede dañar las membranas celulares de eritrocitos y leucocitos maduros, el agente solubilizante que puede contraer las células sanguíneas dañadas y el colorante para teñir el ácido nucleico y tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg.

Al mezclar la muestra biológica y el reactivo, las membranas celulares de las células sanguíneas contenidas en la muestra se dañan por la acción del agente tensioactivo y el agente solubilizante. El tensioactivo tiende a dañar las membranas celulares de los eritrocitos y los leucocitos maduros, mientras que las membranas celulares de los leucocitos inmaduros son resistentes al daño. Las células sanguíneas dañadas, tales como los eritrocitos y los leucocitos maduros, se contraen por la acción del agente solubilizante. Por otro lado, debido a que las membranas celulares de los leucocitos inmaduros son difíciles de dañar, estas células son menos contraídas por el agente solubilizante que los eritrocitos y los leucocitos maduros.

Entre las células sanguíneas dañadas, los núcleos de los leucocitos tienden a teñirse intensamente por la acción del colorante para teñir el ácido nucleico. Sin embargo, los leucocitos inmaduros no dañados son difíciles de teñir. Además, debido a que los eritrocitos no tienen núcleos, son difíciles de teñir por el colorante anterior para teñir el ácido nucleico. Como consecuencia, los leucocitos inmaduros, los leucocitos maduros y los eritrocitos pueden discriminarse respectivamente.

La presión osmótica del reactivo de la presente invención es no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg, preferiblemente de 10 a 100 mOsm/kg, y más preferiblemente de 10 a 60 mOsm/kg. Tal presión osmótica se puede obtener mezclando los componentes descritos a continuación en la cantidad descrita a continuación, o ajustando adecuadamente la concentración de un agente tamponador. Sin embargo, también es posible ajustar la presión mediante la adición de sacáridos, aminoácidos, cloruro de sodio y similares, si se desea.

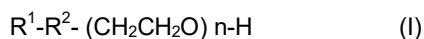
Los sacáridos pueden mencionar monosacáridos tales como glucosa, fructosa y similares; polisacáridos tales como arabinosa y similares; y alcoholes de azúcares tales como xilitol, sorbitol, manitol, ribitol y similares, sin ninguna limitación a los mismos.

Cuando se utiliza xilitol, por ejemplo, se puede utilizar en una cantidad de 0 a 10 g/L, más preferiblemente de 4 a 8 g/L en el reactivo.

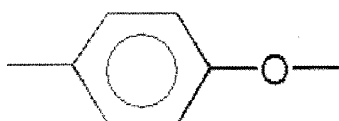
Los aminoácidos pueden incluir valina, prolina, glicina, alanina y similares. Se prefiere utilizar uno o ambos de glicina y alanina.

Cuando se utiliza glicina, por ejemplo, puede utilizarse en una cantidad de 0 a 10 g/L, más preferiblemente de 2 a 6 g/L en el reactivo.

El tensioactivo que puede dañar las membranas celulares de eritrocitos y leucocitos maduros es preferiblemente un tensioactivo no iónico y es más preferiblemente un tensioactivo no iónico de polioxietileno. El tensioactivo no iónico de polioxietileno es más preferiblemente el que tiene la siguiente fórmula (I):



(en donde R<sup>1</sup> representa un grupo alquilo, alquenoilo o alquinilo C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub>; R<sup>2</sup> representa -O-, -COO- o



y n es un número entero de 10 a 40).

El tensioactivo representado por la fórmula (I) anterior puede incluir polioxietilen(15)oleil éter, polioxietilen(20)oleil

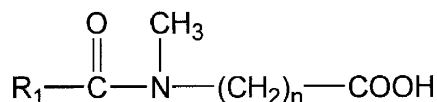
éter, polioxietilen(20)estearil éter, polioxietilen(15)cetil éter, polioxietilen(20)cetil éter y similares. El tensioactivo puede ser una o más especies.

5 La concentración del tensioactivo en el reactivo puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el tipo de tensioactivo. Cuando el tensioactivo es el polioxietilen oleil éter, la concentración del mismo en el reactivo es preferiblemente de 500 a 15.000 ppm, más preferiblemente de 750 a 10.000 ppm, y aún más preferiblemente de 1.000 a 2.500 ppm.

10 En una realización más preferida de la presente invención, la concentración del tensioactivo se establece en un intervalo relativamente bajo tal como de 1.000 a 10.000 ppm, por ejemplo. En tal intervalo de concentración, el daño a las membranas celulares de uno de los leucocitos maduros, basófilos, se suprime en el caso de utilizar el reactivo que tiene una concentración relativamente alta del tensioactivo, de modo que se puede evitar que los basófilos se dañen y los componentes celulares de los basófilos se liberen al exterior de las células. En consecuencia, los basófilos son fáciles de teñir por la acción del colorante para teñir el ácido nucleico de forma similar a otros leucocitos maduros. Por otro lado, las membranas celulares de uno de los leucocitos inmaduros, mieloblastos, no se dañan como anteriormente, por lo que son difíciles de teñir. Como consecuencia, los basófilos y los mieloblastos se discriminan de manera más eficaz.

20 Cuando se utilizan múltiples tensioactivos, la razón de mezcla de estos tensioactivos se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con un índice de hidroxilo de los tensioactivos. Por ejemplo, cuando se utiliza polioxietilen(15)oleil éter que tiene el índice de hidroxilo de 64,8 y polioxietilen(20)oleil éter que tiene el índice de hidroxilo de 52,4, la razón de mezcla es preferiblemente de 1:9.

25 El agente solubilizante anterior es un derivado de sarcosina que tiene la siguiente fórmula estructural y sus sales:



30 en donde R<sub>1</sub> es un grupo alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>; y n es de 1 a 5. Específicamente, se mencionan N-lauroilsarcosinato de sodio, lauroil metil-β-alanina sódica, lauroilsarcosina y similares.

35 La concentración del agente solubilizante en el reactivo se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el tipo de agente solubilizante utilizado. Cuando se utiliza el derivado de sarcosina como agente solubilizante, la concentración del agente solubilizante en el reactivo es preferiblemente de 50 a 3.000 ppm, más preferiblemente de 100 a 400 ppm.

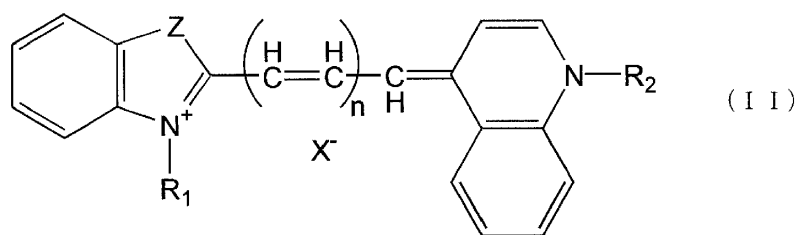
40 Cuando se utilizan, la concentración de los mismos en el reactivo es preferiblemente de 5 a 50.000 ppm, más preferiblemente de 5 a 6.600 ppm. Se pueden utilizar solos o combinados uno o más agentes solubilizantes.

45 En una realización más preferida de la presente invención, debido a la concentración relativamente baja del agente solubilizante, el daño a las membranas celulares de uno de los leucocitos maduros, los basófilos, se suprime en el caso en el que se utiliza el reactivo que tiene una concentración relativamente alta del agente solubilizante, de modo que se puede evitar que los basófilos se dañen y los componentes celulares de los basófilos se liberen al exterior de las células. En consecuencia, los basófilos son fáciles de teñir por la acción del colorante para teñir el ácido nucleico de forma similar a otros leucocitos maduros. Por otro lado, las membranas celulares de uno de los leucocitos inmaduros, los mieloblastos, no se dañan como anteriormente, por lo que son difíciles de teñir. Como consecuencia, los basófilos y los mieloblastos se discriminan de manera más eficaz.

50 El colorante anterior para teñir el ácido nucleico no está limitado siempre que pueda teñir ácido nucleico, y es preferiblemente un colorante fluorescente. Al utilizar dicho colorante, los eritrocitos que no tienen ácido nucleico apenas se tiñen, mientras que los leucocitos que tienen ácido nucleico se tiñen intensamente. Basándose en la diferencia en la intensidad de la tinción, se pueden discriminar los eritrocitos y los leucocitos. Además, los leucocitos maduros cuya membrana celular se daña de manera que el colorante puede penetrar son teñidos intensamente por el colorante, mientras que la mayoría de los leucocitos inmaduros no dañados son difíciles de teñir. Basándose en la diferencia en la intensidad de la tinción, se pueden discriminar los leucocitos maduros y los leucocitos inmaduros entre los leucocitos.

55 El colorante para teñir el ácido nucleico se selecciona apropiadamente dependiendo de la luz que se aplicará en un análisis. Por ejemplo, se utilizan preferiblemente los colorantes que tienen las siguientes fórmulas estructurales.

60 (1) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (II):



en donde  $R_1$  y  $R_2$  son un grupo alquilo inferior;  $n$  es 1 o 2;  $X^-$  es un anión; y  $Z$  es un átomo de azufre, un átomo de oxígeno o un átomo de carbono que está sustituido con un grupo alquilo inferior.

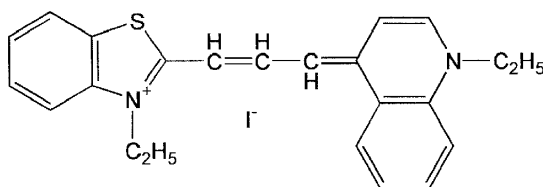
5 El grupo alquilo inferior con respecto a  $R_1$  y  $R_2$  de la fórmula (II) anterior se refiere a un grupo alquilo  $C_1$ - $C_6$  lineal o ramificado. Incluye, por ejemplo, grupos metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo y hexilo, entre los cuales se prefiere el grupo metilo.

El grupo alquilo inferior con respecto a  $Z$  incluye los mismos grupos que los anteriores.  $Z$  es preferiblemente un átomo de azufre.

10 El anión con respecto a  $X^-$  incluye iones halógeno (ion fluoruro, cloruro, bromuro o yoduro), iones haluro de boro ( $BF_4^-$ ,  $BCl_4^-$ ,  $BBr_4^-$ , etc.), iones de compuestos de fósforo, iones ácidos halógeno-oxígeno, iones de ácido fluorosulfúrico, iones sulfato de metilo e iones de compuestos de tetrafenilboro que tienen un grupo halógeno o halógeno-alquilo como sustituyente en los anillos aromáticos. Entre ellos, se prefiere el ion yoduro.

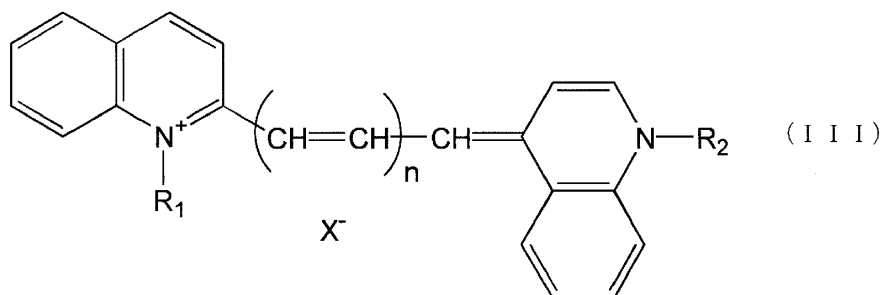
15 El siguiente colorante es adecuado como colorante para teñir el ácido nucleico que tiene la fórmula (II) anterior.

Colorante A:



20

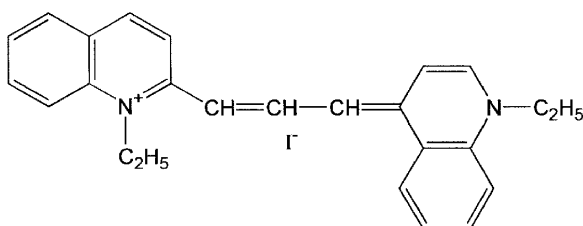
(2) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (III):



25 en donde  $R_1$  y  $R_2$  son un grupo alquilo inferior;  $n$  es 1 o 2; y  $X^-$  es un anión  
Para el grupo alquilo inferior de  $R_1$  y  $R_2$  y el anión  $X^-$  de la fórmula (III) anterior se pueden mencionar los mismos que se han descrito para la fórmula (II) anterior.

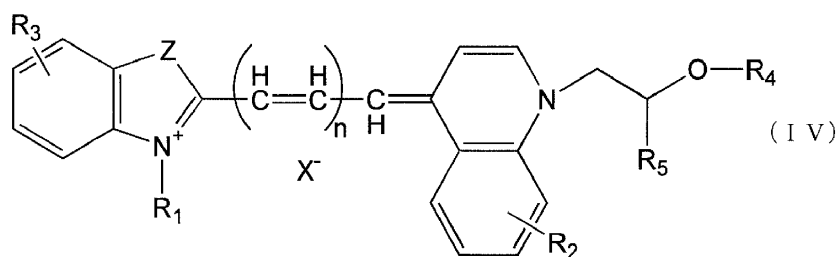
El siguiente colorante es adecuado como colorante para teñir el ácido nucleico que tiene la fórmula (III) anterior.

30 Colorante B:



(3) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (IV):

35



5 en donde R<sub>1</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior; R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo alcoxi inferior; R<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo acilo o un grupo alquilo inferior; R<sub>5</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior opcionalmente sustituido; Z es un átomo de azufre, un átomo de oxígeno o un átomo de carbono que está sustituido con un grupo alquilo inferior; n es 1 o 2; y X<sup>-</sup> es un anión.

10 Para el grupo alquilo inferior de R<sub>1</sub> de la fórmula (IV) anterior se pueden mencionar los mismos que se han descrito la fórmula (II) anterior.

15 Lo mismo que antes se puede mencionar para el grupo alquilo inferior de R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>. El grupo alcoxi inferior significa un grupo alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> e incluye grupos metoxi, etoxi y propoxi, entre los cuales se prefieren los grupos metoxi y etoxi. R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son preferiblemente un átomo de hidrógeno.

En la fórmula (IV) anterior, el grupo acilo de R<sub>4</sub> es preferiblemente un grupo acilo derivado de un ácido carboxílico alifático e incluye, por ejemplo, acetilo, propionilo y similares, entre los cuales se prefiere un grupo acetilo. Se mencionan los grupos alquilo inferior anteriores.

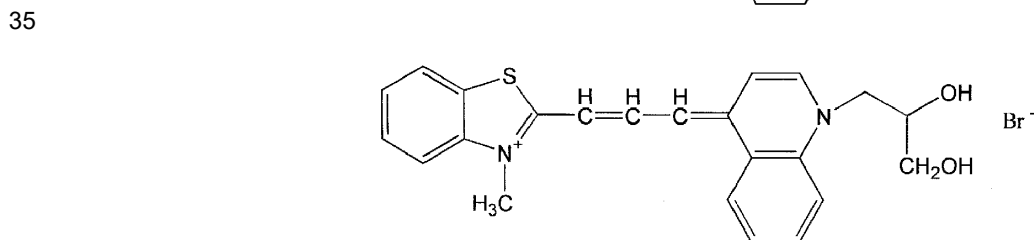
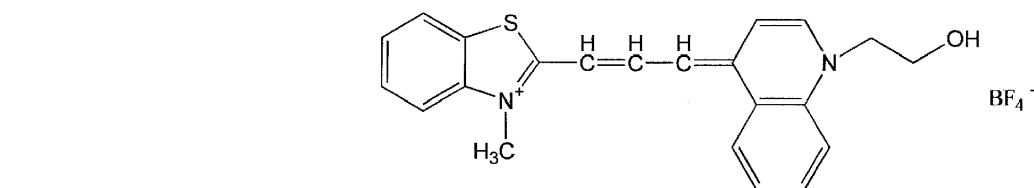
20 Lo mismo se puede mencionar para el grupo alquilo inferior de R<sub>5</sub>. El grupo alquilo inferior opcionalmente sustituido significa un grupo alquilo inferior que puede estar sustituido con uno a tres grupos hidroxilo, átomos de halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo) y similares y es preferiblemente un grupo metilo o etilo sustituido con un grupo hidroxilo.

25 Se puede mencionar lo mismo que antes para el grupo alquilo inferior de Z. Z es preferiblemente un átomo de azufre.

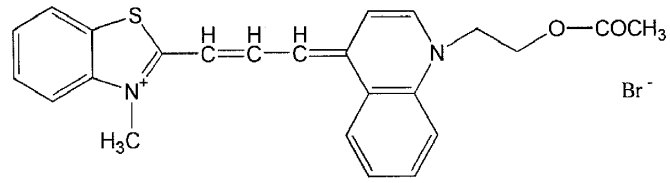
El anión X<sup>-</sup> es preferiblemente un ion bromuro o BF<sub>4</sub><sup>-</sup>.

30 Los siguientes colorantes son adecuados como el colorante para teñir el ácido nucleico que tiene la fórmula (IV) anterior.

Colorante C:

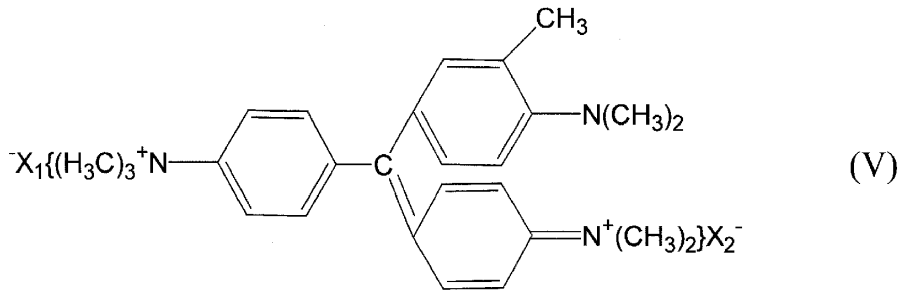






(4) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (V):

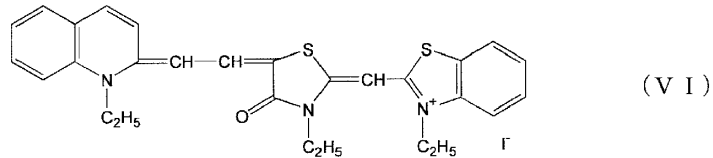
5



en donde  $X_1$  y  $X_2$  son independientemente Cl o I.

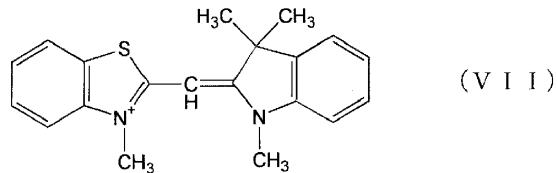
(5) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (VI) (NK-3975):

10



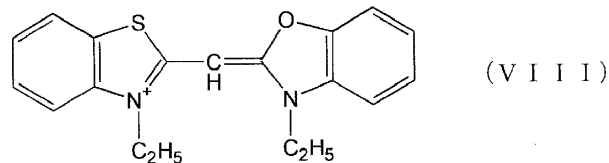
(6) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (VII) (NK-1570):

15



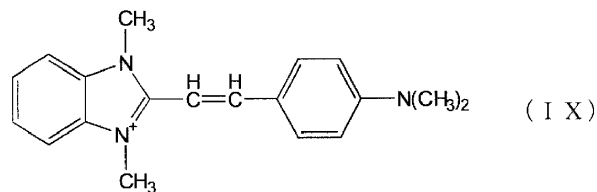
(7) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (VIII) (NK-1049):

20

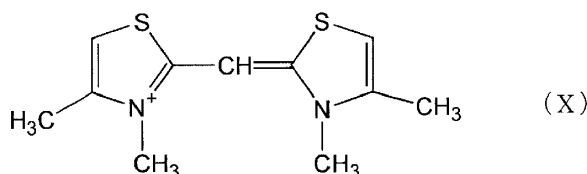


(8) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (IX) (NK-98):

25



(9) Un colorante que tiene la siguiente fórmula (X) (NK-141):



(10) Yoduro de propidio o bromuro de etidio

- 5 (11) Heterodímero de etidio-acridina, diazida de etidio, homodímero-1 de etidio, homodímero-2 de etidio, monoazida de etidio, bis[[3-[[4-[[3-metilbenzotiazol-3-il)-2-il]metileno]-1,4-dihidroquinolin]-1-il]propil]dimetilaminio]tetrayoduro de trimetileno (TOTO-1), diyoduro de 4-[[3-metilbenzotiazol-2(3H)-iliden]metil]-1-[3-(trimetilaminio)propil]quinolinio (TO-PRO-1), tetrayoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis[3-[4-[3-[[3-metilbenzotiazol-3-il)-2-il]-2-propeniliden]-1,4-dihidroquinolin-1-il]propil]1,3-propanodiamina (TOTO-3), o diyoduro de 2-[3-[[1-[3-(trimetilamino)propil]1,4-dihidroquinolin]-4-iliden]-1-propenil]3-metilbenzotiazol-3-io (TO-PRO-3).

La concentración del colorante anterior es preferiblemente de 0,01 a 500 ppm, y más preferiblemente de 0,1 a 200 ppm en el reactivo. El colorante anterior puede utilizarse solo o se pueden combinar dos o más colorantes.

- 15 El pH del reactivo de acuerdo con la presente realización es preferiblemente de 5,0 a 9,0, más preferiblemente de 6,5 a 7,5, y aún más preferiblemente de 6,8 a 7,3. El pH del reactivo puede ajustarse con un agente tamponador. El agente tamponador utilizado puede ser, por ejemplo, un tampón de Good tal como HEPES, MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico), MOPSO (ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico) o BES (ácido 2-[bis(2-hidroxietil)amino]etanosulfónico), solución salina tamponada con fosfato y similares. También se puede utilizar un agente de ajuste del pH tal como hidróxido de sodio.

25 El reactivo de la presente realización se puede obtener disolviendo el tensioactivo anterior, el agente solubilizante, el colorante para teñir el ácido nucleico y el componente o los componentes opcionales en un medio apropiado con las concentraciones descritas anteriormente. El medio apropiado no está limitado siempre que pueda disolver los componentes anteriores e incluye agua, alcohol, etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), la mezcla de los mismos y similares.

30 El tensioactivo, el agente solubilizante y el colorante anteriores para la tinción de ácido nucleico se pueden utilizar como un único reactivo para mezclarlo con una muestra biológica para el análisis de leucocitos inmaduros. Alternativamente, puede utilizarse un kit de reactivos que contiene un primer reactivo que comprende el tensioactivo y el agente solubilizante y un segundo reactivo que comprende el colorante para teñir el ácido nucleico para el análisis de leucocitos inmaduros.

35 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un kit de reactivos como se describe en las reivindicaciones para el análisis de leucocitos inmaduros que comprende un primer reactivo que comprende un agente tensioactivo que puede dañar las membranas celulares de los eritrocitos y leucocitos maduros y un agente solubilizante que puede contraer las células sanguíneas dañadas y que tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg, y un segundo reactivo que comprende un colorante para teñir el ácido nucleico.

40 Las concentraciones de tensioactivo y agente solubilizante en el primer reactivo anterior pueden ser tales que las concentraciones de las mismas descritas anteriormente para el reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros se puedan obtener cuando el primer reactivo se mezcla con el segundo reactivo. La presión osmótica del primer reactivo se puede ajustar al intervalo deseado disolviendo el tensioactivo y el agente solubilizante en el medio apropiado descrito anteriormente y ajustando apropiadamente la cantidad del agente tamponador, si se desea. Los

45 sacáridos y aminoácidos anteriores y similares se pueden utilizar para el ajuste.

La concentración del colorante para teñir el ácido nucleico en el segundo reactivo puede ser tal que la concentración del mismo descrita anteriormente para el reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros se puede obtener cuando el segundo reactivo se mezcla con el primer reactivo. Es preferible que el segundo reactivo sea aquel en el que el colorante para teñir el ácido nucleico se disuelva en un disolvente orgánico tal como etilenglicol debido a que se puede mejorar la estabilidad de almacenamiento del colorante.

50 El reactivo y el kit de reactivos se pueden utilizar para el análisis de leucocitos inmaduros mediante la preparación de una muestra de medición mezclando el reactivo o los reactivos con una muestra biológica y sometiendo la muestra de medición a un citómetro de flujo. La razón de mezcla (en volumen) de la muestra biológica y el reactivo o la suma del primer y segundo reactivos en el kit de reactivos es preferiblemente de 1:10 a 1:1.000.

En el kit de reactivos, la razón de mezcla (en volumen) del primer y segundo reactivos es preferiblemente de 1000:1 a 10:1.

Quando se utiliza el kit de reactivos, el orden de adición para mezclar el reactivo respectivo en el kit de reactivos y la muestra biológica no está específicamente limitado. Preferiblemente, el primer reactivo y el segundo reactivo se mezclan y a continuación se añade a esto la muestra biológica.

5 Las condiciones para mezclar el reactivo o los reactivos en el kit de reactivos y la muestra biológica se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el reactivo o los reactivos. Por ejemplo, la temperatura y el tiempo de reacción se pueden seleccionar entre 20 a 40°C y de 3 a 30 segundos, respectivamente. Cuando la temperatura de reacción es alta, el tiempo de reacción puede ser más corto; cuando la temperatura de reacción es baja, el tiempo de reacción puede ser más largo.

10 Cuando se utiliza un citómetro de flujo para el análisis, se puede aplicar luz a las células sanguíneas en la muestra de medición que fluye a través de una celda de flujo para obtener información óptica tal como luz dispersada, fluorescencia y similares. La especie y el número de células sanguíneas se pueden medir basándose en la información.

15 Específicamente, el análisis anterior se puede llevarse a cabo utilizando el citómetro de flujo que se muestra en la Fig. 1. A continuación, se describe una medición de mieloblastos como un ejemplo de las presentes realizaciones.

20 Una muestra de medición descargada desde una boquilla 6 fluye a través de una porción con orificio de una celda de flujo 23. Las células sanguíneas en la muestra pasan a través de la porción con orificio en un conducto. La luz emitida desde una fuente de luz 21 se aplica a través de una lente colimadora 22 a las células sanguíneas que fluyen a través de la celda de flujo 23. La luz dispersada lateral, la fluorescencia lateral y la luz dispersada frontal se generan aplicando luz a las células sanguíneas. La luz dispersada lateral se introduce en un detector de luz dispersada lateral (tubo fotomultiplicador) 29 a través de una lente de condensación 27 y un espejo dicroico 28. La fluorescencia lateral se introduce en un detector lateral de fluorescencia (tubo fotomultiplicador) 31 a través de la lente condensadora 27, el espejo dicroico 28, un filtro 28' y una placa con diafragma 30. La luz dispersada frontal se introduce en un detector de luz dispersada frontal (fotodiodo) 26 a través de una lente de condensación 24 y una placa con diafragma 25.

30 La señal de luz dispersada frontal, la señal de luz dispersada lateral y la señal de fluorescencia lateral generadas desde el detector de luz dispersada frontal 26, el detector de luz dispersada lateral 29 y el detector de fluorescencia lateral 31, respectivamente, son amplificadas por los amplificadores 32, 33 y 34 e introducida en una sección de análisis 35.

35 La sección de análisis 35 calcula las intensidades de la luz dispersada frontal, la luz dispersada lateral y la fluorescencia, respectivamente, a partir de la señal de luz dispersada frontal, la señal de luz dispersada lateral y la señal de fluorescencia lateral introducidas. La sección de análisis 35 genera un primer mapa de distribución bidimensional que tiene dos ejes de intensidad de luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia e identifica una región donde aparecen todos los leucocitos en la muestra (región de leucocitos totales) en el mapa de distribución bidimensional. Adicionalmente, la sección de análisis genera un segundo mapa de distribución bidimensional que tiene dos ejes de intensidad de luz dispersada lateral e intensidad de fluorescencia de las células que aparece en la región total de leucocitos. En este mapa de distribución bidimensional, se establecen una región donde aparecen leucocitos maduros (región de leucocitos maduros), una región donde aparecen linfocitos (región de linfocitos), una región donde aparecen monocitos (región de monocitos) y una región donde aparecen granulocitos (región de granulocitos). Adicionalmente, se identifica una región donde aparecen mieloblastos (región de mieloblastos 1) y una región donde aparecen granulocitos inmaduros (región de granulocitos inmaduros).

45 A continuación, se genera un tercer mapa de distribución bidimensional que tiene dos ejes de intensidad de luz dispersada lateral y la intensidad de luz dispersada frontal, y se identifica una región donde aparecen mieloblastos (región de mieloblastos 2) en este mapa de distribución bidimensional. El número de mieloblastos contenidos en la muestra se calcula como el número de células que aparecen en la región de mieloblastos 1 y mieloblastos 2, y el número de granulocitos inmaduros contenidos en la muestra se calcula como el número de células que aparecen en la región de granulocitos inmaduros. Circunstancialmente, debido a que los mieloblastos tienen un tamaño grande y tienen un solo núcleo, generan una fuerte intensidad de luz dispersada frontal y una débil intensidad de luz dispersada lateral. Además, generan una intensidad de fluorescencia débil puesto que apenas están teñidas, como se describió anteriormente. Debido a que los granulocitos inmaduros tienen un gran tamaño y sus núcleos están segmentados, generan una fuerte intensidad de luz dispersada frontal e intensidad de luz dispersada lateral. Además, generan una débil intensidad de fluorescencia porque apenas están teñidas.

60 La presente invención proporciona adicionalmente un método según se describe en las reivindicaciones adjuntas para analizar leucocitos inmaduros que comprende mezclar el presente reactivo para análisis o los reactivos en el kit de reactivos para análisis con una muestra biológica.

En la realización preferida del método de la presente invención, la concentración del agente tensioactivo en el

reactivo para análisis o el reactivo mixto del primer y segundo reactivos en el kit de reactivos para análisis es preferiblemente de 750 a 10.000 ppm y más preferiblemente de 1.000 a 2.500 ppm.

5 En otras realizaciones preferidas del método de la presente invención, cuando el derivado de sarcosina o la sal del mismo se utiliza como agente solubilizante, la concentración del agente solubilizante en el reactivo o en el reactivo mixto del primer y segundo reactivo del reactivo el kit es de 100 a 400 ppm; cuando se utiliza el derivado de ácido cólico, es de 50 a 1.300 ppm; y cuando se utiliza la metilglucanamida, es de 500 a 1.100 ppm.

10 De acuerdo con estas realizaciones preferidas, los basófilos y los mieloblastos en la muestra biológica se pueden discriminar más claramente.

### Ejemplos

15 La presente invención se explicará mediante los siguientes ejemplos con más detalle. Sin embargo, la presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos.

#### (Ejemplo 1)

20 Se prepararon un primer reactivo y un segundo reactivo que tenían la siguiente composición.

#### <Primer reactivo>

|  |          |
|--|----------|
| Polioxietilen(20)oleil éter (Nikko Chemicals)      | 2000 ppm |
| N-lauroilsarcosinato de sodio (producto comercial) | 125 ppm  |
| MOPSO (producto comercial)                         | 10 mM    |
| Agua purificada                                    | 1 L      |

25 Los componentes anteriores se mezclaron y el pH se ajustó a 7,0 con NaOH. La presión osmótica y la conductividad eléctrica del primer reactivo fueron 20 mOsm/kg y 0,78 mS/cm, respectivamente.

#### <Segundo reactivo>

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Colorante para teñir ácido nucleico | 50 ppm |
| Etilenglicol                        | 1 L    |

30 El colorante se disolvió en etilenglicol para preparar el segundo reactivo. Como colorante para teñir el ácido nucleico, se utilizó el colorante C descrito anteriormente.

35 El primer reactivo (980 µL), 20 µL del segundo reactivo y 20 µl de una muestra de sangre obtenida de un donante sano (siendo la razón de basófilos de 2,1%, sin contener mieloblastos) se mezclaron y se hicieron reaccionar a 35°C durante 19 segundos para preparar un muestra de medición. La muestra de medición obtenida se sometió al citómetro de flujo mostrado en la Fig. 1 y se midieron la intensidad de la luz dispersada lateral, la intensidad de la luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia. La fuente de luz utilizada fue láser semiconductor rojo.

40 Basándose en la intensidad de la luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia obtenidas, se generó un primer mapa de distribución bidimensional (diagrama de dispersión) que tenía dos ejes de intensidad de luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia. De acuerdo con este primer mapa de distribución bidimensional, se identificó la región leucocitaria total. El número de células que aparecen en la región leucocitaria total identificada se calculó como el número total de leucocitos contenidos en la muestra. La Fig. 2 (1) muestra el diagrama de dispersión obtenido. Para las células que aparecen en la región leucocitaria total identificada, se generaron un segundo mapa de distribución bidimensional (diagrama de dispersión) que tiene dos ejes de intensidad de luz dispersada lateral e intensidad de fluorescencia y un tercer mapa de distribución bidimensional (diagrama de dispersión) que tiene dos ejes de la intensidad de luz dispersada lateral y la intensidad de luz dispersada frontal. En el segundo y tercer mapas de distribución bidimensional, se establecieron las regiones de mieloblastos 1 y 2. Las Fig. 2 (2) y (3) muestran los diagramas de dispersión obtenidos. El número de células que aparecen en las regiones de mieloblastos 1 y 2 se calculó como el número de mieloblastos contenidos en la muestra. La Fig. 2(4) muestra el diagrama de dispersión obtenido.

50 Como se puede observar en las Fig. 2 (1) a (4), no se detecta señal en el diagrama de dispersión en una región donde aparece la señal potencial de los mieloblastos, debido a que no hay mieloblastos en la muestra de sangre del

donante sano. No aparece ninguna señal para los eritrocitos lisados. Adicionalmente, los basófilos no aparecen en la región de mieloblastos porque están teñidos con la misma intensidad que otros leucocitos maduros.

5 Se calculó que la proporción de mieloblastos a leucocitos totales (proporción de mieloblastos = número de mieloblastos/número total de leucocitos x 100) era de 0%. La proporción de mieloblastos confirmada visualmente también fue de 0%.

**(Ejemplo 2)**

10 Se preparó un primer reactivo que tenía la siguiente composición.

**<Primer reactivo>**

|  |          |
|--|----------|
| Polioxietilen(20)oleil éter (Nikko Chemicals)      | 1500 ppm |
| N-lauroilsarcosinato de sodio (producto comercial) | 225 ppm  |
| MOPSO (producto comercial)                         | 10 mM    |
| Agua purificada                                    | 1 L      |

15 Los componentes anteriores se mezclaron y el pH se ajustó a 7,25 con NaOH. La presión osmótica y la conductividad eléctrica del primer reactivo fueron 20 mOsm/kg y 0,78 mS/cm, respectivamente.

20 La muestra de sangre del donante sano se analizó como se describe en el Ejemplo 1, excepto que se utilizó el primer reactivo anterior en lugar del primer reactivo utilizado en el Ejemplo 1.

Las Fig. 3 (1) a (4) muestran los diagramas de dispersión obtenidos.

25 Como se puede observar en las Fig. 3 (1) a (4), no se detecta señal en el diagrama de dispersión en una región donde aparece la señal potencial de los mieloblastos, debido a que no hay mieloblastos en la muestra de sangre del donante sano. No aparece ninguna señal para los eritrocitos lisados. Además, los basófilos no aparecen en la región de mieloblastos porque están teñidos con la misma intensidad que otros leucocitos maduros.

30 La proporción de mieloblastos a leucocitos totales (proporción de mieloblastos = número de mieloblastos/número total de leucocitos x 100) era de 0%. La proporción de mieloblastos confirmada visualmente también fue de 0%.

**(Ejemplo 3)**

35 El análisis se realizó como se describe en el Ejemplo 1 excepto que en lugar de la muestra de sangre del donante sano, se utilizó una muestra de sangre que contenía mieloblastos de un paciente con leucemia mieloide aguda, y se obtuvieron la intensidad de luz dispersada lateral, la intensidad de luz dispersada frontal y la intensidad de fluorescencia.

40 Las Fig. 4 (1) a (4) muestran los diagramas de dispersión obtenidos.

Basándose a los diagramas de dispersión de las Fig. 4 (1) a (4), la proporción de mieloblastos a leucocitos totales fue de 1,2%. La proporción de mieloblastos confirmada visualmente de la misma muestra de sangre fue de 4,0%.

**(Ejemplos 4 a 9)**

Se prepararon un primer reactivo y un segundo reactivo que tenían la siguiente composición.

[Tabla 1]

|                     |                             | Ejemplos (Fig.) |            |            |            |            |             |              |
|---------------------|-----------------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
|                     |                             | 4 (Fig. 5)      | 5 (Fig. 6) | 6 (Fig. 7) | 7 (Fig. 8) | 8 (Fig. 9) | 9 (Fig. 10) | 10 (Fig. 11) |
| Primer reactivo     |                             |                 |            |            |            |            |             |              |
| Tensioactivos (ppm) | Polioxietilen(15)oleil éter |                 |            |            |            | 2000       | 4000        |              |

|                            |                               | Ejemplos (Fig.) |            |            |            |            |             |              |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|
|                            |                               | 4 (Fig. 5)      | 5 (Fig. 6) | 6 (Fig. 7) | 7 (Fig. 8) | 8 (Fig. 9) | 9 (Fig. 10) | 10 (Fig. 11) |
| Primer reactivo            |                               |                 |            |            |            |            |             |              |
|                            | Polioxietilen(20)oleil éter   | 2500            | 5000       | 10000      | 20000      | 8000       | 16000       | 2500         |
| Agente solubilizante (ppm) | N-lauroilsarcosinato de sodio | 125             | 250        | 325        | 250        | 375        | 375         | 125          |
| Agente tamponador (mM)     | HEPES                         |                 | 30         | 30         | 30         | 30         | 30          |              |
|                            | BES                           | 10              |            |            |            |            |             |              |
|                            | MOPSO                         |                 |            |            |            |            |             | 10           |
| Medio                      | Agua purificada               | 1L              | 1L         | 1L         | 1L         | 1L         | 1L          | 1L           |
| pH                         |                               | 7,0             | 6,75       | 6,75       | 6,65       | 7,25       | 7,25        | 7,0          |
| Presión osmótica (mOsm/kg) |                               | 50              | 50         | 50         | 50         | 50         | 50          | 50           |
| Segundo reactivo           |                               |                 |            |            |            |            |             |              |
| Colorante (ppm)            | Colorante A                   | 50              | 50         | 50         | 50         | 50         | 50          | 50           |
| Medio                      | Etilenglicol                  | 1L              | 1L         | 1L         | 1L         | 1L         | 1L          | 1L           |

El primer reactivo (980 µL), 20 µL del segundo reactivo y 20 µl de cualquiera de las siguientes muestras de sangre se mezclaron y se hicieron reaccionar a 35°C durante 13 segundos (17,5 segundos para los Ejemplos 4 y 11) para preparar muestras de medición. Se obtuvieron los diagramas de dispersión como se describe en los Ejemplos 1 a 3.

Como muestra de sangre, se utilizaron una muestra de sangre de un paciente con leucemia que contenía mieloblastos (en lo sucesivo denominada "muestra de mieloblastos") o una muestra de sangre de un paciente con mieloma múltiple que no contenía mieloblastos (los eritrocitos se lisaron inadecuadamente) (en lo sucesivo denominada "muestra con hemólisis inadecuada").

Las Fig. 5 a 11 muestran los diagramas de dispersión obtenidos. En la figura respectiva de las Fig. 5 a 11, (A) muestra un diagrama de dispersión cuando se utilizó la muestra de mieloblastos como muestra de sangre y (B) muestra un diagrama de dispersión cuando se utilizó la muestra de hemólisis incorrecta como muestra de sangre. Normalmente, los mieloblastos se detectan en la región "BL" en los diagramas de dispersión.

El eje x y el eje y de los diagramas de dispersión de las Fig. 5 a 11 muestran la intensidad de la luz dispersada lateral y la intensidad de fluorescencia, respectivamente. "Ly", "Mo", "Gran" e "IG" representan las secciones en las que aparecen linfocitos, monocitos, granulocitos y granulocitos inmaduros, respectivamente.

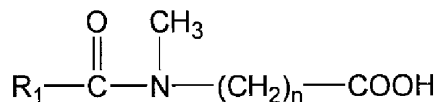
Basándose en estos diagramas de dispersión, las proporciones de mieloblastos a leucocitos totales se calcularon y describieron como "región BL" en las Fig. 6 a 11.

Los resultados de las Fig. 5 a 11 muestran que cuando los análisis se llevaron a cabo utilizando el reactivo o los reactivos de la presente invención, se detectaron mieloblastos a partir de la muestra de mieloblastos y la proporción de mieloblastos fue muy baja en la muestra de hemólisis inadecuada. Además, el espectro de eritrocitos, que se detecta cuando se utiliza el reactivo convencional apenas se detectó en el análisis de la muestra de hemólisis inadecuada. Por lo tanto, se muestra que al utilizar el presente o los presentes reactivos, se pueden obtener resultados de análisis precisos debido a que los mieloblastos no se detectan incorrectamente incluso cuando se analizaron muestras de hemólisis inadecuadas. Además, la región mieloblástica y la región de fantasmas de eritrocitos no se solaparon en el diagrama de dispersión cuando se detectaron fantasmas de eritrocitos (datos no mostrados). A saber, se muestra que al utilizar el presente o los presentes reactivos, los mieloblastos pueden distinguirse claramente de los fantasmas de eritrocitos y los leucocitos inmaduros pueden medirse con precisión incluso a partir de muestras de sangre tales como las de pacientes con mieloma múltiple, debido a que los fantasmas de eritrocitos no aparecen en la región de los mieloblastos en los diagramas de dispersión.

**REIVINDICACIONES**

1. Un reactivo para el análisis de leucocitos inmaduros en sangre periférica que comprende:

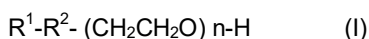
5 un tensioactivo que es un tensioactivo no iónico de polioxietileno, un agente solubilizante que es un derivado de sarcosina que tiene la siguiente fórmula estructural o sus sales,



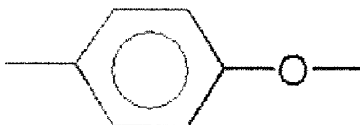
10 en donde R<sub>1</sub> es un grupo alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>; y n es 1 a 5, y un colorante para teñir el ácido nucleico, en donde la concentración del tensioactivo en el reactivo es de 500 a 15.000 ppm y el reactivo tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg.

15 2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el derivado de sarcosina es N-lauroilsarcosinato sódico, lauroil metil β-alanina sódica o lauroilsarcosina.

20 3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tensioactivo no iónico de polioxietileno tiene la siguiente fórmula (I):



25 (en donde R<sup>1</sup> representa una C<sub>9-25</sub> grupo alquilo, alqueniilo o alquinilo; R<sup>2</sup> representa -O-, -COO- o



30 y n es un número entero de 10 a 40).

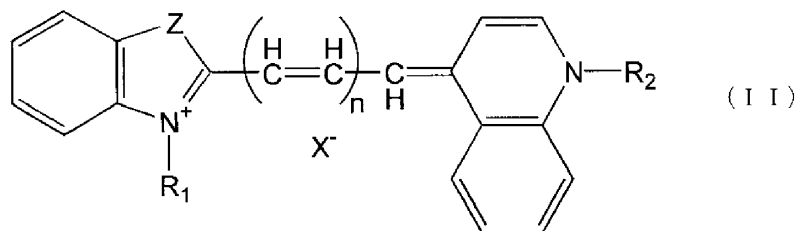
4. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tensioactivo no iónico de polioxietileno es polioxietilen oleil éter.

35 5. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el polioxietilen oleil éter tiene la fórmula (I) en donde n es de 15 a 20.

6. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la concentración del agente solubilizante en el reactivo es de 100 a 400 ppm.

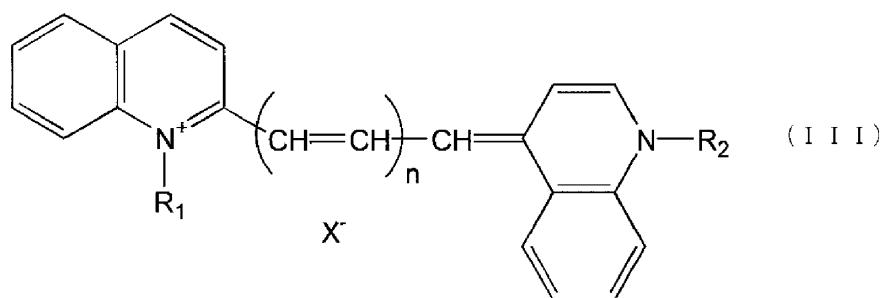
40 7. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el colorante para teñir el ácido nucleico es al menos un colorante seleccionado del grupo que consiste en:

(1) un colorante que tiene la siguiente fórmula (II):



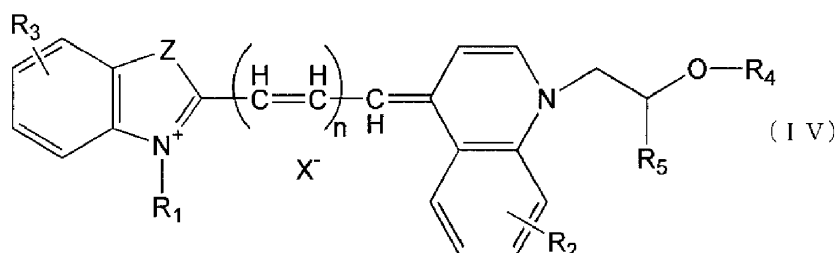
45 en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son un grupo alquilo inferior; n es 1 o 2; X<sup>-</sup> es un anión; y Z es un átomo de azufre, un átomo de oxígeno o un átomo de carbono que está sustituido con un grupo alquilo inferior;

50 (2) un colorante que tiene la siguiente fórmula (III):



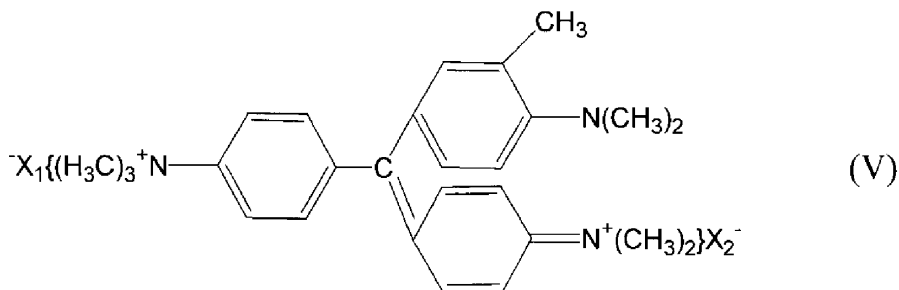
en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son un grupo alquilo inferior; n es 1 o 2; y X<sup>-</sup> es un anión:

5 (3) un colorante que tiene la siguiente fórmula (IV):



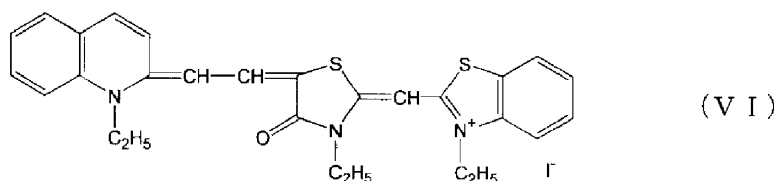
10 en donde R<sub>1</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior; R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo inferior o un grupo alcoxi inferior; R<sub>4</sub> es un átomo de hidrógeno, un grupo acilo o un grupo alquilo inferior; R<sub>5</sub> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior opcionalmente sustituido; Z es un átomo de azufre, un átomo de oxígeno o un átomo de carbono que está sustituido con un grupo alquilo inferior; n es 1 o 2; y X<sup>-</sup> es un anión;

15 (4) un colorante que tiene la siguiente fórmula (V):

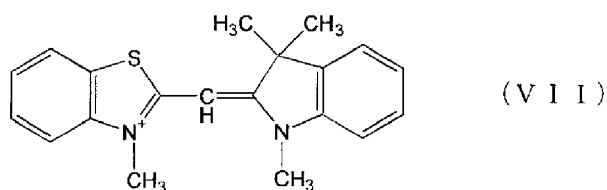


en donde X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son independientemente Cl o I;

20 (5) un colorante que tiene la siguiente fórmula (VI):

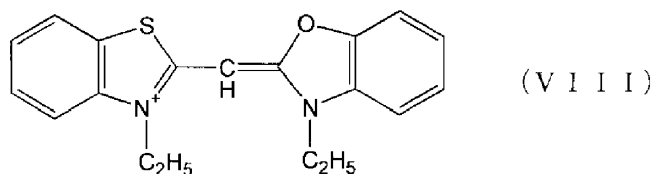


25 (6) un colorante que tiene la siguiente fórmula (VII):



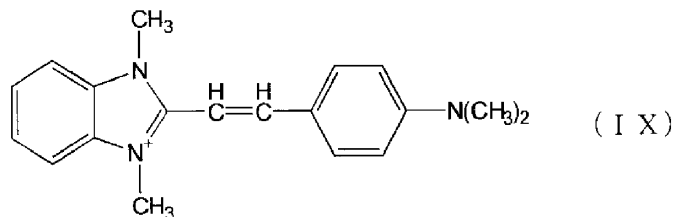


(7) un colorante que tiene la siguiente fórmula (VIII):

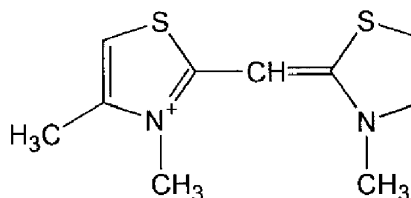


5

(8) un colorante que tiene la siguiente fórmula (IX):



(9) un colorante que tiene la siguiente fórmula (X):

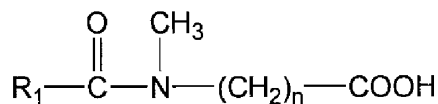


(10) yoduro de propidio o bromuro de etidio;  
 (11) Heterodímero de etidio-acridina, diazida de etidio, homodímero-1 de etidio, homodímero-2 de etidio, monoazida de etidio, bis[[3-[4-[[3-metilbenzotiazol-3-il]-2-il]metileno]-1,4-dihidroquinolin]-1-il]propil]dimetilaminio]tetrayoduro de trimetileno (TOTO-1), diyoduro de 4-[(3-metilbenzotiazol-2(3H)-iliden)metil]-1-[3-(trimetilaminio)propil]quinolinio (TO-PRO-1), tetrayoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis[3-[4-[3-[(3-metilbenzotiazol-3-il)-2-il]-2-propeniliden]-1,4-dihidroquinolin-1-il]propil]1,3-propanodiamina (TOTO-3), o diyoduro de 2-[3-[1-[3-(trimetilaminio)propil]1,4-dihidroquinolin]-4-iliden]-1-propenil]3-metilbenzotiazol-3-io (TO-PRO-3).

8. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene un pH de 5,0 a 9,0.

9. Un kit de reactivos para el análisis de leucocitos inmaduros en sangre periférica que comprende:

un primer reactivo que comprende un tensioactivo que es un tensioactivo no iónico de polioxi-etileno y un agente solubilizante que es un derivado de sarcosina que tiene la siguiente fórmula estructural o sus sales,



en donde  $R_1$  es un grupo alquilo  $C_{10}-C_{22}$ ; y  $n$  es de 1 a 5, en donde la concentración del agente tensioactivo en el reactivo es de 500 a 15.000 ppm, y que tiene una presión osmótica no inferior a 10 mOsm/kg e inferior a 150 mOsm/kg, y

un segundo reactivo que comprende un colorante para teñir ácido nucleico.

10. El kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho derivado de sarcosina es N-lauroilsarcosinato sódico, lauroil metil-β-alanina sódica o lauroilsarcosina.

11. El kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde la concentración del agente solubilizante en el reactivo es de 100 a 400 ppm.

12. Un método para clasificar leucocitos que comprende las etapas de:

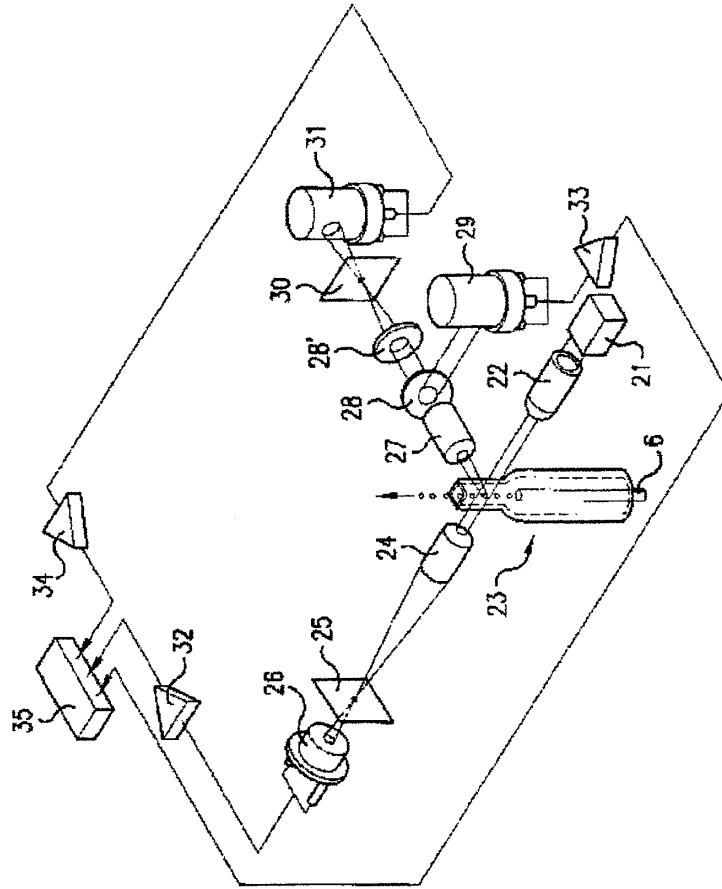
mezclar sangre periférica que posiblemente contiene leucocitos inmaduros con un reactivo como se define en la Reivindicación 1, para teñir ácido nucleico de leucocitos inmaduros, en donde la razón de mezcla (en volumen) de la sangre periférica y el reactivo es 1:10 a 1:1.000; y

5 medir al menos la luz dispersada y al menos la fluorescencia de los leucocitos inmaduros tratados en la etapa anterior para clasificar los leucocitos inmaduros basándose en las diferencias de intensidades de la luz dispersada y la fluorescencia.

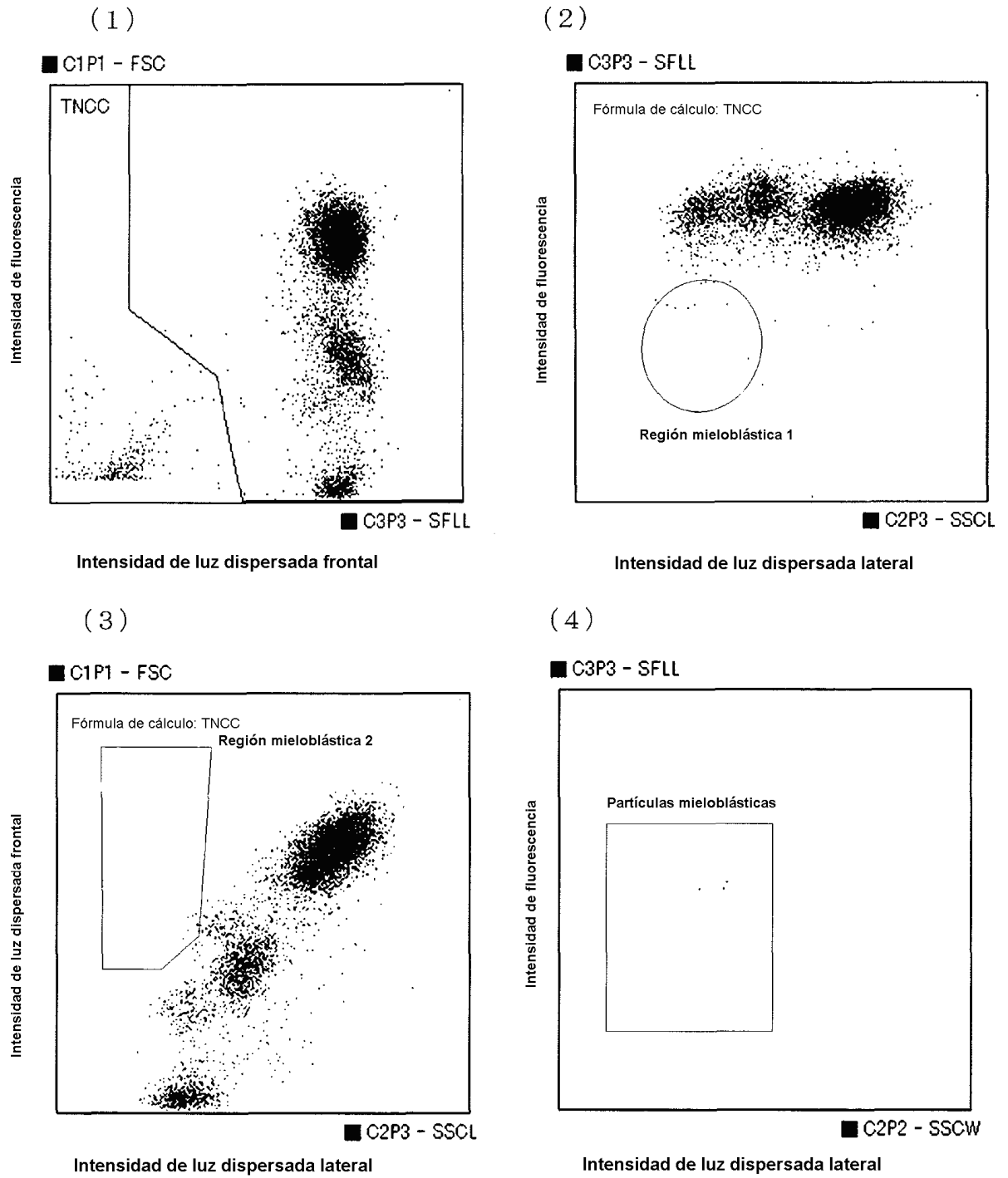
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho derivado de sarcosina es N-lauroilsarcosinato sódico, lauroil metil- $\beta$ -alanina sódica o lauroilsarcosina.

10 14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la concentración del agente solubilizante en el reactivo es de 100 a 400 ppm.

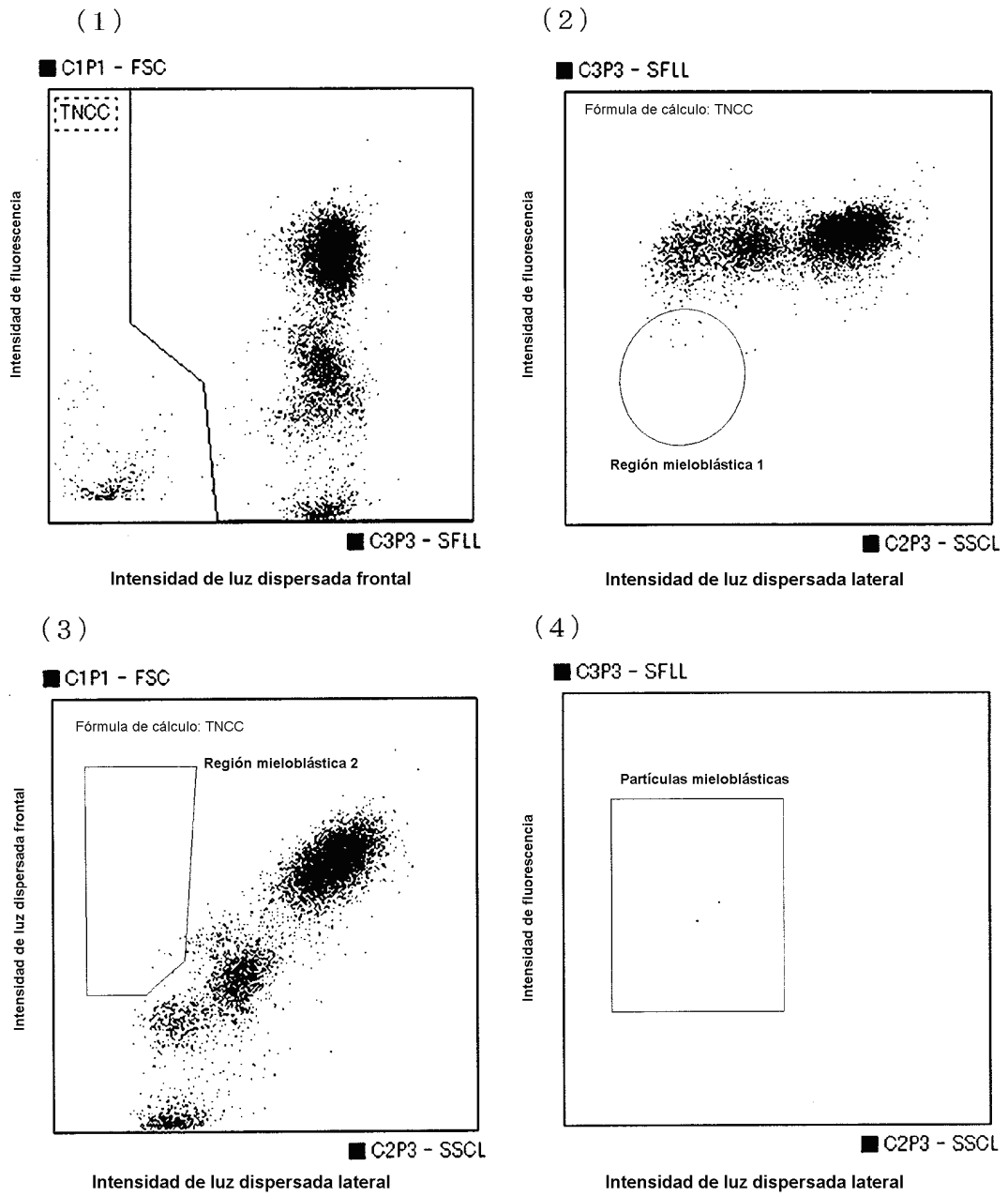
[Fig. 1]



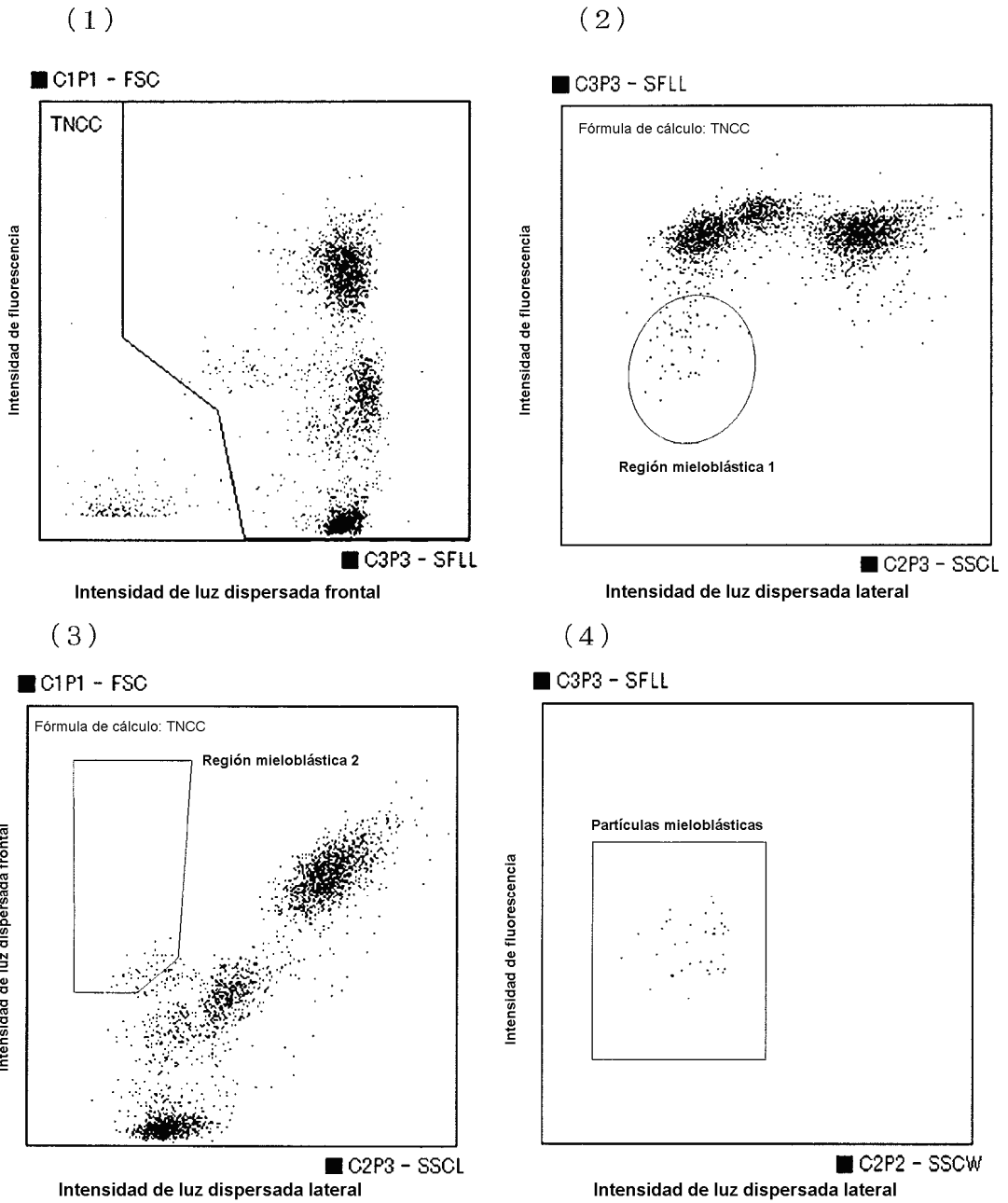
[Fig. 2]



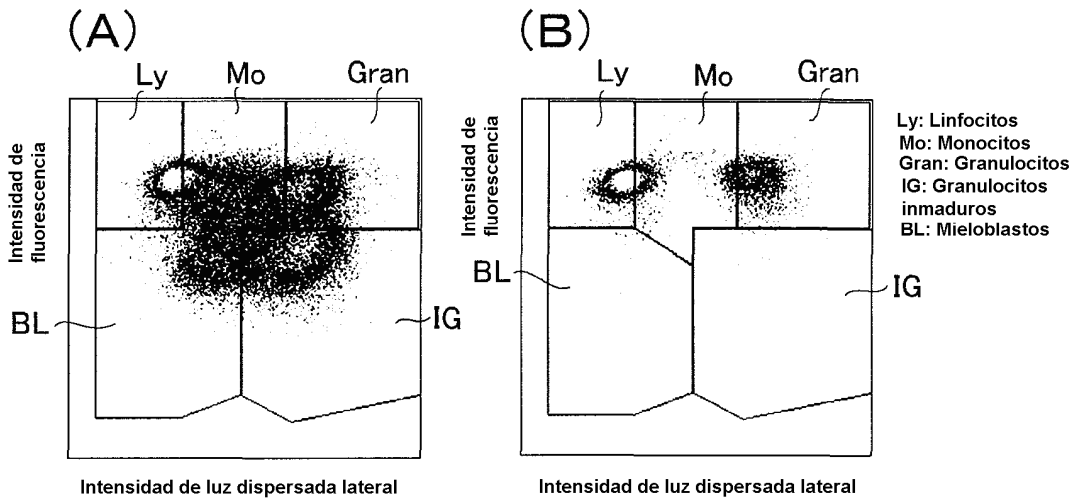
[Fig. 3]



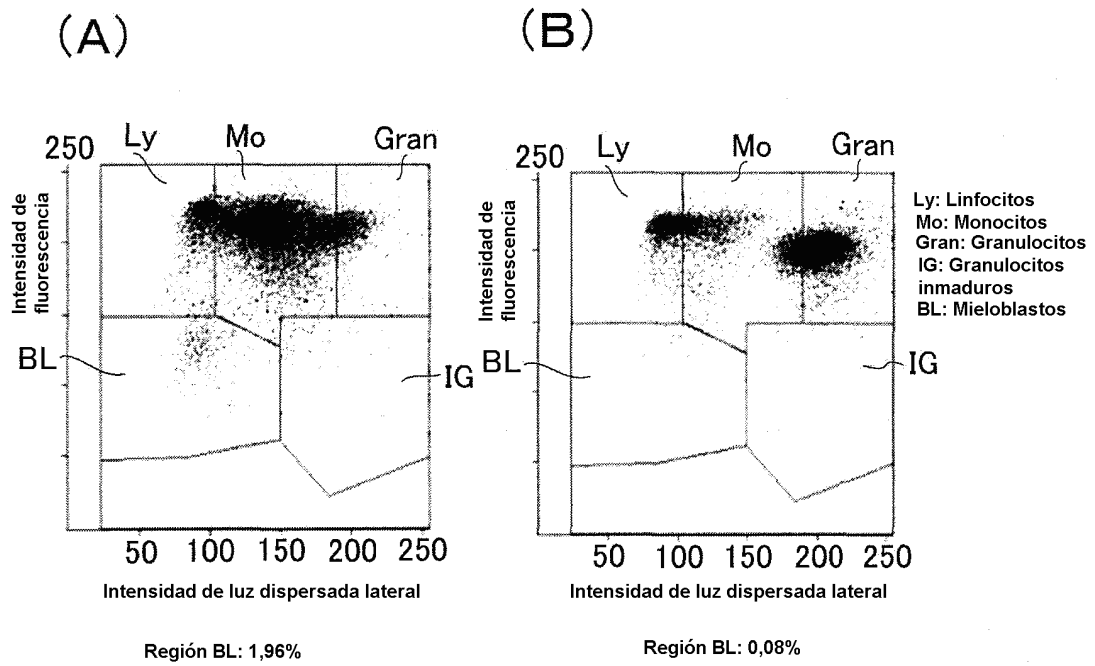
[Fig. 4]



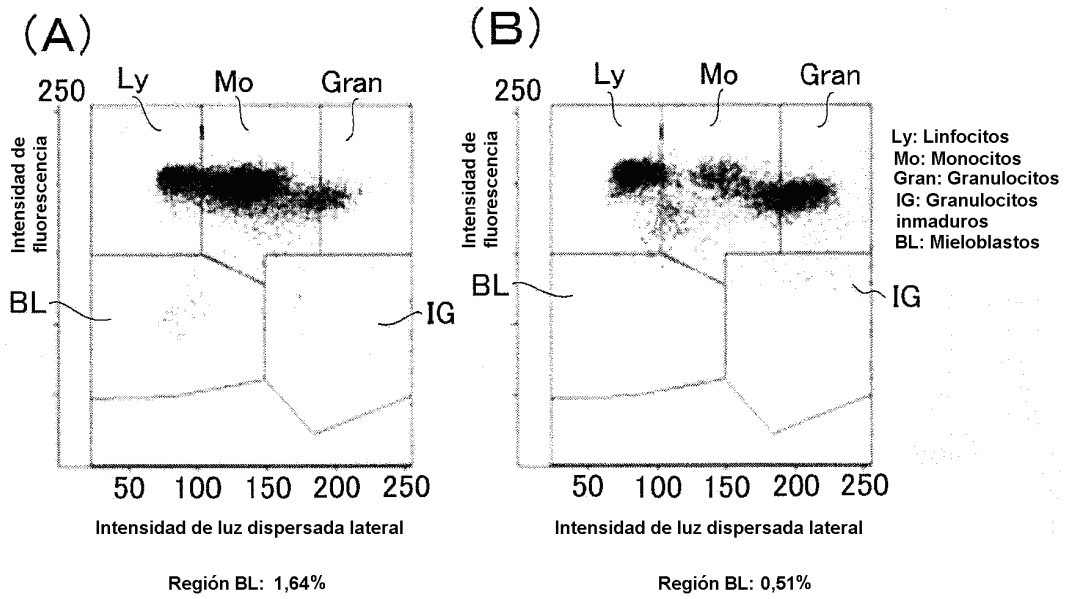
[Fig. 5]



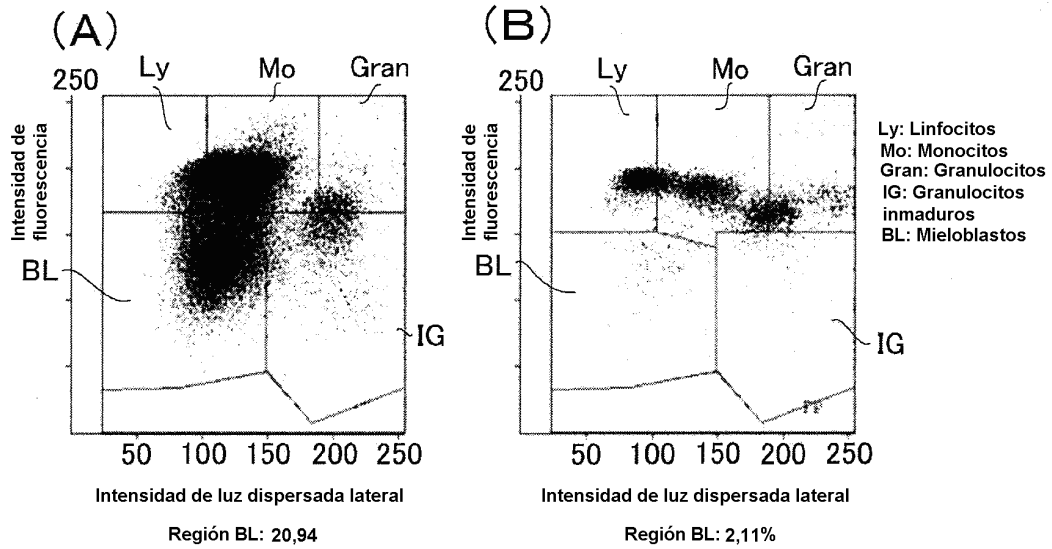
[Fig. 6]



[Fig. 7]

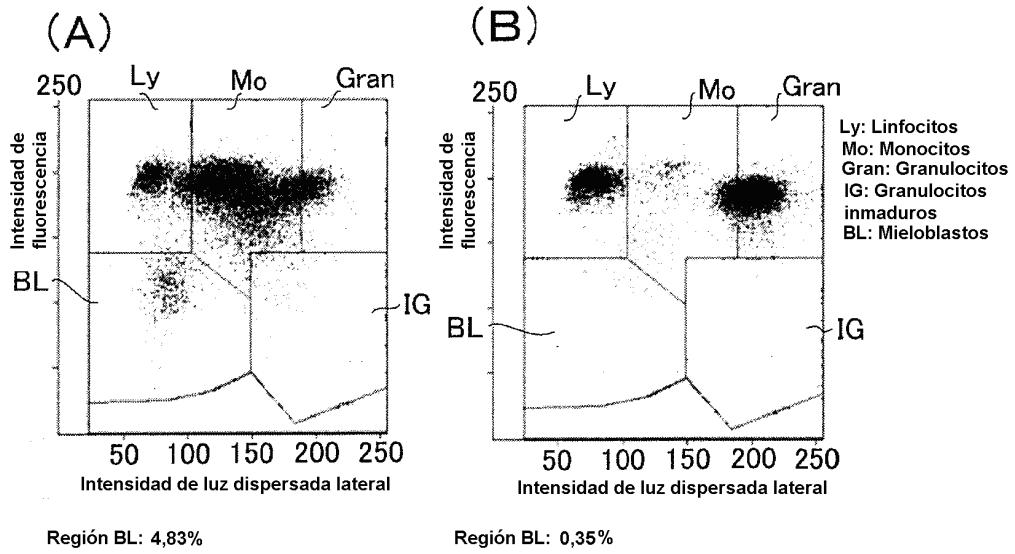


[Fig. 8]

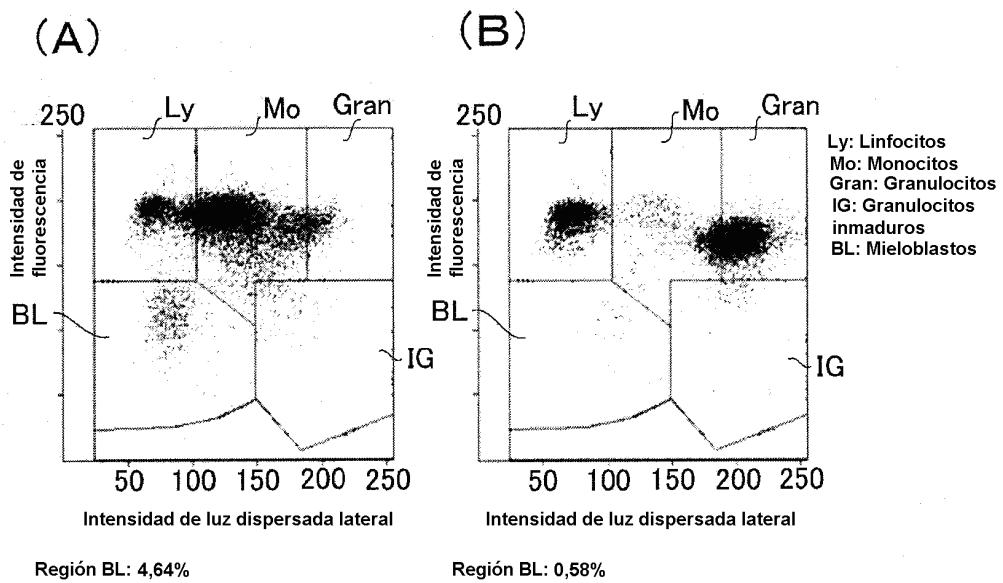




[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]

