

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 588**

51 Int. Cl.:

G01N 33/80 (2006.01)

G01N 15/14 (2014.01)

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 15/10 (2014.01)

G01N 15/01 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2017 PCT/FR2017/053015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018 WO18083426**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2017 E 17801082 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 3535589**

54 Título: **Procedimiento de determinación del contenido de hemoglobina f de una célula eritroide**

30 Prioridad:

04.11.2016 FR 1660713

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE
MARNE (20.00%)**

**61 Avenue du Général de Gaulle
94000 Créteil, FR;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (20.00%);
INSTITUT NATIONAL TRANSFUSION SANGUINE
(20.00%);**

ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG (20.00%)

y

**ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(20.00%)**

72 Inventor/es:

**CAMBOT, MARIE;
VANDEMEULEBROUCK, GAETANA;**

NOIZAT PIRENNE, FRANCE;

BARTOLUCCI, PABLO;

RAKOTOSON, MARIE GEORGINE;

GALACTEROS, FRÉDÉRIC y

HEBERT, NICOLAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 009 588 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).

ESCRIPCIÓN

Procedimiento de determinación del contenido de hemoglobina f de una célula eritroide

Campo técnico

- 5 La invención se refiere a un nuevo procedimiento de determinación *in vitro* del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada célula eritroide de un conjunto de células eritroides, preferiblemente de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos, mediante citometría de flujo. La invención también se refiere a un procedimiento novedoso de determinación *in vitro* de la cantidad de glóbulos rojos transfundidos a un paciente y a un procedimiento de seguimiento de la eficacia terapéutica de un tratamiento para la drepanocitosis o la β -talasemia.

Antecedentes tecnológicos

- 10 La drepanocitosis es una enfermedad genética de la hemoglobina que se ha caracterizado históricamente por la deformación de los glóbulos rojos (GR) en respuesta a una disminución de la presión parcial de oxígeno. Los glóbulos rojos pierden su forma bicóncava (o discocitaria) y aparecen en forma alargada, puntiaguda o en forma de hoz, de ahí el nombre de anemia falciforme o "sickle cell disease" en inglés.

- 15 La drepanocitosis se debe a una mutación de un solo nucleótido (GAG→GTG) en el codón 6 del gen β ubicado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p 15.5). Esta mutación se traduce en una modificación estructural de la cadena β de la hemoglobina, que consiste en la sustitución del ácido glutámico en la posición 6 por una valina para formar la HbS. El síndrome drepanocítico mayor comprende 3 genotipos: una forma homocigota (SS) y 2 formas heterocigotas (SB⁰Thal y SC, que asocia la mutación β S y una mutación C caracterizada por la sustitución del ácido glutámico en la posición 6 por una lisina).

- 20 El fenotipo clínico de la drepanocitosis se caracteriza por una gran variabilidad interindividual, por un lado, y por otro lado, por una variabilidad entre cada episodio para un mismo paciente. Las principales causas de hospitalización son las crisis vasooclusivas (CVO) y el síndrome torácico agudo (STA), que pueden ocurrir a cualquier edad. El STA puede afectar hasta al 40% de los pacientes con drepanocitosis y es una de las principales causas de mortalidad en adultos. Los glóbulos rojos densos o "dense red blood cells" (DRBC) en inglés y las "irreversibly sickled cells" (ISC) constituyen una subpoblación de glóbulos rojos SS que es muy patógena debido a su alta concentración de HbS, que es el principal factor determinante en la polimerización. Los DRBC tienen una fuerte tendencia a polimerizarse y son actores importantes en los mecanismos fisiopatológicos de la drepanocitosis. Debido a su baja deformabilidad asociada a un aumento significativo de la viscosidad, los DRBC contribuyen principalmente a la oclusión de los capilares y vénulas poscapilares y a la ralentización del flujo sanguíneo, promoviendo la aparición de fenómenos vasooclusivos.

- 30 En 2010, se identificaron alrededor de 5 millones de portadores del rasgo drepanocítico y 312.000 niños con drepanocitosis en todo el mundo, con una alta densidad en las regiones africanas. En 2011, la OMS estimó una prevalencia de portadores del rasgo drepanocítico de hasta el 5% de la población mundial. La drepanocitosis representa hoy en día la enfermedad genética más común en Francia, con una frecuencia de hasta uno de cada 700 nacimientos en Francia continental y de 1/2.300 en los departamentos de ultramar (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire del 3 de julio de 2012 / 12 de mayo de 2015). Las tasas de mortalidad entre los niños menores de 5 años han disminuido considerablemente en las últimas décadas gracias al cribado neonatal y a la introducción de tratamientos preventivos para las infecciones que son las principales causas de mortalidad. En Francia, también se ha observado una mejora en la esperanza de vida de los pacientes con drepanocitosis en los últimos 20 años, con una tasa de mortalidad reducida al 35% (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire de 10 de marzo de 2015). Sin embargo, la ausencia de detección temprana y el acceso limitado a tratamientos y cuidados de calidad siguen aumentando la incidencia de la mortalidad entre los niños de los países en desarrollo.

- La observación de una forma asintomática de drepanocitosis en pacientes con SS ha dado lugar a diversos estudios dirigidos a determinar el efecto protector de la hemoglobina F (HbF). De hecho, la expresión clínica de la drepanocitosis se atenúa en el período perinatal durante el cual la HbF representa la forma predominante. También se observa una forma benigna en adultos que presentan rasgos genéticos que conducen a una sobreexpresión de la HbF. Estos pacientes rara vez presentan una manifestación clínica grave y se benefician de una mejor esperanza de vida. El efecto protector de la HbF consiste principalmente en la inhibición de la formación del polímero desoxi HbS. Dado que la polimerización depende esencialmente de la concentración corpuscular media de hemoglobina (CMCH), la reducción de la concentración intracelular de HbS constituye el principal factor que mejora la expresión clínica. Los estudios *in vitro* realizados sobre soluciones de hemoglobinas han permitido determinar los mecanismos de inhibición de la polimerización por parte de las distintas variantes de hemoglobina (HbA, HbA₂, HbF,...). Se obtiene un mayor efecto inhibitorio con la HbF. Además de este efecto antipolimerizante, existe una fuerte afinidad de la HbF con el oxígeno, lo que proporciona una mejor protección a los glóbulos rojos. En los pacientes con drepanocitosis, la HbF se expresa de forma heterogénea, el efecto protector de la HbF hace que los glóbulos rojos que contienen una tasa elevada de HbF tengan una vida útil más larga, hasta aproximadamente 90 días, mientras que los glóbulos rojos SS que contienen poca HbF se eliminan rápidamente de la circulación general.

En la actualidad, el aumento de la HbF es, por lo tanto, uno de los principales objetivos terapéuticos en el tratamiento de la drepanocitosis.

Sin embargo, el aumento del contenido medio de HbF no siempre se asocia con una mejoría clínica en los pacientes con drepanocitosis. Por el contrario, se puede observar una mejoría clínica para contenidos bajos de HbF. Estas observaciones apuntan a la existencia de un contenido umbral de HbF en cada glóbulo rojo que permite inhibir la polimerización de la HbS y evocan la necesidad de obtener una superación de este umbral con el resultado de una distribución más homogénea de la HbF en los glóbulos rojos, para que cada glóbulo rojo se beneficie del efecto protector de la HbF. También se ha demostrado que, en ausencia de tratamiento, la distribución de la HbF en los glóbulos rojos SS es heterogénea. Determinar el contenido de HbF de cada glóbulo rojo es, por lo tanto, de suma importancia.

En las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas para determinar el contenido de HbF de cada glóbulo rojo. Estas técnicas se basaron inicialmente en procedimientos químicos (Betke K, Betke K, Marti HR, Schlicht I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. Nature. 1959; 184 (Suppl 24):1877-8), y después en procedimientos inmunológicos (Navenot JM, Merghoub T, Ducrocq R, Muller JY, Krishnamoorthy R, Blanchard D. New method for quantitative determination of fetal hemoglobin-containing red blood cells by flow cytometry: application to sickle-cell disease. Cytometry. 1998; 32 (3) :186-90 ; Munde Y. et al., Munde Y. et al., Simplified flow cytometry method for fetal hemoglobin containing red blood cells, Cytometry, 2000, 42 (6) :389-393), tenían como objetivo detectar una población particular de glóbulos rojos que contenía una alta tasa de HbF, denominados "células F". Aunque se utilizan ampliamente en el diagnóstico de las incompatibilidades feto-maternas y en la comprensión de las hemoglobinopatías, estos procedimientos no son muy sensibles y se limitan a una medición cualitativa de las células F (glóbulos rojos positivos en microscopía mediante inmunofluorescencia, inmunodifusión o citometría de flujo, independientemente del nivel de expresión de la HbF). Hasta entonces, el estudio del contenido de HbF de cada glóbulo rojo se basaba en esta definición aproximada de células F.

Por lo tanto, existe una necesidad real de desarrollar un procedimiento que sea fácil de implementar para determinar con precisión el contenido de HbF de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos a fin de poder explicar las variabilidades de la respuesta clínica, anticipar estas variabilidades de la respuesta clínica y, con ello, adaptar el tratamiento. También permitiría desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para la drepanocitosis o la β -talasemia con el objetivo de aumentar el contenido de HbF de cada glóbulo rojo y no solo el contenido medio de HbF en un paciente.

Sumario de la invención

La presente invención tiene como objetivo proponer un nuevo procedimiento de determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos, útil en el diagnóstico y el seguimiento terapéutico de la drepanocitosis o la β -talasemia.

Según un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de determinación *in vitro* del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos que comprende las etapas de:

- a) aislar los glóbulos rojos a partir de una muestra;
- b) permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos aislados;
- c) marcar la HbF de los glóbulos rojos obtenidos en la etapa b) con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo;
- d) medir mediante citometría de flujo la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos
- e) determinar el contenido de hemoglobina F de cada glóbulo rojo del conjunto de glóbulos rojos.

Según un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de determinación *in vitro* de la cantidad de glóbulos rojos transfundidos a un paciente, que comprende:

- a) la obtención de una muestra que contiene glóbulos rojos de un paciente;
- b) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos de dicha muestra según el procedimiento de la invención;
- c) la utilización de los resultados de la etapa b) para determinar la cantidad de glóbulos rojos transfundidos a un paciente, teniendo dichos glóbulos rojos transfundidos un contenido de HbF sustancialmente igual a cero (= 0 pg).

Según un tercer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* de seguimiento de la eficacia terapéutica de un tratamiento para la drepanocitosis o la β -talasemia que comprende:

- a) la obtención de una muestra que contenga glóbulos rojos de un paciente que se ha sometido a tratamiento para la drepanocitosis;
- b) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos de dicha muestra según el procedimiento de la invención aplicado a los glóbulos rojos;

c) la utilización de los resultados de la etapa b) para la determinación de la eficacia terapéutica del tratamiento de la drepanocitosis o la β -talasemia, en donde se observa una eficacia terapéutica cuando al menos un porcentaje predeterminado de los glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos tienen un contenido de HbF que supera un umbral de referencia y/o cuando se observa una disminución en la cantidad de glóbulos rojos con un contenido de HbF inferior a <2 pg.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Las hemoglobinas humanas están compuestas por 4 subunidades de cadenas polipeptídicas que son idénticas de dos en dos. Las subunidades varían según los tipos de hemoglobina y en el ser humano cabe distinguir 4 hemoglobina normales:

- hemoglobinas embrionarias: hemoglobina Gower I ($\zeta 2\epsilon 2$), hemoglobina Portland ($\zeta 2\gamma 2$) y hemoglobina Gower II ($\alpha 2\epsilon 2$);
- HbF ($\alpha 2\gamma 2$);
- hemoglobina adulta (HbA) ($\alpha 2\beta 2$);
- hemoglobina A2 (HbA2) ($\alpha 2\delta 2$).

Por lo tanto, el término "HbF" se refiere a una proteína compuesta por dos subunidades de cadenas α (alfa) y dos subunidades de cadenas γ (gamma). La HbF está compuesta por dos tipos de cadenas γ : G γ y A γ , que se distinguen por su residuo en la posición 136 correspondiente a una glicina para la cadena G γ y a una alanina para la A γ . Existen formas menores de HbF, entre ellas la HbF1, que representa el 10% de la hemoglobina total del feto. Contiene una subunidad γ^x cuyo extremo N está sustituido por un grupo acetilo. Se pueden observar otras formas de HbF, pero en cantidades muy bajas.

En el sentido de la invención, el término "contenido" debe interpretarse en su primera acepción, es decir, la cantidad de la entidad de interés. El contenido puede expresarse en contenido en masa, por ejemplo en picogramos (pg).

En el sentido de la invención, la expresión "contenido de HbF de cada glóbulo rojo" designa la cantidad de HbF en cada glóbulo rojo, tomada individualmente. Preferiblemente, el contenido (o cantidad) se expresa en masa, ventajosamente en picogramos (pg). Por ejemplo, la determinación del contenido de HbF de cada glóbulo rojo de un conjunto de 10 glóbulos rojos corresponde a la obtención de 10 valores de cantidad de HbF, correspondientes al contenido de HbF de cada uno de los 10 glóbulos rojos tomados individualmente.

Las expresiones "célula eritroide" o "células eritroides" se refieren a células que expresan hemoglobina para las que es posible medir la presencia de hemoglobina fetal (HbF) entre un conjunto de dichas células. Las "células eritroides" se refieren a las células eritroides que se diferencian en el estadio de la eritropoyesis tardía, por ejemplo, eritroblastos, reticulocitos o glóbulos rojos. Estas células de eritropoyesis tardía son células que pueden ser no circulantes, es decir, derivadas de la médula ósea (p. ej., eritroblastos), o células circulantes, es decir, células sanguíneas (p. ej., reticulocitos o glóbulos rojos), o células derivadas de células eritroides, por ejemplo, células eritroides recombinantes. Es probable que las células eritroides contengan HbF. Las expresiones "célula eritroide" y "células eritroides" pueden sustituirse respectivamente por, por ejemplo, "glóbulo rojo" o "glóbulos rojos". La invención se refiere a un procedimiento de determinación *in vitro* del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos que comprende las etapas de:

- a) aislar los glóbulos rojos a partir de una muestra;
- b) permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos aislados;
- c) marcar la HbF de los glóbulos rojos obtenidos en la etapa b) con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo;
- d) medir por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos;
- e) determinar el contenido de hemoglobina F de cada glóbulo rojo del conjunto de glóbulos rojos.

La expresión "conjunto de células eritroides" corresponde a un conjunto de células eritroides contenidas en una muestra de células eritroides. El conjunto de células eritroides puede abarcar hasta el 100% de las células eritroides presentes en la muestra, es decir, la totalidad de las células eritroides presentes en la muestra. Por lo tanto, el conjunto de células eritroides corresponde a entre el 100% y el 0%, excluyéndose el 0%, de las células eritroides presentes en la muestra.

En particular, el conjunto de células eritroides comprende al menos 10.000 células eritroides, preferiblemente al menos

100.000 células eritroides, preferiblemente entre 50.000 y 100.000 células eritroides. El contenido de hemoglobina F puede determinarse para cada una de las células eritroides en un conjunto de al menos 10.000 células eritroides, preferiblemente al menos 100.000 células eritroides, preferiblemente entre 50.000 y 100.000 células eritroides.

5 En el sentido de la invención, la expresión "citometría de flujo" se refiere a una técnica bien conocida por los expertos en la materia que permite que se desplacen partículas, moléculas o células a alta velocidad en el haz láser, contándolas y caracterizándolas. Es la luz reemitida por las partículas, moléculas o células (por difusión o fluorescencia) lo que permite caracterizarlas según los criterios deseados. En general, las partículas, moléculas o células están marcadas con un fluorocromo que absorbe la energía del láser y reemite la energía absorbida en forma de fotones de una longitud de onda más elevada. En el contexto de la invención, la luz reemitida se obtiene marcando específicamente la HbF presente en las células eritroides con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo.

10 En el sentido de la invención, el término "fluorocromo" (o "fluoróforo") se refiere a una sustancia química capaz de emitir luz fluorescente después de la excitación por un láser. En el contexto de la invención, el fluorocromo se acopla a un anticuerpo anti-HbF. Los expertos en la materia disponen de una amplia variedad de fluorocromos adaptados a la citometría de flujo. Todos los fluorocromos que se pueden acoplar a un anticuerpo se pueden utilizar en el contexto de la presente invención. En una realización particular, el fluorocromo es isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) o uno de sus derivados, preferiblemente PE. Debido a sus propiedades conformacionales (impedimento estérico), la PE presenta la ventaja de tener una relación PE: anticuerpo cercana a 1. Los expertos en la materia conocen bien las químicas de acoplamiento de los anticuerpos y la presente invención no se limita a una química de acoplamiento en particular.

20 El término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas u otras moléculas que comprenden al menos un dominio de unión a un antígeno. En particular, incluye anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión al antígeno (p. ej. Fab, Fab' y F (ab)₂, scFv, tal que los fragmentos comprenden un dominio VL o un dominio VH), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos monocatenarios (p. ej., del tipo camélido). Los anticuerpos según la invención pueden ser anticuerpos de cualquier tipo, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY, de cualquier clase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, o de cualquier subclase. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-HbF, preferiblemente un anticuerpo anti-HbF dirigido contra la cadena gamma de la HbF. En una realización particular, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

30 En general, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación. Inicialmente, un animal, generalmente un ratón, se inmuniza con el antígeno de interés (p. ej., la HbF humana) o con un fragmento del antígeno de interés (p. ej., la cadena gamma de la HbF humana), cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos se fusionan a continuación con células de mieloma "inmortales" (por ejemplo, murinas) para dar lugar a hibridomas. Cada hibridoma se multiplica en forma de un clon, cada uno de los cuales conduce a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento con respecto a dicho antígeno de interés pueden probarse, por ejemplo, mediante ELISA, mediante inmunotransferencia (Western blot) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia o con ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales seleccionados de esta manera se purifican posteriormente, en particular utilizando la técnica de cromatografía. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser anticuerpos recombinantes obtenidos mediante ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

En el sentido de la invención, el término "diagnóstico" se refiere a la determinación de la probabilidad o la posibilidad de que un paciente tenga drepanocitosis.

45 En el sentido de la invención, el término "muestra" se refiere a una muestra que contiene glóbulos rojos obtenida de un paciente y a partir de la cual es posible implementar la invención. Ventajosamente, la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de sangre humana. La muestra se puede tomar de un paciente en cualquier momento, por ejemplo, realizando una extracción de sangre.

En el sentido de la invención, la expresión "paciente homogéneo" se refiere a un paciente que tiene un contenido homogéneo de HbF en el conjunto de sus glóbulos rojos.

50 Por lo tanto, el contenido de HbF en el conjunto de los glóbulos rojos sigue una distribución logarítmica normal. Un paciente homogéneo puede ser un paciente con persistencia hereditaria de HbF, β -talasemia o β - δ -talasemia. Por lo tanto, la expresión "pacientes homogéneos" se refiere a un grupo de pacientes que presentan cada uno un contenido homogéneo de HbF en el conjunto de sus glóbulos rojos, si bien el contenido de HbF puede ser diferente de un paciente a otro.

55 En el sentido de la invención, la expresión "muestra homogénea" se refiere a una muestra de glóbulos rojos obtenida de un paciente homogéneo. Por lo tanto, los contenidos de HbF de los glóbulos rojos en una muestra homogénea presentan una varianza baja. Es decir, los contenidos de HbF de cada uno de los glóbulos rojos de la muestra homogénea se concentran alrededor del contenido de HbF de la muestra homogénea. Ventajosamente, una varianza baja es una

varianza inferior al 15%, ventajosamente inferior al 10%, inferior al 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%.

Procedimiento de determinación del contenido de HbF de una célula eritroide

Los autores de la invención han puesto de relieve que la citometría de flujo es una tecnología que resulta particularmente adecuada para determinar de manera fácil y precisa el contenido de HbF de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos.

Así, la invención se refiere a un procedimiento de determinación *in vitro* del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos que comprende las etapas de:

a) aislar los glóbulos rojos a partir de una muestra;

b) permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos aislados;

c) marcar la HbF de los glóbulos rojos obtenidos en la etapa b) con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo;

d) medir mediante citometría de flujo la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos

e) determinar el contenido de hemoglobina F de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos.

La etapa a) consiste en aislar los glóbulos rojos a partir de una muestra. Esta etapa consiste en purificar (o aumentar el nivel de pureza) de los glóbulos rojos a partir de una muestra que comprende glóbulos rojos.

Esta etapa permite, en particular, eliminar ciertos elementos (p. ej., plaquetas y glóbulos blancos) que pueden estar presentes en la muestra. Ventajosamente, la muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de sangre humana. Los expertos en la materia disponen de numerosas técnicas para aislar glóbulos rojos a partir de una muestra que contiene glóbulos rojos.

Estas técnicas son generalmente sencillas de implementar y no presentan en general ninguna dificultad particular para los expertos en la materia que sabrán cómo adaptarlas para su implementación en la presente invención. Por ejemplo se puede citar la centrifugación, las técnicas de cromatografía y el fraccionamiento por gradiente de densidad. Por ejemplo, (i) se centrifuga una muestra de sangre, (ii) se recoge el sedimento (que contiene los glóbulos rojos) y (iii) se añade un tampón isotónico apropiado (por ejemplo, un tampón de fosfato) al sedimento para obtener una suspensión de glóbulos rojos, de manera que las etapas (i) a (iii) se pueden repetir una o más veces para obtener los glóbulos rojos aislados. La etapa b) consiste en permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos aislados.

Esta etapa consiste en hacer que la membrana de los glóbulos rojos sea lo suficientemente permeable para que el anticuerpo anti-HbF pueda penetrar en los glóbulos rojos, manteniendo al mismo tiempo la integridad de los glóbulos rojos (sin lisar los glóbulos rojos). Los expertos en la materia disponen de numerosas técnicas para permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos.

Estas técnicas son generalmente sencillas de implementar y en general no presentan ninguna dificultad particular para los expertos en la materia que sabrán cómo adaptarlas para su implementación en la presente invención. Por ejemplo, se puede mencionar la utilización de un agente químico tal como un detergente y/o un tensioactivo (p. ej., saponina, SDS y/o Triton). En una realización particular, la membrana de los glóbulos rojos aislados se permeabiliza con dodecilsulfato de sodio (SDS). El SDS, también conocido como laurilsulfato de sodio o laurilsulfato sódico (LSS), es un detergente y tensioactivo iónico fuerte de uso común. En general, el dodecilsulfato de sodio simplemente se añade a la suspensión de glóbulos rojos.

En una realización particular, la membrana de los glóbulos rojos aislados se fija antes de la etapa de permeabilización. La fijación de la membrana de los glóbulos rojos permite evitar (o limitar) la lisis de los glóbulos rojos durante la etapa de permeabilización. Los expertos en la materia disponen de varios compuestos químicos para fijar la membrana de los glóbulos rojos.

En una realización particular, la membrana de los glóbulos rojos aislados se fija con azida sódica y/o formaldehído. En general, la azida sódica y/o el formaldehído se añaden simplemente a un sedimento de glóbulos rojos o a una suspensión de glóbulos rojos.

La etapa c) consiste en marcar la HbF de los glóbulos rojos obtenidos en la etapa b) (es decir, los glóbulos rojos aislados cuya membrana está permeabilizada) con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo (también denominado en lo sucesivo "anticuerpo anti-HbF"). Ventajosamente, la etapa c) se lleva a cabo en condiciones que permiten una unión intracelular entre el anticuerpo anti-HbF y la HbF. Esta etapa permite obtener "glóbulos rojos marcados". Preferiblemente, se utiliza una cantidad suficiente de anticuerpos anti-HbF para poder marcar el conjunto de las HbF, por ejemplo, se utiliza un exceso de anticuerpos anti-HbF. En particular, la etapa c) consiste en marcar la HbF de los glóbulos rojos obtenidos en la etapa b) con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo en condiciones que permitan la unión intracelular entre el anticuerpo anti-HbF y la HbF. Es decir, el enlace entre el

anticuerpo anti-HbF y la HbF tiene lugar dentro del glóbulo rojo.

En general, el marcado consiste en incubar glóbulos rojos cuya membrana se ha permeabilizado con el anticuerpo anti-HbF durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión intracelular entre el anticuerpo anti-HbF y la HbF. La duración es generalmente de unos pocos minutos, por ejemplo, entre 5 minutos y 20 minutos.

5 En una realización particular, los glóbulos rojos se lavan después de la etapa de marcado. El lavado permite eliminar los anticuerpos anti-HbF que no se unirían al HbF. El lavado se puede hacer con un tampón apropiado, por ejemplo, un tampón PBS. El lavado también elimina el agente químico que se utilizó para permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos lavados de esta manera se utilizan a continuación en la etapa de medición mediante citometría de flujo.

10 La etapa d) consiste en medir por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos.

Ventajosamente, la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos se mide independientemente de la intensidad de fluorescencia (MFI) de los otros glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos. En esta etapa, un conjunto de glóbulos rojos marcados, es decir, todos o parte de los glóbulos rojos marcados, se analiza así mediante citometría de flujo. De este modo, la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo del conjunto de los glóbulos rojos se mide independientemente de la intensidad de fluorescencia (MFI) de los otros glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos. Por lo tanto, en esta etapa se mide la intensidad de fluorescencia de cada uno de los glóbulos rojos tomados de forma independiente. En una realización particular, la intensidad de fluorescencia (MFI) se mide para cada glóbulo rojo de un conjunto de al menos 10.000 glóbulos rojos, preferiblemente al menos 100.000 glóbulos rojos, preferiblemente entre 50.000 y 100.000 glóbulos rojos.

La etapa e) consiste en determinar el contenido de hemoglobina F de cada glóbulo rojo del conjunto de glóbulos rojos. El contenido de HbF se determina a partir de la intensidad de la fluorescencia medida mediante citometría de flujo.

Por lo tanto, el contenido de HbF de cada glóbulo rojo del conjunto de glóbulos rojos se determina independientemente del contenido de HbF de los otros glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos. La determinación del contenido de HbF de cada glóbulo rojo en el conjunto de glóbulos rojos se lleva a cabo comparando la intensidad de fluorescencia de cada glóbulo rojo con una curva estándar. La curva estándar permite asociar la intensidad luminosa medida para un glóbulo rojo con un contenido de HbF.

Por ejemplo, la curva estándar se puede obtener de la siguiente manera:

30 - se establece una recta de calibración que permite correlacionar una intensidad de fluorescencia con un número de fluoróforo. Por ejemplo, se pueden utilizar perlas conjugadas con una cantidad conocida de fluoróforo (perlas calibradas). Esta recta de calibración permite determinar la cantidad de fluoróforo por glóbulo rojo (en adelante fluoróforo/glóbulo rojo).

Por lo tanto, al transferir la medición de la intensidad de fluorescencia de cada glóbulo rojo a la recta de calibración, es posible deducir la cantidad de fluoróforo en cada glóbulo rojo.

35 También es posible utilizar la relación fluoróforo: anticuerpo (que puede ser 1:1) para deducir el número de antígeno en cada glóbulo rojo, es decir, el número de HbF en cada glóbulo rojo; - se determina el contenido medio de HbF por glóbulo rojo (CMHbF) en una muestra de sangre obtenida de pacientes con un contenido de HbF perfectamente homogéneo en el conjunto de sus glóbulos rojos ("pacientes homogéneos"). El contenido de HbF en el conjunto de estos glóbulos rojos sigue más exactamente una distribución logarítmica normal. Estas muestras se denominan en lo sucesivo "muestras homogéneas". Los pacientes homogéneos son, por ejemplo, los pacientes con persistencia hereditaria de la HbF o con β -talasemia o β - δ -talasemia. Por ejemplo, se puede:

45 o determinar el porcentaje medio de HbF (es decir, la proporción de HbF en relación con el total de la hemoglobina, expresada en %) de varias muestras homogéneas que presentan un contenido de HbF por glóbulo rojo que es perfectamente diferente de una muestra a otra, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este porcentaje medio de HbF puede calcularse, por ejemplo, a partir de cromatogramas de HPLC aplicando la fórmula: $\%HbF = (AUC\ HbF / AUC\ Hb\ total) * 100$, en donde $\%HbF$ representa el porcentaje medio de HbF en el conjunto de los glóbulos rojos, AUC HbF representa el área bajo la curva de HbF en el cromatograma, AUC total representa la suma de las áreas bajo las curvas de cada tipo de hemoglobina;

50 o determinar el contenido medio de hemoglobina (es decir, todas las hemoglobinas) por glóbulo rojo (CMH) de muestras homogéneas.

Para ello, se divide la concentración de hemoglobina expresada por litro de sangre (por ejemplo, obtenida mediante un hemograma) por la cantidad de glóbulos rojos por litro de sangre (por ejemplo, obtenida por recuento de los glóbulos rojos);

o determinar el contenido medio de HbF por glóbulo rojo en una muestra homogénea según la siguiente fórmula:

$$\text{CMHbF} = (\% \text{HbF} * \text{CMH}) / 100;$$

- la curva estándar se establece combinando CMHbF y una medición de la intensidad de fluorescencia calibrada para el fluoróforo/glóbulo rojo.

5 Ventajosamente, la comparación de la intensidad de fluorescencia de cada glóbulo rojo, normalizada con respecto a la cantidad de fluoróforos, con una curva estándar (es decir, obtenida de muestras homogéneas) permite determinar el contenido de HbF de cada glóbulo rojo de manera automatizada. Para ello, se utiliza la fórmula dada por la regresión lineal que asocia la cantidad de fluoróforos por glóbulo rojo y el valor CMHbF de pacientes homogéneos.

10 Por ejemplo, la automatización de la comparación de la intensidad de fluorescencia de cada glóbulo rojo con una curva estándar puede implementarse mediante un procesador de un sistema informático. Este sistema informático puede incluir medios de almacenamiento informático en donde se almacenan instrucciones que, cuando son ejecutadas por el procesador del sistema informático, realizarán la comparación de la intensidad de fluorescencia de cada glóbulo rojo con una curva estándar.

En general, un experto en la materia sabe cómo ajustar los parámetros del citómetro de flujo con los datos de la curva estándar para obtener directamente el contenido de HbF de cada glóbulo rojo en el conjunto de glóbulos rojos analizados.

15 De este modo, el citómetro de flujo podrá clasificar automáticamente los glóbulos rojos según su contenido de HbF.

Determinación de la cantidad de glóbulos rojos transfundidos en un paciente

La invención también se refiere a un procedimiento de determinación *in vitro* de la cantidad de glóbulos rojos que se han transfundido a un paciente:

- a) la obtención de una muestra que contiene glóbulos rojos de un paciente;
- 20 b) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos de dicha muestra según el procedimiento de la invención aplicado a los glóbulos rojos;
- c) la utilización de los resultados de la etapa b) para determinar la cantidad de glóbulos rojos transfundidos a un paciente, teniendo dichos glóbulos rojos transfundidos un contenido de HbF sustancialmente igual a cero (= 0 pg).

25 Según este procedimiento de la invención, los glóbulos rojos se pueden clasificar en dos categorías bien diferenciadas. Una categoría de glóbulos rojos que contienen cantidades variables de HbF (correspondientes a los glóbulos rojos del paciente, cantidad > 0 pg) y una categoría de glóbulos rojos que no contienen HbF (que corresponde a los glóbulos rojos transfundidos, cantidad = 0 pg).

En una realización particular, el paciente padece drepanocitosis o β -talasemia.

30 Ventajosamente, la cantidad de glóbulos rojos transfundidos permite determinar un porcentaje de glóbulos rojos transfundidos con respecto al total de glóbulos rojos del paciente. En particular, esto permite controlar la evolución de la cantidad de glóbulos rojos transfundidos (o del porcentaje de glóbulos rojos transfundidos) y, por lo tanto, ayudar al diagnóstico en ciertos casos específicos, como, por ejemplo, la distinción entre aloanticuerpos o autoanticuerpos dirigidos contra los glóbulos rojos, ya sean transfundidos o del paciente.

Seguimiento de la eficacia terapéutica de la drepanocitosis o la β -talasemia

35 La invención se refiere también a un procedimiento *in vitro* de seguimiento de la eficacia terapéutica de un tratamiento para la drepanocitosis o la β -talasemia que comprende:

- a) la obtención de una muestra que contiene glóbulos rojos de un paciente que se ha sometido a un tratamiento para la drepanocitosis o la β -talasemia;
- 40 b) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos de dicha muestra según el procedimiento de la invención aplicado a los glóbulos rojos;
- c) la utilización de los resultados de la etapa b) para la determinación de la eficacia terapéutica del tratamiento de la drepanocitosis o la β -talasemia, en donde se observa una eficacia terapéutica cuando al menos un porcentaje predeterminado de los glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos tienen un contenido de HbF que supera un umbral de referencia y/o cuando se observa una disminución en la cantidad de glóbulos rojos con un contenido de HbF inferior a <2 pg.

50 Por lo tanto, es posible seguir la evolución de la eficacia terapéutica de un tratamiento, dirigido a aumentar la HbF, para la drepanocitosis o la β -talasemia a lo largo del tiempo, antes, durante y después del tratamiento del paciente. De este modo, se puede llevar un seguimiento de la evolución de la eficacia terapéutica de los tratamientos conocidos o de los nuevos tratamientos. Por lo tanto, es posible identificar nuevos tratamientos para la drepanocitosis o la β -talasemia que permitan aumentar la síntesis de la HbF en los glóbulos rojos.

En una realización particular, el umbral de referencia es de 2 pg o más, por ejemplo 3 pg, por ejemplo 4 pg, por ejemplo 5 pg, por ejemplo 6 pg, por ejemplo 7 pg, por ejemplo 7,5 pg (es decir, 7,5 pg de HbF en el glóbulo rojo).

Procedimiento de tratamiento de la drepanocitosis

La presente descripción también describe un procedimiento para tratar la drepanocitosis o la β -talasemia que comprende:

- 5 a) la obtención de una muestra que contiene glóbulos rojos de un paciente;
- a) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos de dicha muestra según el procedimiento de la invención aplicado a los glóbulos rojos;
- b) cuando al menos un porcentaje predeterminado de glóbulos rojos en el conjunto de glóbulos rojos tenga un contenido de HbF que supere un umbral de referencia, instauración del tratamiento apropiado en el paciente.

10 Por ejemplo, se puede evaluar si se debe tratar o no a un paciente. También es posible elegir el tratamiento que sea más adecuado para el paciente. De esta forma, se puede garantizar que el paciente recibe el tratamiento más adecuado.

En una realización particular, al menos el 50% de los glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos tienen un contenido de HbF que supera el umbral de referencia.

15 En una realización particular, el umbral de referencia es de 2 pg o más, por ejemplo 3 pg, por ejemplo 4 pg, por ejemplo 5 pg, por ejemplo 6 pg, por ejemplo 7 pg, por ejemplo 7,5 pg (es decir, 7,5 pg de HbF en el glóbulo rojo). El artículo de Steinberg et al. (Blood 2014, 123, 481-485) proporciona información sobre los umbrales detectables de HbF.

El tratamiento apropiado puede ser hidroxiurea y/o eritropoyetina.

Leyendas de las figuras

Figura 1:

20 Figura 1A: Citograma que muestra las poblaciones de glóbulos rojos. En abscisas: log FSC (Forward Scatter, dispersión directa) que indica la morfología de las células. En ordenadas: log SSC (Side Scatter, dispersión lateral) que indica la granulosidad de las células. La selección de células sanguíneas se realizó en una escala logarítmica para determinar las ganancias en los parámetros FCS y SSC y en una muestra de control negativa.

25 Figura 1B: Citograma que muestra el histograma de distribución de la fluorescencia de los glóbulos rojos. En abscisas: el log PE-A indica la intensidad de la fluorescencia para el fluorocromo ficoeritrina.

La señal medida es el área bajo la curva (A por área) de las variaciones en las intensidades de fluorescencia de cada célula. En ordenadas: número de glóbulos rojos.

Figura 2:

30 Figura 2A: Citograma que muestra las poblaciones de glóbulos rojos. En abscisas: log FSC-H (Forward Scatter - height, dispersión directa - altura). En ordenadas: log FSC-W (Forward Scatter- width, dispersión directa - anchura).

Figura 2B: Citograma que muestra las poblaciones de glóbulos rojos. En abscisas: log SSC-H (Side Scatter- height, dispersión lateral - altura). En ordenadas: log SSC-W (Side Scatter- width, dispersión lateral - anchura).

La selección de los singletes de glóbulos rojos se realizó primero en los parámetros de alturas y anchuras de la señal FSC y después en los parámetros de alturas y anchuras de la señal SSC.

35 Figura 3:

Figura 3A: Citograma que muestra los histogramas de distribución de la fluorescencia de las perlas. Bajo: histograma de distribución de la fluorescencia de las perlas junto con el número más bajo de fluorocromo (PE). Moderadamente bajo: histograma de distribución de la fluorescencia de las perlas junto con un número moderadamente bajo de fluorocromo (PE). Moderadamente elevado: histograma de distribución de la fluorescencia de las perlas junto con un número moderadamente elevado de fluorocromo (PE). Elevado: histograma de distribución de la fluorescencia de las perlas junto con un número elevado de fluorocromo (PE). En abscisas: log FL-2 o PE-A que indica la intensidad de la fluorescencia para el fluorocromo ficoeritrina. En ordenadas: número de glóbulos rojos.

40 Figura 3B: Recta de regresión lineal que combina la fluorescencia de las 4 poblaciones de perlas (baja, moderadamente baja, moderadamente elevada, elevada) y el número de fluorocromo (PE) por perla. En abscisas: log del número de fluorocromos (PE) por perla. En ordenadas: log de la fluorescencia de las perlas.

Figura 4: Citogramas que muestran el histograma de la distribución de la fluorescencia de los glóbulos rojos para la muestra de control negativo, la muestra de control isotópica y los pacientes 1 a 12. En abscisas: log PE-A que indica la intensidad de la fluorescencia para el fluorocromo ficoeritrina. En ordenadas: número de glóbulos rojos.

Figura 5: Regresión lineal que asocia el contenido de HbF (pg) y las cantidades antigénicas por glóbulos rojos (AG/GR). En abscisas: cantidades antigénicas por glóbulos rojos (AG/GR). En ordenadas: contenido de HbF (pg).

Figura 6: Análisis de la distribución de la HbF en los pacientes A, B y C antes (30) y durante el tratamiento con hidroxiurea (M1, M3, M4, M5, M6). En abscisas: el log PE-A indica la intensidad de la fluorescencia de los glóbulos rojos para el fluorocromo ficoeritrina. En ordenadas: número de glóbulos rojos. Las muestras de glóbulos rojos se trataron utilizando los mismos procedimientos que los realizados para los glóbulos rojos de los pacientes que cumplían con el rango de contenido de HbF.

Ejemplos

Ejemplo 1: Puesta a punto de un procedimiento de determinación del contenido de HbF de cada glóbulo rojo: constitución de una curva estándar

Se seleccionó un grupo de pacientes que presentaba una distribución perfectamente homogénea del contenido de HbF de cada glóbulo rojo a partir de la colección SICLOPEDIÉ objeto de seguimiento en la Unidad de Enfermedades Genéticas de los Glóbulos Rojos del Centro Hospitalario Universitario Henri Mondor de Créteil. Este grupo está compuesto por pacientes adultos (edad ≥ 18 años) con persistencia hereditaria de la HbF (PHHF) o una talasemia β intermedia o leve, y un contenido de HbF de cada uno de sus glóbulos rojos que es homogéneo y constante en el tiempo. El contenido de HbF en los glóbulos rojos totales de los pacientes se determinó, en el marco del seguimiento de los pacientes, mediante la medición regular del %HbF (mediante HPLC) y el contenido medio de HbF por glóbulo rojo (CMHbF). No se incluyeron los pacientes con síndrome drepanocítico mayor (SS, S β -talasemia o SC) o con un rasgo drepanocítico (AS), ni los pacientes tratados con un inductor de la HbF (hidroxiurea), los pacientes que habían recibido una transfusión durante los últimos 3 meses antes de la inclusión ni las pacientes embarazadas.

Según la Declaración de Helsinki sobre los principios éticos aplicables a la investigación médica en seres humanos (Asociación Médica Mundial, texto en vigor desde 2008, apartado 24), todos los pacientes seleccionados fueron informados de los riesgos y beneficios de este estudio y dieron su consentimiento por escrito antes de su inclusión. según la legislación vigente (artículos L.1121-3 y R.5121-13 del Código de Salud Pública), la información de los pacientes se protegió de forma anónima para garantizar la confidencialidad durante todo el estudio.

Este protocolo de investigación ha obtenido la opinión favorable del Comité IV para la Protección de las Personas de Île-de-France ubicado en el Hospital Saint-Louis (n^o IRB 00003835).

En resumen, se extrajeron 20 ml de sangre de los pacientes seleccionados y se recogieron en 5 tubos que contenían EDTA. Las muestras se trataron dentro de las 24 horas siguientes a la extracción: determinación del porcentaje medio de HbF (mediante HPLC), hemograma sanguíneo y análisis de citometría de flujo y, a continuación, congelación de las muestras restantes a -80 °C para análisis posteriores.

A continuación se explica el protocolo detallado.

1. Tratamiento previo de muestras

Se extrajeron 20 ml de sangre en los pacientes seleccionados y se recogieron en 5 tubos que contenían EDTA. Los glóbulos rojos se recuperaron después del fraccionamiento de la sangre completa mediante centrifugación a 800G durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron aproximadamente 8 ml de sedimento globular y después se lavaron en 10 ml de tampón de fosfato (DPBS 1X Gibco by life technologies Cat 14190-094, Life Technologies SAS, Saint Aubin, Francia) en un tubo de polipropileno de 50 ml. Tras la homogeneización, las suspensiones globulares se centrifugaron a 1200G durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento globular se recuperó después de la eliminación del sobrenadante y el procedimiento de lavado se llevó a cabo 3 veces.

Se llevó a cabo una primera medición del contenido de HbF (%HbF mediante HPLC x CMH) en aproximadamente 1 ml de muestra fresca, mientras que se almacenaron 7 ml de sedimento globular a -80°C utilizando fracciones alícuotas de 200 μ l en criotubos (Nalgene Cat 479-6841) utilizando glicerol (fórmula B Braun n^o 569) como agente crioconservante. Para ello, se añadió aproximadamente el 57,7% (V/V) de glicerol a los sedimentos globulares en 2 etapas. De hecho, para evitar la formación de precipitados, primero se añadió 1/3 del volumen de glicerol al sedimento globular mediante gotas agitando el criotubo, seguido de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, y el volumen de glicerol se complementó posteriormente con los 2/3 restantes. Con este procedimiento, los glóbulos rojos se pueden almacenar durante varios meses o incluso años y, al mismo tiempo, limitar su lisis.

La descongelación consiste en incubar los glóbulos rojos en un baño a 37°C o en agitarlos rápidamente con la mano, seguido de una serie de lavados con 2 soluciones de NaCl en concentraciones decrecientes para eliminar el glicerol y mantener la isotonicidad. Para ello, se añadieron primero en gotas 75 μ l de solución de desgllicerolización (NaCl al 12%, Braun B fórmula n^o 570 Melsungen, Alemania) homogeneizando las suspensiones globulares, y después se incubaron las suspensiones a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 125 μ l de NaCl glucosado al 0,9% y se incubaron las suspensiones durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron aproximadamente 4*125 μ l de NaCl glucosado al 0,9% mientras se mantenía una incubación de 5 minutos entre cada volumen de NaCl glucosado al 0,9%. Las suspensiones globulares se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 ml y

después se fraccionaron mediante centrifugación suave a 300G durante 10 minutos a temperatura ambiente aplicando una desaceleración igual a 5. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron 4*125 µl de NaCl glucosado al 0,9% mientras se mantenía una incubación de 5 minutos entre cada volumen de NaCl glucosado al 0,9% y, a continuación, las suspensiones se centrifugaron como antes. Para obtener un sedimento seco de glóbulos rojos, se añadieron de una vez 500 pl de NaCl glucosado al 0,9%, seguido de centrifugación a 800G durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al final de la última centrifugación, las muestras globulares pueden devolverse al hematocrito deseado complementándolas con una solución tampón.

2. Determinación del contenido de HbF de cada glóbulo rojo

La determinación del contenido de HbF de cada glóbulo rojo en las muestras de pacientes seleccionados se llevó a cabo tanto en muestras de glóbulos frescos como en muestras descongeladas a partir de los 3 procedimientos siguientes:

- cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar el porcentaje medio de HbF en el conjunto de los glóbulos rojos;
- hemograma sanguíneo (incluida la media de MCT); y
- citometría de flujo.

2.1. Determinación del porcentaje medio de HbF mediante HPLC

La determinación del porcentaje medio de HbF mediante HPLC en las suspensiones globulares se llevó a cabo en un sistema Variant II (Cat: 2702000 Hemoglobin Testing System, Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, Francia). Se trata de una cromatografía líquida por exclusión de iones que permite separar 3 tipos de hemoglobinas: HbF, HbA y HbA2 mediante el procedimiento V2_B-THAL_DU. El sistema está compuesto por una fase estacionaria compuesta de resina a la que se unen grupos carboxilo cargados negativamente y una fase móvil compuesta por dos soluciones tampón de bis/trifosfato que presentan fuerzas iónicas bajas y altas respectivamente, así como un detector fotométrico que emite 2 longitudes de onda diferentes: 690 nm y 415 nm para la detección del control negativo y las muestras, respectivamente. Este sistema permite cuantificar las 3 hemoglobinas a partir de la sangre entera o de una suspensión globular con un volumen mínimo de 500 µl. Para una muestra de menos de 500 pl, se llevó a cabo una dilución a 1:200 (v/v) con un reactivo de dilución antes de continuar con el análisis. Los analitos se separaron según su interacción iónica con los grupos carboxilo durante un período total de 6 minutos. La HbF se eluye después de aproximadamente 0,5 minutos. La adquisición de datos se llevó a cabo en un programa CDM 5.2 para determinar los porcentajes medios de cada tipo de Hb. El porcentaje medio de HbF se obtiene según la siguiente relación:

$$\%HbF = (ASC \text{ HbF} / ASC \text{ total Hb}) * 100$$

en donde el %HbF representa el porcentaje medio de HbF en el conjunto de la población de eritrocitos;

AUC HbF representa el área bajo la curva de la HbF en el cromatograma;

AUC total representa la suma de las áreas bajo las curvas de los 3 tipos diferentes de Hb, que en estos pacientes corresponden a HbA, HbA2 y HbF.

2.2. Determinación del contenido medio de hemoglobina por glóbulo rojo (CMH)

El contenido medio de hemoglobina por glóbulo rojo (o contenido corpuscular medio de hemoglobina o CMH) constituye una constante globular que se obtiene mediante recuento y fórmula sanguínea y hemograma sanguíneo. El CMH se determina mediante cálculo dividiendo la concentración de hemoglobina expresada por litro de sangre por el número de glóbulos rojos por litro de sangre.

Este análisis se llevó a cabo en una máquina contadora automática Horiba ABX Micros ES 60 (HORIBA Medical, Montpellier, Francia) con un volumen de muestra mínimo de 500 µL con un hematocrito de aproximadamente el 50%.

2.3. Determinación del contenido medio de HbF por glóbulo rojo (CMHbF)

La determinación de 2 parámetros medios (%HbF y CMH) obtenidos mediante HPLC y mediante hemograma sanguíneo permitió calcular el contenido medio de HbF por glóbulo rojo o CMHbF según la siguiente relación: $CMHbF = (\%HbF * CMH) / 100$

en donde CMHbF (pg) representa el contenido medio de HbF por glóbulo rojo;

%HbF representa el porcentaje medio de HbF determinado por HPLC (véase 2.1);

CMH representa el contenido medio de Hb por glóbulo rojo proporcionado por la máquina de recuento automático (véase 2.2).

3. Determinación de la fluorescencia de los glóbulos rojos marcados con un anticuerpo anti-HbF mediante citometría de flujo

3.1. Instrumentación

5 El análisis del contenido de HbF de cada glóbulo rojo se llevó a cabo en un citómetro BD FACS Canto II de 8 colores (Cat 338960, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) asociado al software de adquisición de datos DIVA®.

La citometría de flujo o FACS (fluorescence-activated cell sorting, clasificación celular activada por fluorescencia) es una técnica que permite analizar individualmente las propiedades (tamaño, granulosidad y fluorescencia) de las partículas (perlas o células) suspendidas en un sistema de flujo.

10 Es un procedimiento inmunológico basado en la técnica de inmunofenotipado que consiste en la detección antigénica mediante el reconocimiento por un anticuerpo específico que, en la mayoría de los casos, se conjuga con una molécula fluorescente. La señal medida es principalmente la intensidad de la fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de antígenos detectados por el anticuerpo específico.

15 La adquisición de datos con un citómetro requiere un tratamiento previo de las muestras, que consiste en la fijación y permeabilización de la membrana celular seguidas de un marcado intracelular con un anticuerpo específico contra la HbF conjugada con un fluorocromo.

3.2. Fijación y permeabilización de la membrana de los glóbulos rojos

La fijación y la permeabilización de la membrana de los GR se llevaron a cabo utilizando los reactivos de un kit de detección de células F denominado "kit Fetal Cell Count™" (Cat IQP-349, IQ Products, IQ Products, Groningen, Países Bajos).

20 Para fijar la membrana globular, se añadieron 5 µl de sedimento globular lavado (fresco o descongelado) y se homogeneizaron en 100 µl de reactivo de fijación o reactivo A que contenía un conservante o azida sódica (kit Fetal Cell Count™, Cat IQP-349). A continuación se añadieron 100 µl de solución tamponada de formaldehído o solución de fijación B (kit Fetal Cell Count™, Cat IQP-349) a la suspensión globular. La suspensión se homogeneizó mediante agitación vortical y después se incubó a temperatura ambiente durante exactamente 30 minutos. La suspensión
25 globular se homogeneizó suavemente cada 10 minutos. Los GR se lavaron a continuación en 2 ml de tampón PBS 1X que contenía heparina (kit Reagent D Fetal Cell Count™, Cat IQP-349), seguido de centrifugación a 300G durante 3 minutos a temperatura ambiente. El sedimento globular lavado se puso de nuevo en suspensión añadiendo 100 µl de tampón PBS 1X (kit Reagent D Fetal Cell Count™, Cat IQP-349).

30 Para permeabilizar la membrana globular, se añadieron 100 µl de solución de dodecilsulfato de sodio y reactivo de permeabilización (kit Reagent C Fetal Cell Count™, Cat IQP-349) a la suspensión de los GR fijados. Las muestras se incubaron durante exactamente 3 minutos a temperatura ambiente. Los GR se lavaron como antes. El lavado se realizó 2 veces. Tras la eliminación del sobrenadante, los sedimentos globulares se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de tampón PBS 1X (kit Reagent D Fetal Cell Count™, Cat IQP-349).

3.3. Marcado intracelular de glóbulos rojos fijados y permeabilizados

35 Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón del clon IgG1 Kappa dirigido específicamente contra la cadena gamma de la HbF humana y conjugado con ficoeritrina (PE) (kit Reagent F Fetal Cell Count™, Cat IQP-349, IQ Products) para determinar el contenido de HbF de cada glóbulo rojo previamente fijado y permeabilizado. Para ello, se depositaron 50 µl de solución de anticuerpo en 50 µl de suspensión obtenida en 3.2. Debido a sus propiedades
40 conformacionales (impedimento estérico), la ficoeritrina presenta la ventaja de tener una relación PE: anticuerpo cercana a 1.

Se utilizó una muestra no marcada con el anticuerpo como control negativo, mientras que se preparó un control isotópico añadiendo 20 µl de IgG1 Kappa de ratón acoplado con PE (Cat: 555749, BD Pharmingen™, Le Pont De Claix, Francia) en 50 µl de suspensión obtenida en 3.2 para verificar la especificidad de la unión del anticuerpo anti-HbF utilizado.

45 Las muestras marcadas y no marcadas, así como el control isotópico, se incubaron durante 15 minutos lejos de la luz y a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los GR en 2 ml de tampón PBS 1X (kit Reagent D Fetal Cell Count™, Cat IQP-349) seguido de una centrifugación a 300G durante 3 minutos a temperatura ambiente. Los sedimentos globulares lavados se pusieron en suspensión añadiendo 500 µL de tampón PBS 1X (kit Reagent D Fetal Cell Count™, Cat IQP-349). Los glóbulos rojos se analizaron con un citómetro pocos minutos después de su tratamiento previo.

50 3.4. Análisis de las muestras con citómetro

Durante el análisis, las muestras se colocaron en una cámara fría (hielo) y alejadas de la luz para evitar pérdidas de fluorescencia. Antes de la adquisición de datos, el citómetro se calibra previamente según las recomendaciones del proveedor.

La muestra no marcada se utilizó para determinar las tensiones (o PMT) para cada parámetro: FSC (dispersión directa), SSC (dispersión lateral) y fluorescencia (tabla 1). La selección de las poblaciones de glóbulos rojos se basó en los criterios de tamaño o FSC y de granulosidad o SSC en el citograma de log FSC-A frente a log SSC-A, eliminando los residuos y el ruido de fondo. El control negativo se determinó sobre la señal generada por la muestra no marcada en fluorescencia (figura 1). Para las ganancias de FSC y SSC se prefirieron las escalas logarítmicas.

Tabla 1: Ajuste del citómetro obtenido con la muestra de glóbulos rojos no marcados

Parámetros	Tensión	Log	A	H	W
FSC	341	√	√	√	√
SSC	328	√	√	√	√
PE	400	√	√	√	√

La exclusión de los dobletes de glóbulos rojos (GR) se llevó a cabo con una baja velocidad de flujo seleccionando las poblaciones de GR en los citogramas FSC-W frente a FSC-H y después en los citogramas SSC-W frente a CCS-H según la figura 2.

Se recopiló un número mínimo de 100.000 episodios o GR para mejorar la precisión del análisis y registrar un número suficiente de GR tras la exclusión de los dobletes. Para cada muestra, las estadísticas fueron generadas por el software de adquisición (Diva®) con el número de episodios registrados para cada población de GR seleccionada. La intensidad de fluorescencia (MFI) se proporciona como una media geométrica y una media aritmética.

4. Determinación de la cantidad de concentración antigénica marcada con HbF por glóbulo rojo o AG/GR

Para determinar la cantidad de HbF marcada por glóbulo rojo, la intensidad de la fluorescencia obtenida con un citómetro de flujo se transformó en una cantidad de HbF marcada por glóbulo rojo (AG/GR) utilizando las perlas calibradas contenidas en un kit para cuantificar la fluorescencia de la ficoeritrina (Becton Dickinson QuantiBRITE PE, Cat : 340495, BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francia). Estas perlas se conjugan con ficoeritrina para proporcionar 4 niveles de fluorescencia (bajo o Low, moderadamente bajo o MedLow, moderadamente elevado o MedHigh y elevado o High) que corresponden a un número de moléculas de ficoeritrina por perla (figura 3A). Antes de la adquisición de los datos de fluorescencia mediante un citómetro, las perlas se reconstituyeron en 500 µL de solución tampón de marcado compuesta por PBS 1X / 0,02% de NAN3 (v/v) (Cat: 296028 ChemCruz™ Biochemicals, Santa Cruz Biochemicals, Alemania) complementada con un 1% de BSA (Cat: A3803, Sigma, Saint-Quentin Fallavier Francia). Se recogieron al menos 10.000 perlas con los mismos ajustes utilizados para las muestras analizadas en el punto 3.4. Los datos adquiridos con el citómetro permitieron trazar una recta de calibración que combinaba el logaritmo de fluorescencia (log MFI) y el logaritmo de PE/perla (figura 3B). Aplicando esto último a la fluorescencia de los GR marcados con el anticuerpo anti-HbF, es posible deducir la cantidad de moléculas fluorescentes por glóbulo rojo. Al utilizar la relación PE: anticuerpo, el número de moléculas fluorescentes por glóbulo rojo se puede convertir en el número de anticuerpos unidos por glóbulo rojo, es decir, en el número de moléculas antigénicas (p. ej. HbF) por glóbulo rojo (AG/GR).

5. Determinación del contenido de HbF (pg) de cada GR a partir de AG/GR y CMHbF

Los datos registrados por el software de adquisición del citómetro de flujo (Diva®) se trataron en FlowJo V10 (Cat 130-099-429 Miltenyi Biotec, París, Francia). Este es un programa para analizar y visualizar datos de citometría exportados en formato "citometría de flujo estándar" o fcs. El software FlowJo permitió generar los valores de cada parámetro (FSC, SSC, Fluorescencia) para cada episodio.

Para cada muestra de GR recogida para este estudio, la distribución de la HbF marcada por el anticuerpo se representa mediante un histograma que combina el número de glóbulos rojos y el logaritmo de fluorescencia.

El contenido medio de HbF por glóbulo rojo (CMHbF) de cada muestra de pacientes seleccionados obtenido mediante la combinación de HPLC y CMH se asoció con el promedio de fluorescencia transformada en AG/GR utilizando las perlas de cuantificación.

Para determinar el contenido de HbF (en pg) de cada glóbulo rojo, se construyó una curva estándar a partir de los valores de CMHbF y los valores de AG/GR, proporcionando así un rango de CMHbF conocidos asociados con la fluorescencia (figura no presentada).

Ejemplo 2: Validación del procedimiento de determinación del contenido de HbF de cada glóbulo rojo

1. Características de los pacientes incluidos

Se seleccionó una cohorte de 12 pacientes para constituir un rango de contenidos de HbF. El criterio para seleccionar a estos pacientes fue la confirmación de una distribución homogénea y logarítmica normal de su HbF. Los datos de

estos pacientes se usaron para construir una curva estándar (véase el punto 5 del Ejemplo 1) utilizada para determinar el contenido de HbF de cada glóbulo rojo. La tabla 2 resume los datos demográficos y las características genéticas de estos pacientes.

Tabla 2: Datos demográficos y biológicos de los pacientes incluidos para construir la curva estándar

Pacientes	Edad en la inclusión (años)	Sexo	Características genéticas	HbF (%)	CMH (pg)	CMHbF (P9)	VGM (μm^3)
1	18	Hombre	β -talasemia	100	24,5	24,5	73
2	62	Hombre	β -talasemia	69,6	27,2	18,93	91
3	50	Hombre	β -talasemia	61,5	20,1	12,36	64
4	46	Hombre	β -talasemia	53,2	19,3	10,27	63
5	50	Mujer	HPFH2 ghanés	34,8 0	28	9,74	81
6	39	Mujer	β -talasemia	27,9	28	7,76	81
7	39	Hombre	β -talasemia	21	23,8	5	72
8	43	Mujer	β -talasemia	16,4	23,6	3,87	71
9	37	Hombre	β -talasemia	14,9	18,5	2,76	62
10	60	Mujer	β -talasemia	2,7	23,4	3,11	67
11	58	Hombre	β -talasemia	0,8	19,4	0,15	64
12	23	Hombre	β -talasemia	0,8	27,8	0,22	83

5

Se verificó una distribución homogénea de las fluorescencias de los glóbulos rojos y, por lo tanto, del contenido de HbF en el conjunto de las muestras recogidas (figura 4). La figura 4 muestra en una escala semilogarítmica la distribución logarítmica normal del contenido de HbF por GR de los 12 pacientes del rango.

2. Prueba de reproducibilidad de las distintas mediciones

10 Se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad probando las variabilidades en las siguientes medidas:

- CMHbF en glóbulos rojos frescos y después de una serie de descongelación
- Las MFI se obtienen con perlas de PE Quantibrite y GR
- AG/GR tras una serie de descongelación

15 No se observaron diferencias significativas en los valores de CMHbF (pg) obtenidos en glóbulos rojos frescos y después de 12 descongelaciones ($n=13$, $p>0,9999$) ni en los AG/GR medidos después de 11 descongelaciones ($p = 0,73$). Asimismo, el análisis de la variabilidad de los datos obtenidos en las perlas de cuantificación no reveló ninguna diferencia significativa ($n = 11$, $p = 0,99$).

3. Procedimiento para medir el contenido de HbF de cada glóbulo rojo

20 El rango de CMHbF obtenido en pacientes que presentaban una distribución homogénea de los contenidos de HbF por glóbulo rojo se asoció con las intensidades de la fluorescencia y, después, con las cantidades antigénicas por glóbulo rojo mediante perlas de calibración. Se determinó una curva estándar (o recta de regresión) a partir de las medias de los AG/GR obtenidos después de 11 descongelaciones y los CMHbF para cada paciente (figura 5).

25 Se obtuvo un coeficiente de correlación del 97,18% ($r^2= 0,9444$) entre los valores de CMHbF y las medias de las cantidades antigénicas de HbF (marcada por el anticuerpo fluorescente) por glóbulo rojo, para los distintos pacientes. Esta curva estándar permite determinar el contenido de HbF por GR para un valor de fluorescencia dado. La precisión de las mediciones proviene de un intervalo de confianza del 95% determinado a partir de la curva estándar "media", las desviaciones estándar entre cada regresión y el número de modelos de regresión utilizados para calcular la media.

Ejemplo 3: Estudio de la distribución de HbF durante el tratamiento con hidroxiurea

1. Pacientes

30 Se llevó a cabo un estudio prospectivo, longitudinal y monocéntrico en una cohorte de 29 pacientes adultos con drepanocitosis (edad ≥ 18 años) con una mutación homocigótica SS, que comenzaron el tratamiento con hidroxiurea y fueron objeto de seguimiento regular en el Centro de Referencia para los Síndromes Drepanocíticos Mayores del Centro Hospitalario Universitario Henri Mondor de Créteil. Se excluyó del estudio a los pacientes que tuvieron una

crisis que requirió hospitalización y/o un programa de cambio de transfusiones durante los últimos 3 meses anteriores a la inclusión, así como a las pacientes con un embarazo en curso o que querían quedar embarazadas.

5 Los pacientes que cumplían los criterios de elegibilidad fueron objeto de seguimiento en varios momentos antes y durante el tratamiento con hidroxiurea: 30 (antes del inicio del tratamiento con hidroxiurea), a los 15 días, 1 mes, 3 meses, 4 meses y 6 meses o más después del inicio del tratamiento con hidroxiurea (D15, M1, M3, M4 y \geq M6, respectivamente).

10 Según la Declaración de Helsinki sobre los principios éticos aplicables a la investigación médica en seres humanos (Asociación Médica Mundial, texto en vigor desde 2008, apartado 24), todos los pacientes reclutados fueron informados de los riesgos y beneficios de este estudio y dieron su consentimiento por escrito antes de su inclusión. según la legislación vigente (artículos L.1121-3 y R.5121-13 del Código de Salud Pública), la información de los pacientes se protegió de forma anónima para garantizar la confidencialidad durante todo el estudio.

Este protocolo de investigación ha obtenido la opinión favorable del Comité IV para la Protección de las Personas de Île-de-France ubicado en el Hospital Saint-Louis (nº IRB 00003835).

2. Procedimientos

15 Durante cada visita al centro (D0, D15, M1, M3, M4 y \geq M6), se recogieron aproximadamente 16 ml de sangre en 4 tubos que contenían EDTA.

2.1. Tratamiento previo de muestras globulares

20 Las muestras se trataron dentro de las 24 horas posteriores a la toma de las muestras. Implica la separación de los glóbulos rojos según su densidad y la crioconservación de las fracciones globulares y los glóbulos rojos totales o no fraccionados.

3. Análisis de muestras globulares

Las diversas mediciones realizadas en cada fracción globular o en el GR total estuvieron compuestas por:

- el recuento y la fórmula o el hemograma sanguíneo mediante una máquina de recuento automático;
- la medición del porcentaje medio de HbF (%HbF) mediante HPLC; y
- 25 - la medición de la intensidad de fluorescencia de cada GR marcado con un anticuerpo dirigido contra la HbF mediante citometría de flujo según el protocolo detallado en el Ejemplo 1.

3.1. Hemograma y fórmula sanguínea, medición del porcentaje medio en HbF (%HbF) mediante HPLC

Estos análisis se llevaron a cabo en GR frescos y después de descongelarlos utilizando las mismas técnicas que las descritas en el Ejemplo 1.

3.2. Medición del contenido de HbF de cada GR mediante citometría de flujo

Este análisis se llevó a cabo después de descongelar los GR conservados a -80 °C según la técnica descrita en el Ejemplo 1.

35 La determinación del contenido de HbF de cada GR se llevó a cabo utilizando la curva estándar descrita en el Ejemplo 1 a partir de las intensidades de fluorescencia de cada glóbulo rojo transformado en AG/GR mediante las perlas de QuantiBRITE PE. Las mediciones se realizaron en cada etapa del tratamiento (D0, D15, M1, M3, M4 y \geq M6) en las distintas fracciones globulares: glóbulos rojos no densos, densos y totales.

4. Análisis estadísticos

40 En los pacientes con SS que tomaban hidroxiurea, los porcentajes de GR que contenían contenidos de HbF agrupados en clases definidas arbitrariamente (0 a 2 pg, 2 a 4 pg, 4 a 6 pg, etc.) se compararon durante el seguimiento longitudinal para determinar las variaciones en la distribución de la HbF antes y durante el tratamiento con hidroxiurea. Las comparaciones entre cada etapa de tratamiento se realizaron utilizando una ANOVA medida de forma repetida entre D0, D15-M3 y \geq M6 en el total de glóbulos rojos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism® versión 6 (RITME Informatique Paris, Francia).

45 5. Resultados

5.1. Datos demográficos e indicaciones de la hidroxiurea

Se incluyó a un total de 29 pacientes adultos con SS. En el conjunto de la cohorte, se hizo un seguimiento de 10

pacientes entre 30 y \geq M6, se hemolizaron las muestras de GR de un paciente y se analizaron 9 pacientes.

Los datos demográficos de los pacientes incluidos se compendia en la tabla 3.

Tabla 3: Datos demográficos de los pacientes con SS que toman hidroxiurea

	Hombres	Mujeres
N	13	16
Edad	33 [28,50 ; 45]	36 [31 ; 44,25]
<i>Edad expresada en mediana [percentil 25; percentil 75]</i>		

5 La hidroxiurea se administró con una dosis media de 15 mg/kg/día para las siguientes indicaciones: prevención de CVO, trastornos viscerales crónicos, úlceras en las piernas, nefropatía drepanocítica, hemólisis importante con anemia, priapismo, accidente cerebrovascular.

3.2. Datos biológicos

10 El porcentaje medio de HbF (%HbF) aumenta aproximadamente 3 veces después de 6 meses de tratamiento con hidroxiurea. Los datos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Variación del %HbF durante el tratamiento con hidroxiurea

	D0	D15-M1	M3-M4	M6	p (D0 y M6)
Total de glóbulos rojos	2,65 [1,8-6,35]	4,9 [1,85-8,4]	7 [2,4-17,80]	10,05 [3,33-19,13]	0,03
<i>Datos expresados en mediana [percentil 25; percentil 75]</i>					

15 Se observó un aumento significativo del volumen globular medio (VGM) y del contenido medio de hemoglobina por glóbulo rojo (CMH) después de 6 meses de tratamiento con hidroxiurea, lo que indica un buen cumplimiento por parte de los pacientes y la eficacia del tratamiento a pesar del bajo número de pacientes. El porcentaje de glóbulos rojos densos tiende a disminuir; sin embargo, esta disminución no es significativa. Del mismo modo, para la concentración media corpuscular de hemoglobina (CMCH), los leucocitos y las plaquetas, no se observó ninguna variación significativa. Los resultados se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Datos biológicos antes y durante el tratamiento con hidroxiurea

	D0	M6	p
Hemoglobina (g/dl)	8 [6,65-9,05]	9,35 [7,30-10,10]	0,2
Leucocitos (giga/L)	10,70 [9,45-12,20]	9 [5,35-11,58]	0,11
VGM (fento litro)	87 [83-95]	100,50 [87,75-115]	0,03
CMCH (g/dl)	32,60 [32,05-35,10]	34,40 [32,43-35,70]	0,08
CMH (pg)	29,70 [25,30-32,85]	33,80 [30,70-39,65]	0,008
Plaquetas (giga/l)	359 [288-548]	318 [257-438,80]	0,18
<i>Datos expresados en mediana [percentil 25; percentil 75]</i>			

20

5.3. Distribución de la HbF durante el tratamiento con hidroxiurea

25 El análisis cualitativo mediante citometría de flujo de la respuesta al tratamiento con hidroxiurea muestra una distribución heterogénea de la HbF antes del inicio del tratamiento en 8 pacientes. Tras 6 meses de tratamiento con hidroxiurea, la HbF sigue una distribución homogénea en 6 pacientes. La distribución de la HbF se vuelve homogénea a partir de M2 en 1 paciente y después de \geq M4 en 5 pacientes. La figura 6 ilustra las variaciones en la distribución de la HbF durante el tratamiento con hidroxiurea en el total de glóbulos rojos.

30 La distribución de la HbF se analizó cuantitativamente utilizando el procedimiento descrito en el Estudio 1. Se determinó el número de glóbulos rojos por intervalo de contenido de HbF (pg) para cada paciente. El análisis de la distribución de los glóbulos rojos a lo largo del tiempo con hidroxiurea se llevó a cabo en 9 pacientes. Los resultados muestran una variación significativa en los glóbulos rojos con los contenidos más bajos de HbF (0 y 2 pg) con una disminución de aproximadamente un 25% entre D0 y M6. Los glóbulos rojos con un contenido de HbF superior a 20 g aumentan de manera importante, hasta 3 veces, después de 6 meses de tratamiento con hidroxiurea; sin embargo,

esta variación no es significativa. Los glóbulos rojos con contenidos moderadamente elevados presentan variaciones mucho más bajas.

Tabla 6: Distribución de glóbulos rojos según el intervalo de contenido de HbF en tratamiento con hidroxiurea

HbF (pg)	30% (GR)	D15 (%)	≥M6 (% GR)	p
[0 ; 2[71,13 (23,16)	65,63 (25,13)	53,17 (30,63)	0,0083
[2 ; 4[9,14 (7,44)	11,32 (6,80)	15,05 (10,11)	0,1868
[4 ; 6[4,54 (3,86)	4,88 (2,90)	6,70 (4,39)	0,2226
[6 ; 8[3,16 (2,92)	3,42 (2,52)	3,92 (2,44)	0,5186
[8 ; 10[2,42 (2,32)	2,65 (2,18)	2,72 (1,83)	0,6932
[10 ; 15[1,94 (1,84)	2,41 (2,73)	2,55 (2,57)	0,3926
[15 ; 20[3,66 (3,35)	4,42 (4,27)	4,29 (3,42)	0,474
≥20	4,01 (4,35)	5,27 (8,56)	11,60 (18,64)	0,1626

Los datos se expresan como media (desviación estándar)

5 La medición de las intensidades de fluorescencia de cada glóbulo rojo mediante citometría de flujo permitió clasificar cada glóbulo rojo según su contenido de HbF. El análisis de la distribución de los glóbulos rojos según su contenido de HbF permite identificar diferentes perfiles de respuesta al tratamiento. A modo de ejemplo, los pacientes 11 y 24 (tablas 7 y 8), que expresan %HbF idénticos a D0 (6%) y a M6 (18%) con un CMH en D0 = 33,6 y 34,5 pg y en M6 de 38,9 y 42 pg (pacientes 11 y 24 respectivamente), tienen 2 distribuciones diferentes. En el paciente 11 se observa un menor número de glóbulos rojos con un contenido de HbF inferior a 2 pg, con una disminución de aproximadamente el 73% en M6, mientras que el paciente 24 presenta un mayor número de glóbulos rojos con un contenido de HbF inferior a 2 pg con una disminución de aproximadamente el 40% en M6. La distribución de la HbF en el paciente 11 se describe mediante una curva bimodal en D0 y en M6, mientras que la distribución del paciente 24 tiene una distribución relativamente homogénea en cantidades bajas de HbF con un claro cambio del conjunto hacia cantidades mayores.

15 **Paciente 11**

HbF (pg)	D0 (% GR)	D15-M1 (% GR)	M3-M4 (% GR)	≥M6 (% GR)
[0 ; 2[48,44	55,38	48,83	12,93
[2 ; 4[26,27	23,31	31,73	17,62
[4 ; 6[8,13	6,25	9,30	11,85
[6 ; 8[3,77	3,07	4,32	8,05
[8 ; 10[2,69	2,55	2,04	6,08
[10; 15[2,41	2,24	0,72	6,13
[15 ; 20[4,21	4,42	2,46	9,77
≥20	4,08	2,78	0,59	27,57

Paciente 24

HbF (pg)	D0 (% GR)	D15-M1 (% GR)	M3-M4 (% GR)	≥M6 (% GR)
[0 ; 2[60,82	53,17	44,56	36,98
[2; 4[9,38	11,57	24,93	25,28
[4; 6	4,83	6,69	12,53	13,64
[6 ; 8[4,01	5,58	5,81	6,92
[8 ; 10[3,63	4,50	3,09	3,93
[10 ; 15[3,83	3,89	1,87	2,70
[15 ; 20[6,38	7,56	3,81	5,36
≥20	7,12	7,04	3,41	5,20

Tablas 7 y 8: distribución de cada glóbulo rojo según su contenido en las clases de HbF (en relación con el total de glóbulos rojos) antes y durante el tratamiento con hidroxiurea

También se analizaron los datos biológicos de los pacientes 11 y 24 (Tabla 9 a continuación).

5

Tabla 9: Datos biológicos de los pacientes 11 y 24. HbF = hemoglobina F; RETIC = reticulocitos; LDH = lactato deshidrogenasa; ASAT = aspartato transaminasa

	Paciente 11 (D0)	Paciente 11 (M6)	Paciente 24 (10)	Paciente 24 (M6)	Diferencia relativa en % D0 frente a M6 (paciente 11)	Diferencia relativa en % D0 frente a M6 (paciente 24)
HbF (g/dl)	6,2	7,1	7,6	8,7	+14,5	+14,5
RETIC (g/l)	275	63	271	116	-77,1	-57,2
LDH (UI/l)	905	383	509	303	-57,7	-40,5
ASAT (UI/l)	55	26	32	29	-52,7	-9,4

10

15

Los datos biológicos mostraron que los pacientes 11 y 24 presentan diferencias relativas idénticas en la HbF (+14,5%) antes y después de 6 meses de tratamiento con hidroxiurea. No obstante, presentan diferencias significativas en cuanto a la distribución de la HbF (véase la Tabla 8). El paciente 11, en comparación con el paciente 24, presenta menos GR que tengan un alto contenido protector de HbF (17% de GR frente a 25% de GR > 6 pg de HbF) antes del tratamiento (30), lo que podría explicar una anemia más importante (6,2 g/dl frente a 7,6 g/dl) y una mayor hemólisis (LDH a 905 UI/l frente a 509 UI/l). Por otro lado, el aumento de GR > 6 pg de HbF en el paciente 11 fue más marcado que en el paciente 24, a los 6 meses de tratamiento (57% frente al 24%), y podría explicar una mayor disminución de la hemólisis durante el tratamiento (RETIC: -77% frente al -57%; LDH: - 57% frente al -40,5%; ASAT: -52% frente al -9,4%).

20

Se muestra otro ejemplo de distribución según el contenido de HbF de cada glóbulo rojo para el paciente 2. Antes del tratamiento con hidroxiurea, el paciente 2 tenía una distribución relativamente homogénea del contenido de HbF. Sin embargo, en M6, la distribución se caracterizó por un claro aumento de los glóbulos rojos con un contenido superior a 20 pg, en detrimento de todas las demás clases (Tabla 10). Cabe señalar que el %HbF varía del 6 al 25% entre 30 y M6, lo que es similar a los 2 ejemplos anteriores.

Tabla 10: distribución de los glóbulos rojos según su contenido de clases de HbF (con respecto a los glóbulos rojos totales) antes y en el curso del tratamiento con hidroxiurea para el paciente 2

HbF (pg)	D0 (% GR)	D15-M1 (% GR)	M3-M4 (% GR)	≥M6 (% GR)
[0 ;2[22,43	9,21	5,29	4,98
[2 ;4[15,76	14,72	8,62	7,04
[4 ;6[12,85	9,52	10,61	5,53
[6 ;8[10,04	8,47	10,39	4,85
[8 ;10[7,84	7,35	8,75	4,56
[10 ;15[5,79	9,03	8,50	7,48
[15 ;20[11,05	14,27	14,54	9,75
≥20	14,24	27,43	33,30	55,81

6. Conclusión

25

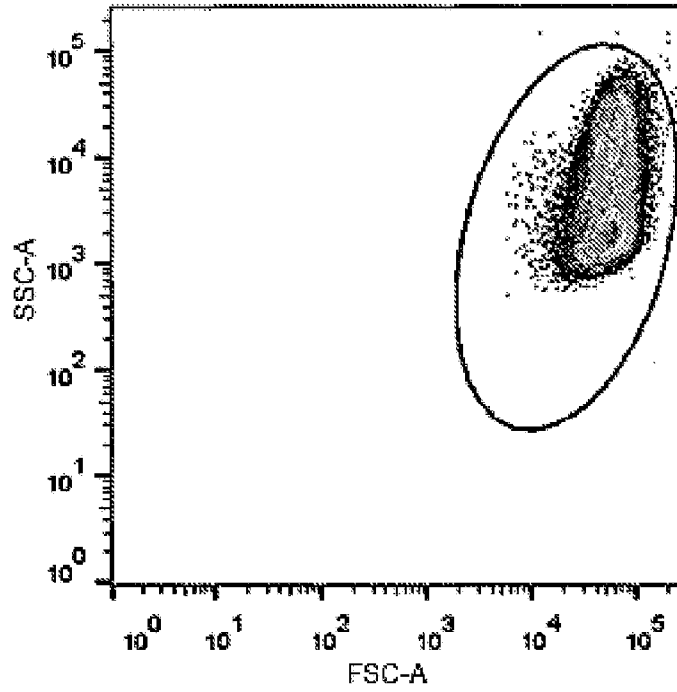
Los datos mostraron que los glóbulos rojos que presentaban un contenido de HbF muy bajo disminuyen bruscamente y que los glóbulos rojos que tienen un contenido de HbF superior a 20 pg aumentan significativamente, hasta 3 veces, después de 6 meses de tratamiento con hidroxiurea.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de determinación *in vitro* del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos que comprende las etapas de:
 - a) aislar los glóbulos rojos a partir de una muestra;
 - 5 b) permeabilizar la membrana de los glóbulos rojos aislados;
 - c) marcar la HbF de los glóbulos rojos obtenidos en la etapa b) con un anticuerpo anti-HbF conjugado con un fluorocromo;
 - d) medir por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia (MFI) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos;
 - 10 e) determinar el contenido de hemoglobina F de cada glóbulo rojo del conjunto de glóbulos rojos comparando la intensidad de fluorescencia de cada glóbulo rojo con una curva estándar que permita asociar la intensidad de fluorescencia medida para un glóbulo rojo con un contenido de HbF.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, en donde la membrana de los glóbulos rojos aislados se fija antes de la etapa de permeabilización.
- 15 3. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha muestra es una muestra de sangre, preferiblemente una muestra de sangre humana.
4. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho fluorocromo es la ficoeritrina (PE).
5. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho anticuerpo anti-HbF se dirige contra la cadena gamma de la HbF.
- 20 6. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la membrana de los glóbulos rojos aislados está permeabilizada con dodecilsulfato de sodio.
7. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la membrana de los glóbulos rojos aislados se fija con azida sódica y/o formaldehído.
- 25 8. Procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el contenido de hemoglobina F se determina para cada glóbulo rojo de un conjunto de al menos 10.000 glóbulos rojos, preferiblemente al menos 100.000 glóbulos rojos, preferiblemente entre 50.000 y 100.000 glóbulos rojos.
9. Procedimiento de determinación *in vitro* de la cantidad de glóbulos rojos transfundidos a un paciente, que comprende:
 - 30 a) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos de una muestra de glóbulos rojos de un paciente según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, ;
 - b) la utilización de los resultados de la etapa a) para determinar la cantidad de glóbulos rojos transfundidos en un paciente, teniendo dichos glóbulos rojos transfundidos un contenido de HbF sustancialmente igual a cero (= 0 pg).
- 35 10. Procedimiento *in vitro* de seguimiento de la eficacia terapéutica de un tratamiento de la drepanocitosis o de la β -talasemia, que comprende:
 - a) la determinación del contenido de hemoglobina F (HbF) de cada glóbulo rojo de un conjunto de glóbulos rojos a partir de una muestra de glóbulos rojos de un paciente que se ha sometido a un tratamiento de la drepanocitosis o de la β -talasemia según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;
 - 40 b) la utilización de los resultados de la etapa a) en la determinación de la eficacia terapéutica del tratamiento de la drepanocitosis o de la β -talasemia, en donde se observa una eficacia terapéutica cuando al menos un porcentaje predeterminado de los glóbulos rojos del conjunto de glóbulos rojos tiene un contenido de HbF que supera un umbral de referencia de 2 pg o más y/o cuando se observa una disminución de la cantidad de glóbulos rojos que tienen un contenido de HbF < 2 pg.
- 45 11. Procedimiento de la reivindicación 10, en donde el umbral de referencia de 2 pg o más es de 3 pg, 4 pg, 5 pg, 6 pg, 7 pg o 7,5 pg.

Figura 1

A



B

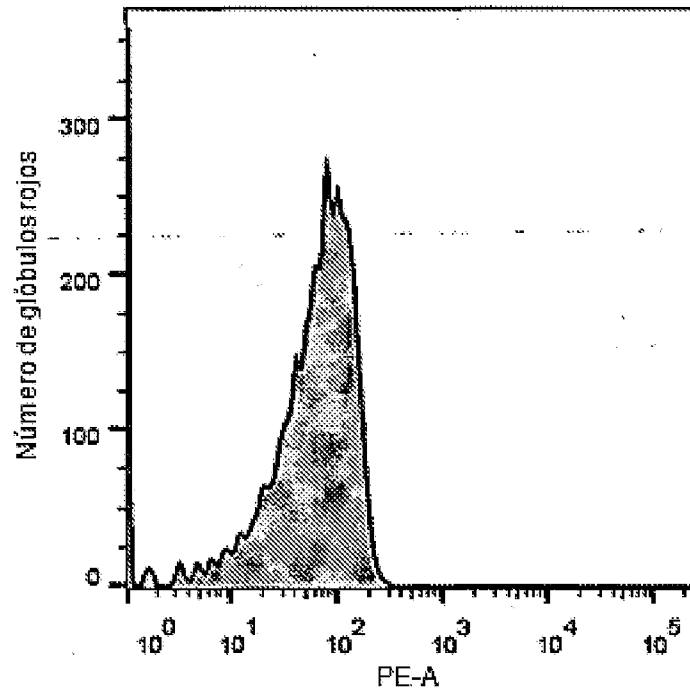


Figura 2

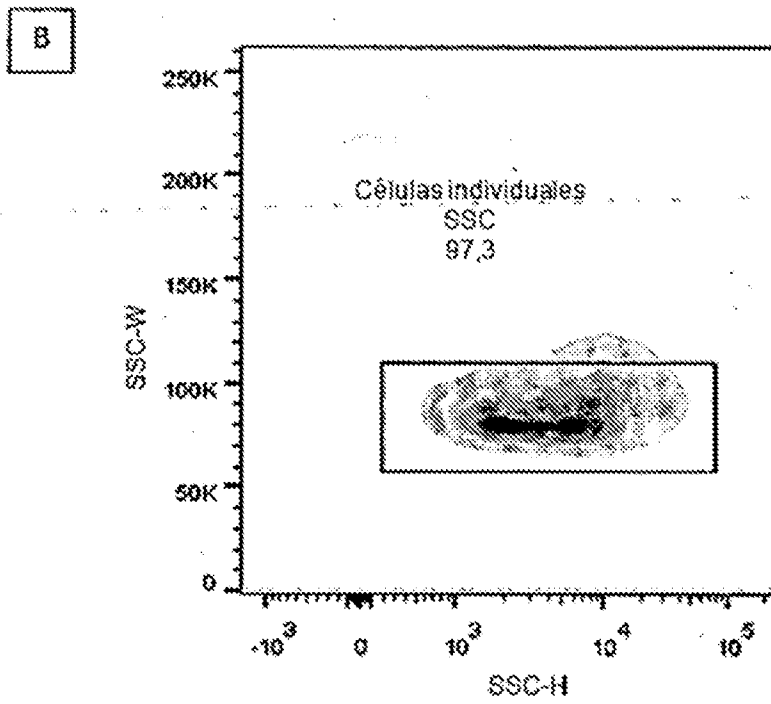
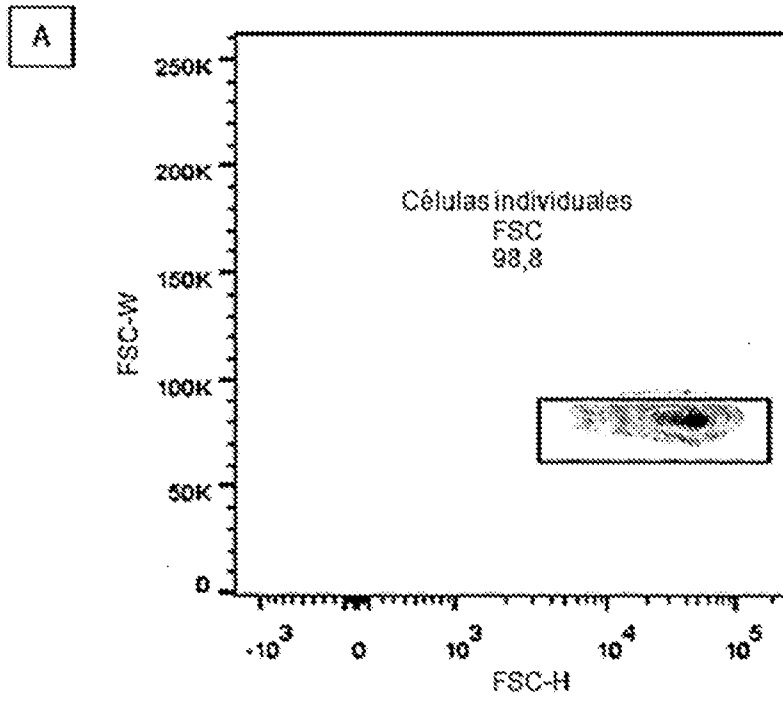


Figura 3

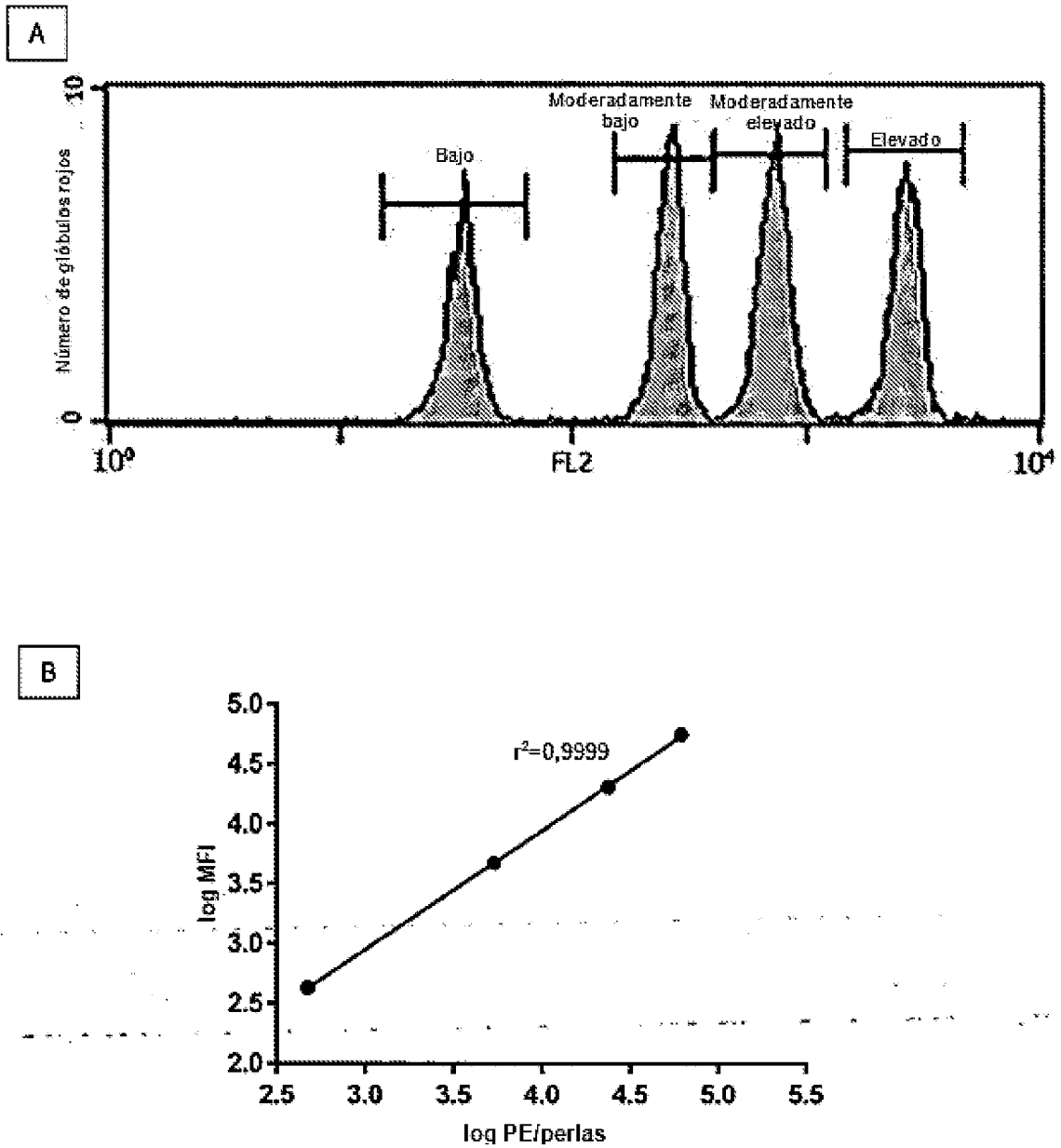


Figura 4

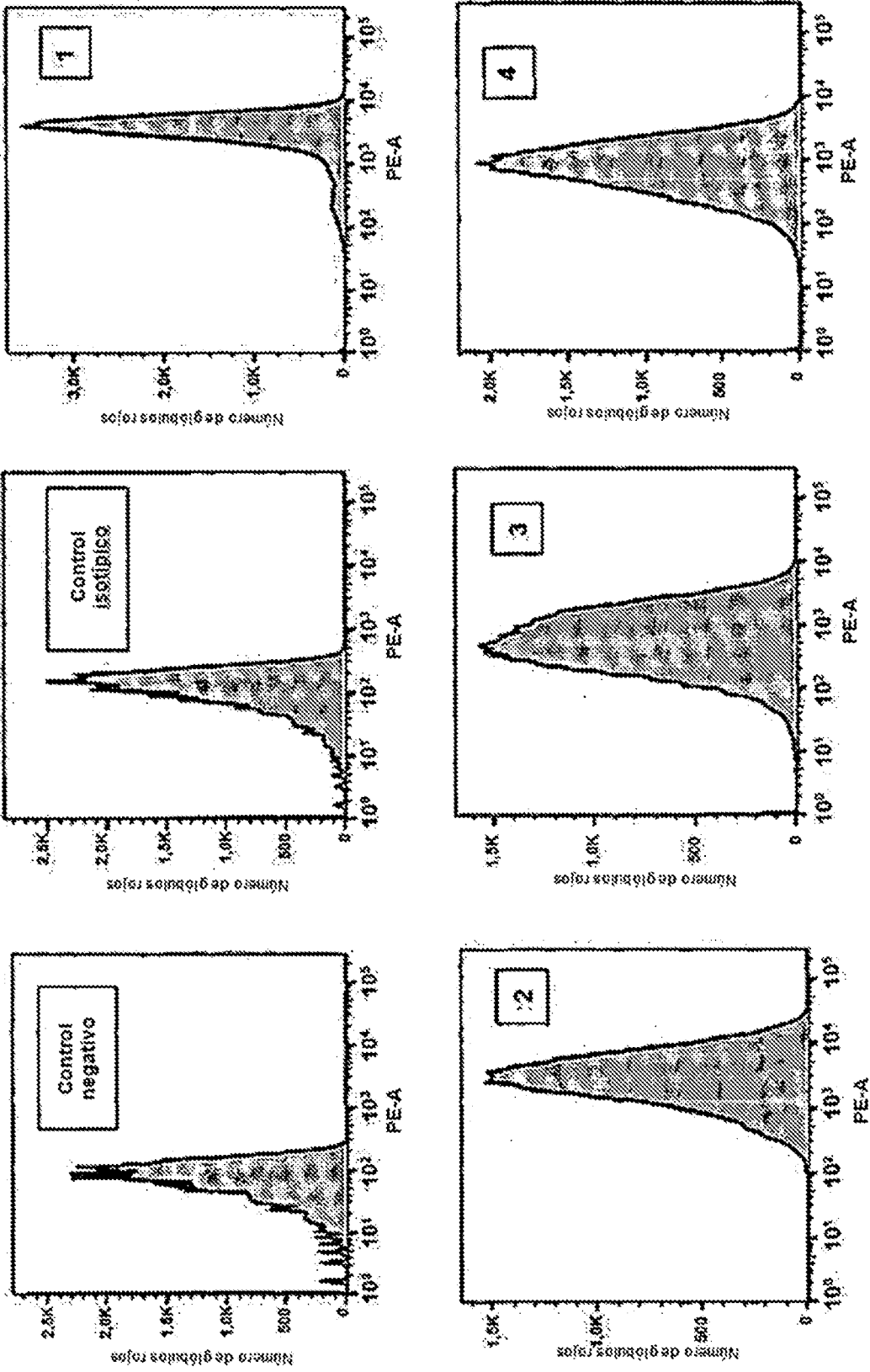


Figura 4

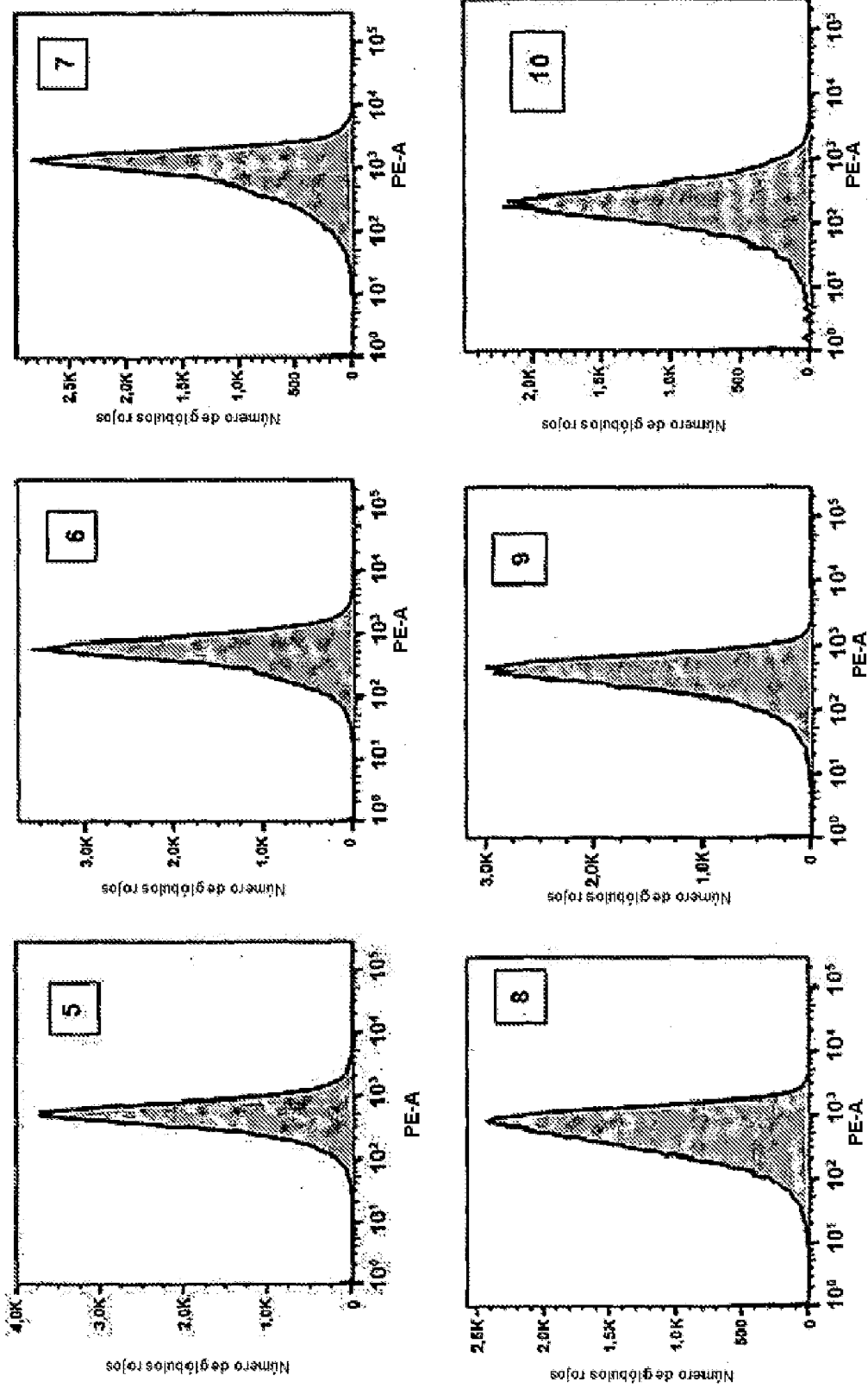


Figura 4

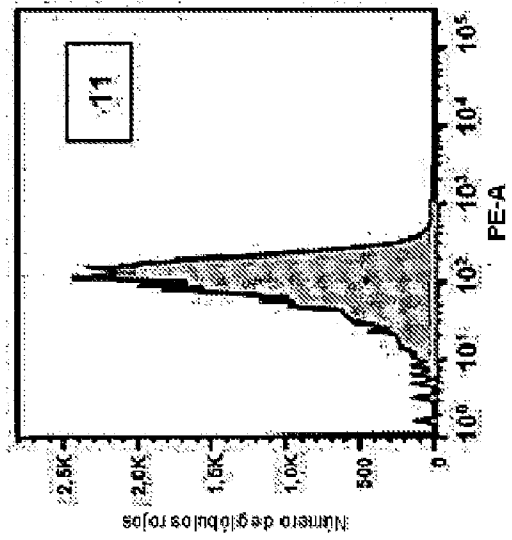
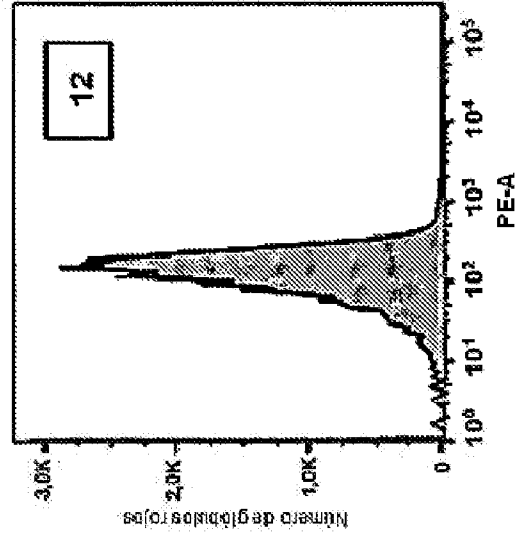


Figura 5

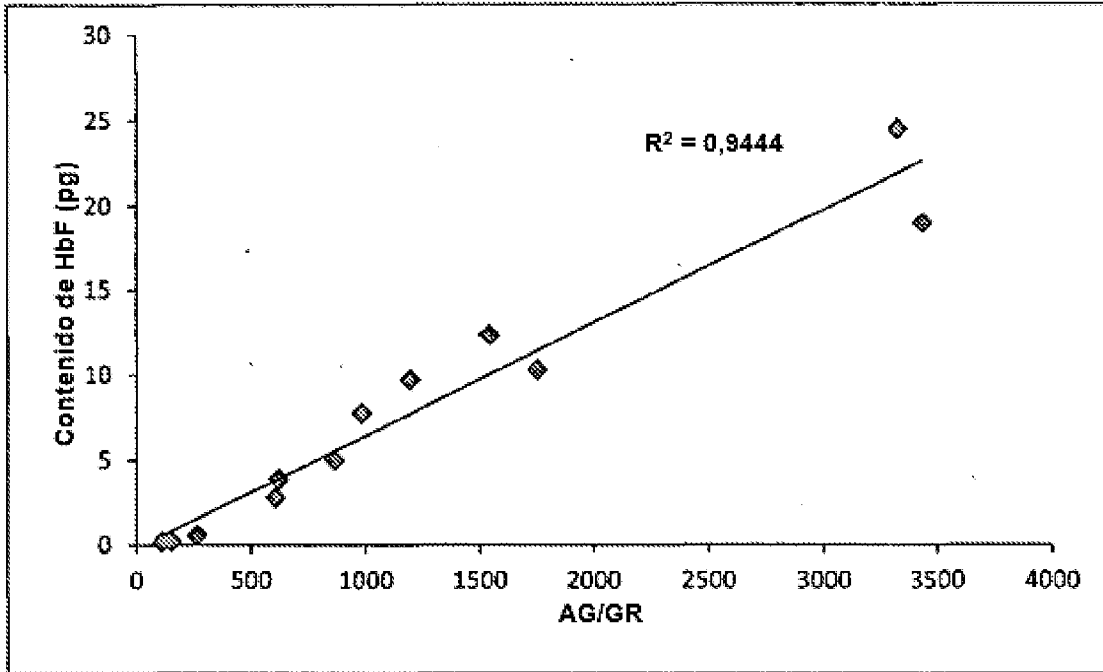


Figura 6 A

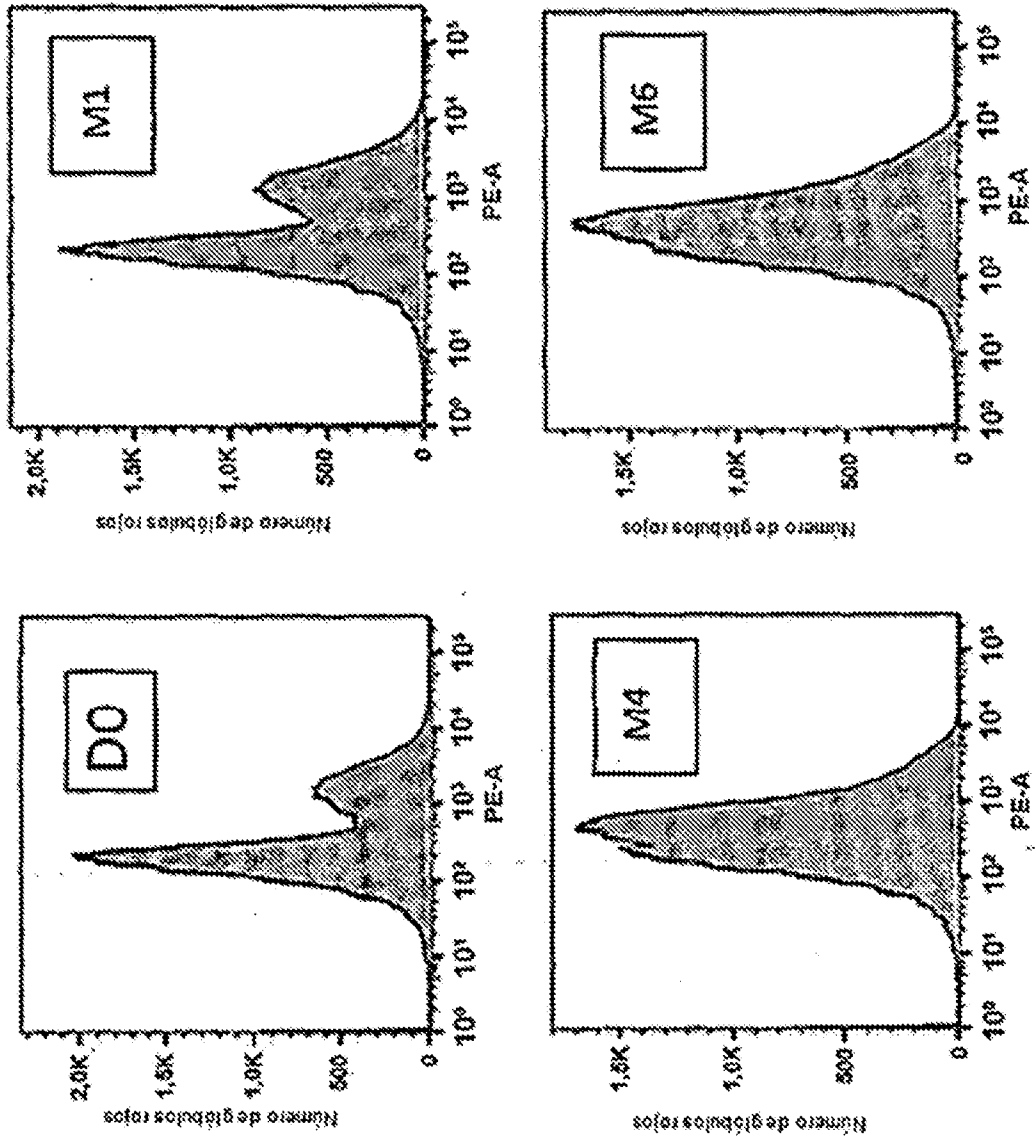


Figura 6 B

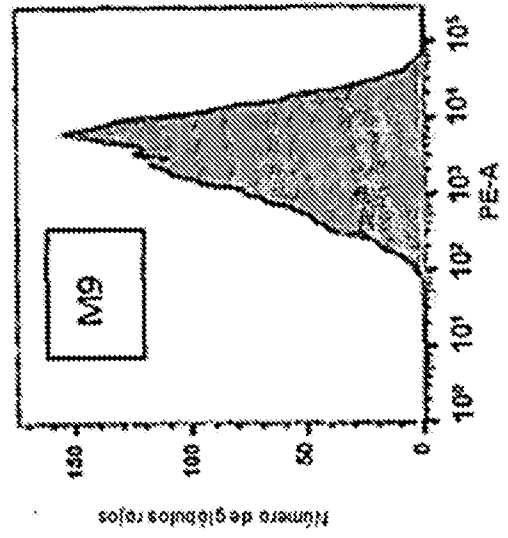
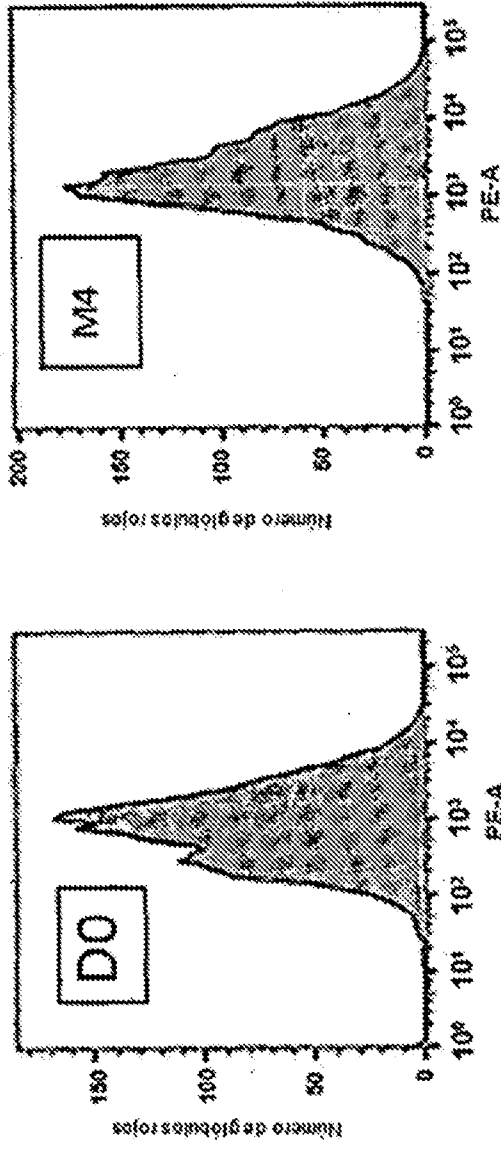


Figura 6 C

