



(11) **EP 1 215 135 B1**

(12) **FASCICULE DE BREVET EUROPEEN**

(45) Date de publication et mention
de la délivrance du brevet:
17.11.2010 Bulletin 2010/46

(51) Int Cl.:
B65D 81/30 ^(2006.01) **B65D 1/02** ^(2006.01)

(21) Numéro de dépôt: **01430036.2**

(22) Date de dépôt: **05.12.2001**

(54) **Flacon pour colorants photosensibles**

Flasche für lichtempfindliche Farbstoffe

Bottle for photosensitive dyes

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE TR**

(30) Priorité: **15.12.2000 FR 0016445**

(43) Date de publication de la demande:
19.06.2002 Bulletin 2002/25

(73) Titulaire: **Société Anonyme dite Immunotech
13276 Marseille Cedex 9 (FR)**

(72) Inventeurs:
• **Daziano, Jean-Pierre
13013 Marseille (FR)**

• **van Agthoven, André
13009 Marseille (FR)**

(74) Mandataire: **Perrey, Ralf et al
Müller-Boré & Partner
Grafinger Strasse 2
81671 München (DE)**

(56) Documents cités:
GB-A- 2 086 342 US-A- 6 117 506

• **PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 498
(P-1609), 8 septembre 1993 (1993-09-08) & JP 05
127526 A (MITA IND CO LTD), 25 mai 1993
(1993-05-25)**

EP 1 215 135 B1

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la publication de la mention de la délivrance du brevet européen au Bulletin européen des brevets, toute personne peut faire opposition à ce brevet auprès de l'Office européen des brevets, conformément au règlement d'exécution. L'opposition n'est réputée formée qu'après le paiement de la taxe d'opposition. (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

Description

[0001] La présente invention concerne de nouveaux conditionnements pour colorants photosensibles et une nouvelle méthode de conditionnement de réactifs à base de fluorochromes pour la cytométrie.

[0002] La cytométrie de flux est une technique d'analyse de cellules très utilisée depuis des décennies. Cette technique met en jeu au moins un fluorochrome.

[0003] C'est un outil puissant pour l'analyse antigénique cellulaire. Cette technique permet d'analyser plusieurs cibles antigéniques en même temps grâce à des combinaisons d'anticorps conjugués à des fluorochromes. Les principaux fluorochromes utilisés en cytométrie sont la fluorescéine isothiocyanate (FITC), la phycoérythrine (PE), l'allophycocyanine (APC), le PercP, les tandems phycoérythrine-cyanine 5 (PC5), phycoérythrine-cyanine 7 (PC7) et phycoérythrine-texas red (ECD ou PETR). Ces fluorochromes absorbent les radiations lumineuses particulièrement à 488 nm et 633 nm qui sont les principales longueurs d'ondes d'émission des lasers utilisés sur les cytomètres. Les tandems PC5, PC7, ECD utilisent le principe du transfert d'énergie, c'est à dire que le laser du cytomètre excite la molécule dans la zone spectrale de la phycoérythrine qui restitue l'énergie absorbée à la molécule accepteuse (cyanine 5, cyanine 7 ou Texas red) qui va elle même la restituer sous forme radiative à sa longueur d'onde d'émission.

[0004] Les colorants tandems absorbent néanmoins la lumière dans toute la zone spectrale et particulièrement dans la zone du visible (400-800 nm) et la demanderesse s'est rendue compte que ces fluorochromes, seuls ou en tandem, faisaient l'objet de dégradations sensibles pendant leur conservation.

[0005] Ces dégradations induisent une détérioration de l'efficacité du transfert énergétique qui conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine à 580 nm. Ce phénomène se traduit en cytométrie par une augmentation de fluorescence (appelée fuite) dans le canal de la phycoérythrine (FL2) pouvant conduire à différents problèmes :

- Apparition de cellules faussement positives
- Nécessité d'augmenter les compensations afin de retrouver les valeurs d'intensité de fluorescence initiales.

[0006] Le dernier point est particulièrement crucial dans le cas des systèmes informatiques de compensation automatique.

[0007] GB-A-2 086 342 décrit un récipient pour des produits qui sont sensibles aux radiations du spectre lumineux notamment du lait, caractérisé en ce que le récipient comprend deux couches qui effectuent la rétention de la lumière avec une longueur d'onde de moins de 800 nm et de 800 nm ou plus haut.

[0008] Le tandem phycoérythrine-allophycocyanine a été décrit depuis près de 20 ans (Glazer et al. Biophys.

J. (1983) 83, 383-386 et les tandems phycoérythrine-cyanine 5 depuis près de 10 ans Lanier et al. Methods (1991) Vol 2 N°3 192-199. Depuis, ce genre de produits est commercialisé dans des flacons de verre brun ou ambré par les Sociétés BECTON DICKINSON, PHARMINGEN, DAKO, IQP, ou CALTAG.

[0009] Il serait donc souhaitable de disposer d'un conditionnement de fluorochromes assurant la conservation desdits fluorochromes pendant une durée prolongée.

[0010] Après un certain nombre de tests, la demanderesse a émis l'hypothèse que ces fluorochromes pourraient être sensibles à la lumière visible. Elle a alors recouvert les parois latérales des flacons de fluorochromes d'une gaine thermorétractable absorbant la lumière visible. Une amélioration très sensible a alors été observée, ne donnant toutefois pas encore totale satisfaction. Elle a alors procédé à d'autres essais qui n'apportaient pas de progrès supplémentaire.

[0011] En poursuivant encore ses recherches, la demanderesse a découvert avec étonnement que le fait que le fond des flacons gainés ne soit pas protégés suffisait à dégrader les fluorochromes, lorsque les flacons étaient manipulés ou renversés à plat sur leur côté au lieu d'être posés sur leur fond. Elle a alors compris que ces fluorochromes étaient très sensibles aux longueurs d'onde allant de 200 à 900 nanomètres, notamment à la lumière visible, particulièrement aux longueurs d'onde allant de 400 à 700 nanomètres et singulièrement aux longueurs d'onde allant de 400 à 600 nanomètres.

[0012] Selon la demanderesse, la dégradation des tandems aurait pour origine un phénomène d'oxydation photo induit dans lequel les molécules jouent le rôle de photo sensibilisateur, c'est à dire qu'elles sont capables d'activer l'oxygène :

- par transfert de l'énergie lumineuse absorbée avec génération d'oxygène singulet (mécanisme dit de type II),
- par transfert d'électron à l'état excité avec génération de radicaux oxygénés (mécanisme dit de type I).

[0013] L'invention repose sur l'utilisation de flacons opaques aux radiations lumineuses excitatrices des tandems, c'est à dire entre 200 et 900 nm et plus particulièrement entre 400 et 800 nm.

[0014] C'est pourquoi la présente demande a pour objet un conditionnement comprenant un fluorochrome sensible aux longueurs d'onde allant de 200 à 900 nanomètres et singulièrement aux longueurs d'onde allant de 400 à 600 nanomètres placé dans un flacon dont au moins les parois latérales forment un écran efficace aux radiations du spectre lumineux entre 200 et 900 nm, particulièrement aux longueurs d'onde allant de 400 à 800 nanomètres, plus particulièrement de 400 à 700 nanomètres et singulièrement entre 400 et 600 nm.

[0015] Dans la présente demande et dans ce qui suit, les termes «fluorochrome sensible à la lumière visible» désignent un fluorochrome dont la structure est dégradée

par une émission aux longueurs d'onde indiquée, par exemple la fluorescéine isothiocyanate (FITC), la phycoérythrine (PE), l'allophycocyanine (APC), le PercP, les tandems phycoérythrine-cyanine 7 (PC7), phycoérythrine-cyanine 5 (PC5) et phycoérythrine-texas red (ECD ou PETR), de préférence ces deux derniers. Les termes «forment un écran efficace aux radiations» signifient que au moins 95 %, de préférence au moins 98 %, particulièrement au moins 99 % et tout particulièrement 100% des radiations du visible sont stoppées par les parois latérales du flacon en raison de leur structure (nature, traitement ou gainage notamment). Le terme «flacon» désigne de préférence une petite bouteille de préférence à vis, équipée d'un bouchon avec ou sans septum. Le flacon peut être en polyéthylène, polypropylène, polycarbonate, mais de préférence en verre. Sa capacité peut aller de préférence de 50 µl à 50 ml, notamment de 100 µl à 20 ml, particulièrement de 500 µl à 10 ml et tout particulièrement de 1 ml à 10 ml. Un flacon de 5 ml peut par exemple être rempli par 1 à 2 ml de solution.

[0016] On préfère tout particulièrement des flacons de verre de 5 ml environ.

[0017] Dans des conditions préférentielles de mise en oeuvre de l'invention, le fond du flacon forme également un écran efficace aux radiations du spectre visible.

[0018] Il est déjà connu en parfumerie des techniques de gainage ou revêtement de flacons formant un écran efficace aux radiations du spectre visible, utilisées à des fins esthétiques.

[0019] On peut citer par exemple le revêtement par poudrage électrostatique qui consiste à entourer les flacons d'un septum qui est transpercé par une électrode qui est installée dans le flacon à recouvrir. Les flacons sont placés dans une enceinte dans laquelle se trouve une poudre pulvérisée, chargée d'un signe opposé à celui du flacon. La poudre se dépose alors sur le flacon sur lequel elle est fixée par exemple par cuisson dans un four à environ 180°C. Dans le cadre de l'invention, on peut utiliser par exemple une poudre de résine époxy absorbant de préférence dans les longueurs d'ondes ci-dessus indiquées, particulièrement 600 à 800 nanomètres, de couleur noire ou bleue notamment.

[0020] On peut aussi gagner le flacon d'une gaine avantageusement thermorétractable recouvrant de préférence également le fond du flacon.

[0021] On peut encore irradier certains types de verres par rayonnement gamma.

[0022] On peut tout autant effectuer un surmoulage à l'aide d'un film plastique, ce qui offre l'avantage de pouvoir recouvrir le fond des flacons.

[0023] Les conditionnements objet de la présente invention possèdent de très intéressantes propriétés. L'utilisation de flacons recouverts ou traités comme décrit ci-dessus supprime le phénomène d'oxydation photoinduit et confère une excellente stabilité aux conjugués fluorochromes-anticorps ou tandems-anticorps.

[0024] Ces propriétés sont illustrées ci-après dans la partie expérimentale.

[0025] La présente demande a aussi pour objet un procédé de protection de fluorochromes sensibles à la lumière visible et singulièrement aux longueurs d'onde allant de 400 à 600 nanomètres lors de leur conservation, dans lequel on utilise le conditionnement selon la présente invention.

[0026] Les conditions préférentielles de mise en oeuvre des conditionnements ci-dessus décrites s'appliquent également aux autres objets de l'invention visés ci-dessus, notamment au procédé de protection de fluorochromes.

[0027] Les exemples qui suivent illustrent la présente demande.

- les figures 1A, B, C, D et E représentent les résultats de fluorescence obtenus avec des échantillons de conjugués Anticorps anti-CD3-Phycoérythrine-cyanine 5 contenus dans leur flacon d'origine ou d'un flacon selon l'invention, et soumis à l'action de la lumière, et
- les figures 2A, B, C et D représentent les résultats de fluorescence obtenus avec des échantillons de conjugués Anticorps anti-CD19-Phycoérythrine-texas red contenus dans leur flacon d'origine ou d'un flacon selon l'invention, et soumis à l'action de la lumière.

[0028] Plus précisément,

- les figures 1A et 2A concernent un conjugué protégé de la lumière, servant de témoin,
- les figures 1B et 2B concernent un conjugué conditionné dans un flacon de verre commercial BeckmanCoulter Immunotech de la gamme IOTEST,
- les figures 1C et 2C concernent un conjugué conditionné dans un flacon de verre commercial BeckmanCoulter Immunotech de la gamme Cytostat,
- la figure 1D concerne un conjugué conditionné dans un flacon de verre commercial BECTON DICKINSON Pharmingen, et
- les figures 1E et 2D concernent un conjugué conditionné dans un flacon de verre commercial BeckmanCoulter Immunotech de la gamme IOTEST recouvert d'une couche de vernis époxy selon le procédé de poudrage électrostatique de l'exemple 1.

Exemple 1 : Revêtement d'un flacon de verre à l'aide de résine époxy

[0029] On place des flacons commerciaux en verre destinés à recevoir des conjugués Anticorps anti-CD3-Phycoérythrine-cyanine 5 de BeckmanCoulter Immunotech de la gamme IOTEST dans une chaîne mettant en oeuvre les étapes suivantes :

- On lave les flacons.
- On les passe dans un four de séchage.
- On les passe ensuite dans une cabine dans laquelle

les flacons sont recouverts d'un septum transpercé par une électrode.

La poudre de résine époxy Noir mat AKZO référence NOIR MAT 1P200 8391 (nouvelle référence AN052F) de charge opposée à celle de l'électrode pulvérisée dans la cabine s'applique par phénomène électrostatique sur la surface des flacons que l'on fait alors passer dans un four de cuisson à 180°C.

Exemple 2 : Revêtement d'un flacon de verre à l'aide de gaine thermo-rétractable de polyéthylène

[0030] On a recouvert les côtés et le col de flacons commerciaux de 6ml en verre destinés à recevoir des conjugués Anticorps anti-CD3-Phycoérythrine-cyanine 5 de Beckman Coulter Immunotech de la gamme IOTEST à l'aide de gaine thermo-rétractable de polyéthylène commercialisée par la société SLEEVEVER INTERNATIONAL.

Exemple 3 : Fabrication d'un flacon de verre recouvert de résine époxy rempli d'une solution de conjugués Anticorps anti-CD3-Phycoérythrine-cyanine 5 dans du PBS, de la BSA 2mg/ml, azide de sodium 0,1%.

[0031] On a rempli des flacons fabriqués selon l'exemple 1 avec chacun 2 ml d'une solution de conjugués Anticorps anti-CD3-Phycoérythrine-cyanine 5 dans du tampon phosphate / sérum albumine bovine (2 mg/ml) / azoture de sodium 0,1%.

Exemple 4 : Essai de conservation de conjugués Anticorps anti-CD3-Phycoérythrine-cyanine 5

[0032] Afin de démontrer l'efficacité du procédé de l'invention, des flacons commerciaux et modifiés contenant des anticorps anti-CD3 conjugués à des fluorochromes PC5 et ECD ont subi un test de dégradation forcé selon la méthode décrite dans les bonnes pratiques de fabrication (Good Manufacturing Practice (GMP)) de la Food and Drug Administration américaine.

[0033] Différents conditionnements ont été testés :

- Flacon commercial BeckmanCoulter Immunotech de la gamme IOTEST
- Flacon commercial BeckmanCoulter Immunotech de la gamme Cytostat
- Flacon commercial BeckmanCoulter Immunotech de la gamme IOTEST recouvert d'une couche de vernis époxy selon le procédé de poudrage électrostatique
- Flacon commercial BECTON DICKINSON Pharmingen.

[0034] Ces flacons contenant les conjugués anticorps-tandems ont été introduits dans une chambre équipée de tubes fluorescents et ont été soumis à une dose lumineuse totale de $1,2 \cdot 10^6$ lux.h.

[0035] La figure 1 montre l'excellente protection du contenu des flacons en mettant en oeuvre l'invention. En effet les tandems introduits dans le flacon BeckmanCoulter Immunotech de la gamme IOTEST recouvert d'une couche de vernis époxy selon le procédé de poudrage électrostatique présentent une autofluorescence en FL2 identique à celle du témoin non irradié. En revanche tous les autres types de flaconnage montrent une perméabilité lumineuse qui se traduit par une « fuite » en FL2, c'est à dire une augmentation de l'autofluorescence avec apparition de cellules faussement positives.

Exemple 5 : Essai de conservation de conjugués Anticorps anti-CD19- phycoérythrine-texas red

[0036] On a opéré comme à l'exemple 4, mais avec des conjugués Anticorps anti-CD19-phycoérythrine-texas red. Les résultats sont donnés à la figure 2.

[0037] L'analyse des résultats conduit aux mêmes conclusions qu'à l'exemple 4.

Revendications

1. Un conditionnement comprenant un ensemble constitué d'un fluorochrome sensible à la lumière visible et d'un flacon dans lequel il est placé, au moins les parois latérales dudit flacon formant un écran efficace aux radiations du spectre lumineux entre 200 et 900 nm, **caractérisé en ce que** le fluorochrome est choisi parmi la fluorescéine isothiocyanate (FITC), la phycoérythrine (PE), l'allophycocyanine (APC), le PercP et **caractérisé en ce que** les parois latérales du flacon ont une structure stoppant au moins 95% des radiations du visible.
2. Un conditionnement selon la revendication 1, **caractérisé en ce que** le fond du flacon forme également un écran efficace aux radiations du spectre visible.
3. Un conditionnement selon la revendication 1 ou 2, **caractérisé en ce que** l'effet écran efficace aux radiations est obtenu par revêtement par poudrage électrostatique, par gainage du flacon d'une gaine, par irradiation de certains types de verres par rayonnement gamma, ou par surmoulage.
4. Un conditionnement selon l'une des revendications 1 à 3, **caractérisé en ce que** le fluorochrome fait partie des tandems phycoérythrine-cyanine 7 (PC7), phycoérythrine-cyanine 5 (PC5) et phycoérythrine-texas red (ECD ou PETR).
5. Un procédé de protection de fluorochromes sensibles à la lumière visible lors de leur conservation, dans lequel on utilise le conditionnement selon l'une des revendications 1 à 4.

Claims

1. A packaging comprising an assembly formed by a fluorochrome sensitive to visible light and a bottle in which it is placed, at least the side walls of said bottle forming an effective screen against light spectrum radiation between 200 and 900 nm, **characterised in that** the fluorochrome is chosen from fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanine (APC), PercP and **characterised in that** the side walls of the bottle have a structure which blocks at least 95% of visible light radiation. 5
2. A packaging according to Claim 1, **characterised in that** the bottom of the bottle also forms an effective screen against visible spectrum radiation. 10
3. A packaging according to Claim 1 or 2, **characterised in that** the screening effect effective against radiation is obtained by coating with electrostatic powdering, by covering the bottle with a sleeve, by irradiating some types of glass with gamma radiation, or by cast moulding. 20
4. A packaging according to any one of Claims 1 to 3, **characterised in that** the fluorochrome is part of the phycoerythrin-cyanine 7 (PC7), phycoerythrin-cyanine 5 (PC5) and phycoerythrin-texas red (ECD or PETR) tandems. 25
30
5. A process for protecting fluorochromes sensitive to visible light during their storage, in which the packaging according to any one of Claims 1 to 4 is used. 35

gekennzeichnet, dass der gegenüber Strahlen wirksame Schirmeffekt mittels Beschichten durch elektrostatisches Bepudern, durch Umhüllen des Flakons mit einem Mantel, durch Bestrahlen einiger Glastypeen mit Gammastrahlen oder durch Überformen hergestellt wird.

4. Eine Verpackung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fluorochrom Bestandteil der Tandems Phycoerythrin Cyanin 7 (PC7), Phycoerythrin Cyanin 5 (PC5) und Phycoerythrin Texas Red (ECD oder PETR) ist.

5. Ein Verfahren zum Schutz von bei ihrer Aufbewahrung gegenüber dem sichtbaren Licht empfindlichen Fluorochromen, bei dem die Verpackung nach einem der Ansprüche 1 bis 4 verwendet wird.

Patentansprüche

1. Eine Verpackung, die eine Gruppe umfasst, die von einem gegenüber dem sichtbaren Licht empfindlichen Fluorochrom gebildet wird und von einem Flakon, in dem es platziert ist, wobei mindestens die Seitenwände des Flakons einen gegenüber den Strahlen des Lichtspektrums zwischen 200 und 900 nm wirksamen Schirm bilden, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Fluorochrom aus dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC), dem Phycoerythrin (PE), dem Allophycocyanin (APC), dem PercP ausgewählt ist und **dadurch gekennzeichnet, dass** die Seitenwände des Flakons eine Struktur haben, die mindestens 95 % der Strahlen des sichtbaren Lichts stoppen. 40
45
50
2. Eine Verpackung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Boden des Flakons ebenfalls einen gegenüber den Strahlen des sichtbaren Spektrums wirksamen Schirm bildet. 55
3. Eine Verpackung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch**

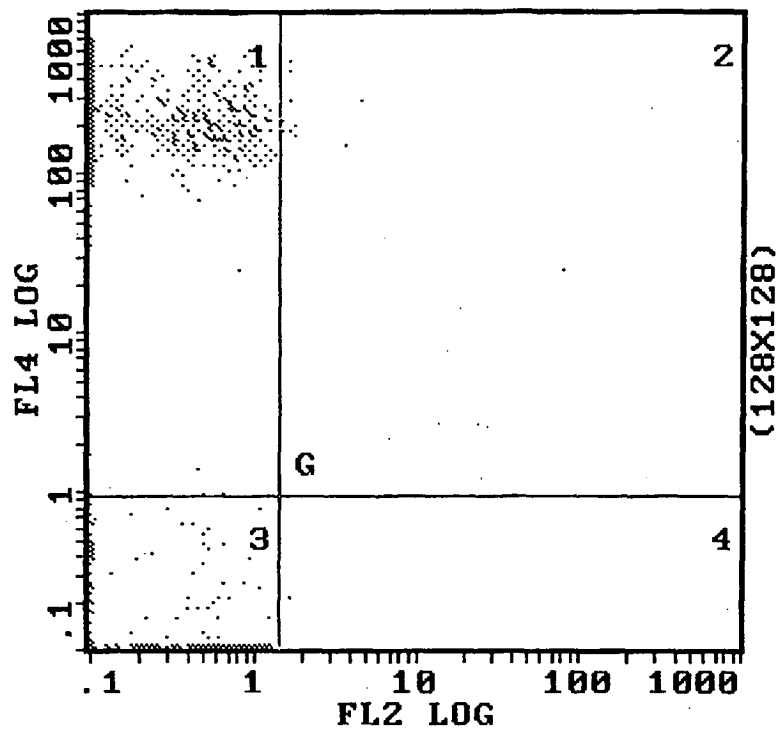


FIGURE 1 A

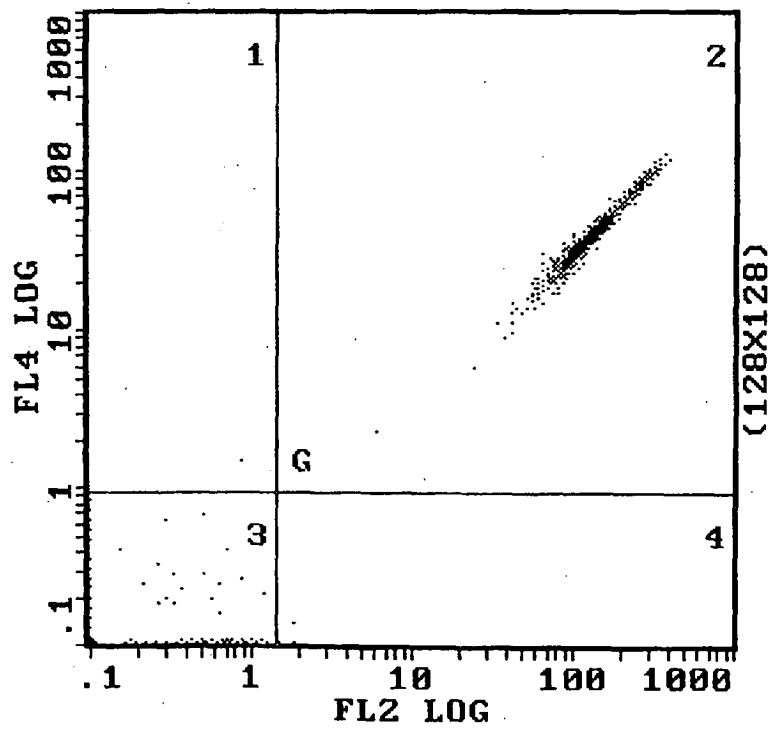


FIGURE 1 B

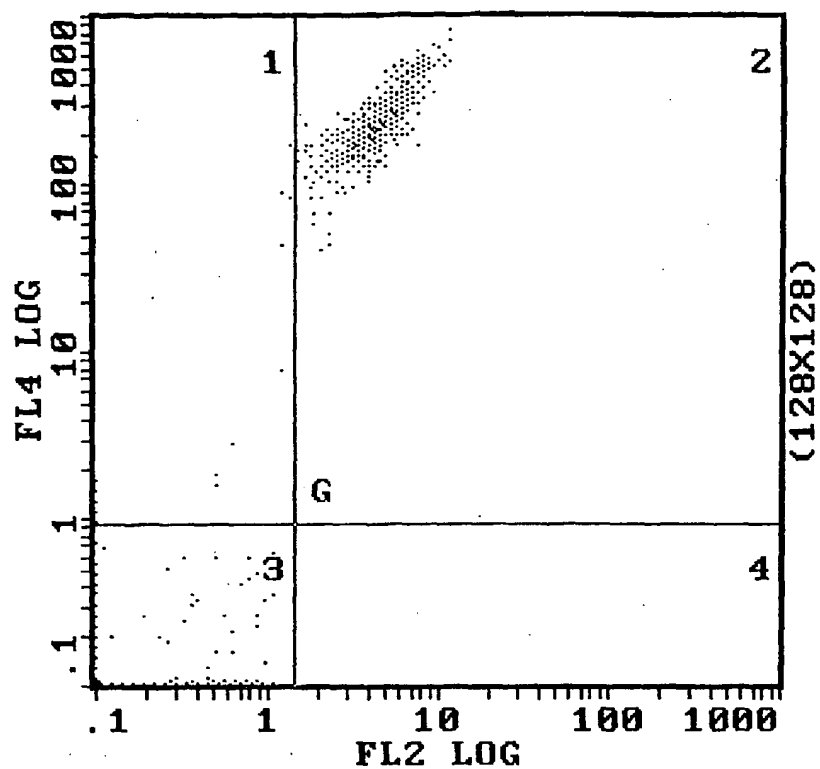


FIGURE 1 C

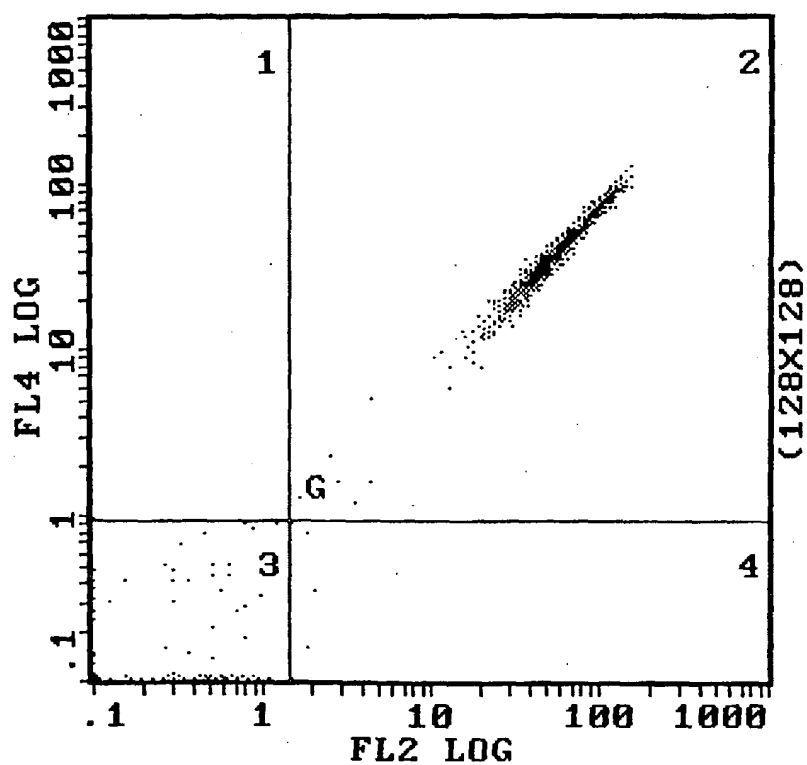


FIGURE 1 D

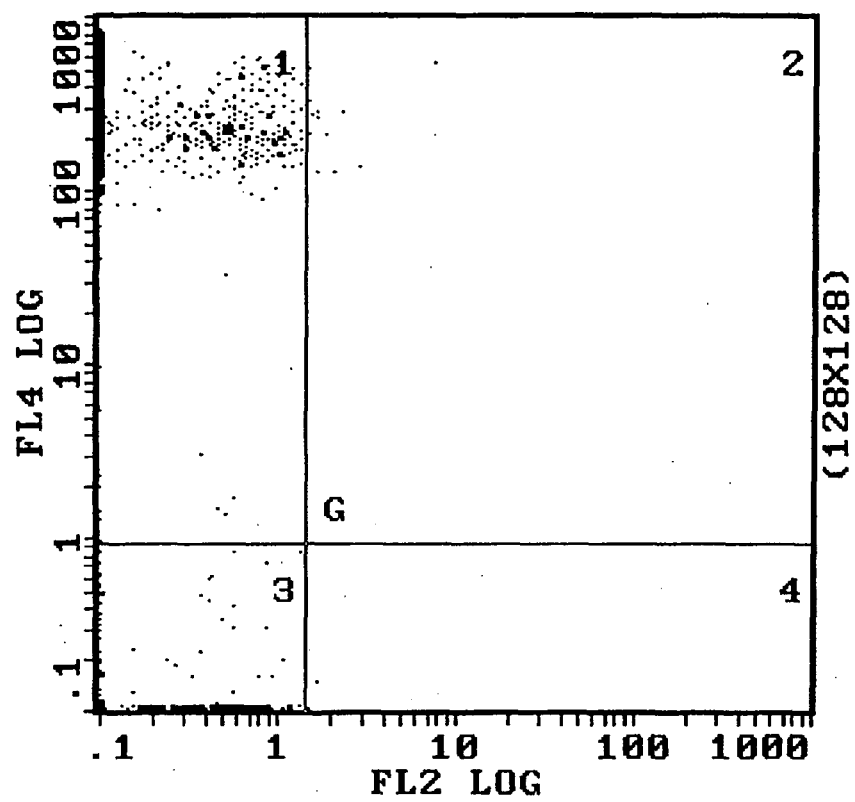
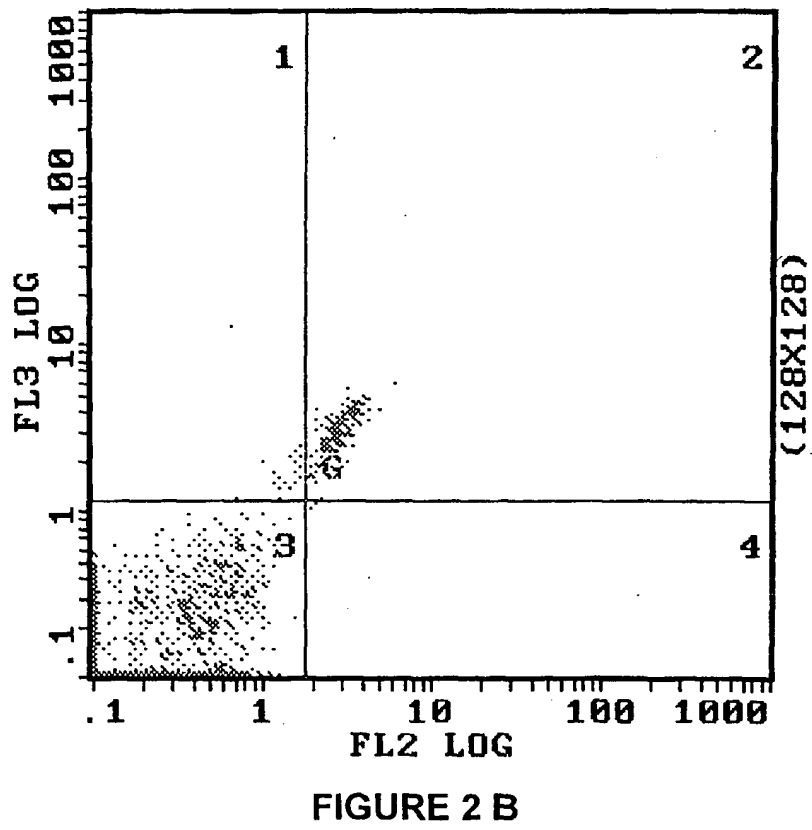
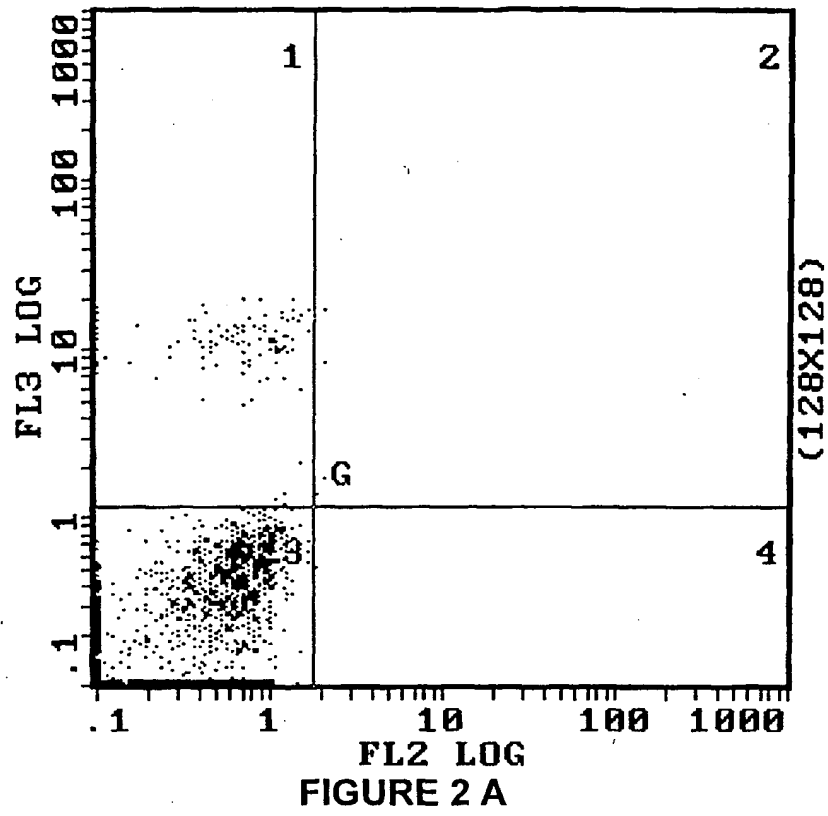


FIGURE 1 E



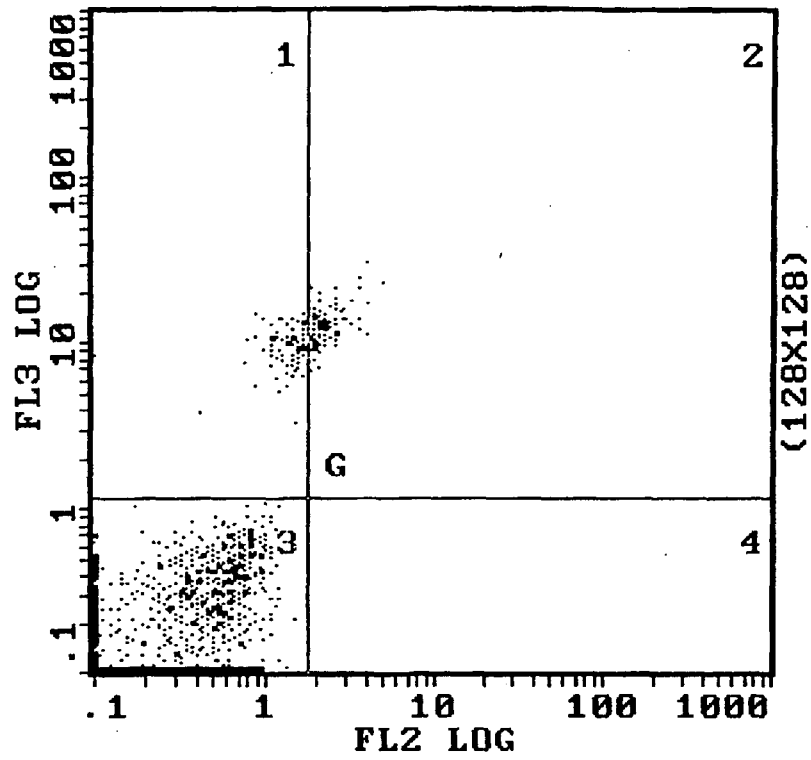


FIGURE 2 C

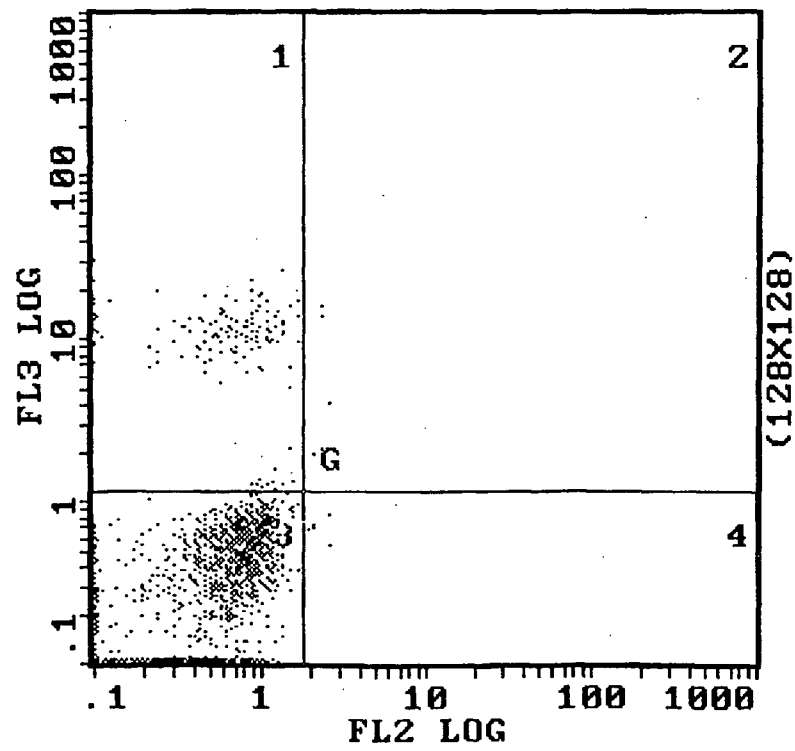


FIGURE 2 D

RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

Documents brevets cités dans la description

- GB 2086342 A [0007]

Littérature non-brevet citée dans la description

- Glazer et al. *Biophys. J.*, 1983, vol. 83, 383-386 [0008]
- Lanier et al. *Methods*, 1991, vol. 2 (3), 192-199 [0008]