



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 511**

51 Int. Cl.:
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00930348 .8**
86 Fecha de presentación : **03.05.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1181551**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

54 Título: **Productos y procedimientos para el fenotipado de células de tipo de parámetro único o múltiple.**

30 Prioridad: **04.05.1999 US 132395 P**

73 Titular/es: **Dan A. Pankowsky**
6030 Bresslyn Road
Nashville, Tennessee 37205, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

72 Inventor/es: **Pankowsky, Dan A.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 275 511 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Productos y procedimientos para el fenotipado de células de tipo parámetro único o múltiple.

5 Sector al que pertenece la invención

La presente invención se refiere de manera general al fenotipado y al inmunofenotipado de células, y más particularmente al fenotipado e inmunofenotipado de células mono y multiparamétrico.

10 Antecedentes de la invención

El inmunofenotipado de células y tumores, tumores hematopoyéticos, es habitualmente de importancia crítica particularmente en la evaluación clínica de pacientes con cáncer. No obstante, las metodologías actualmente disponibles, particularmente la citometría de flujo, son caras y requieren un alto grado de sospecha en el momento de la biopsia. Muy frecuentemente, incluso antes de que se haya realizado el diagnóstico de un cáncer, hay que reservar un poco de tejido para un posible inmunofenotipado. Si no se reserva el tejido y existe un cáncer, después no podrá realizarse el subtipado correcto del tumor (y la asignación correcta a protocolos de tratamiento). Los procedimientos que no requieran una planificación, tal como la inmunotinción de bloques de parafina, son bastante menos sensibles y no funcionan correctamente en laboratorios que no realicen estas tinciones frecuentemente. La citometría de flujo es el “patrón oro” actualmente aceptado para el inmunofenotipado de tipos celulares hematopoyéticos. No obstante, hay varios problemas asociados con este procedimiento. Los costes para equipar y mantener estos laboratorios es quizás el problema más difícil. Generalmente, los grandes hospitales, los centros de enseñanza, o los laboratorios de referencia comercial son las únicas instituciones capaces de montar laboratorios de citometría de flujo. Estos laboratorios cobran habitualmente elevadas tarifas por sus servicios, y el transporte de las muestras a los laboratorios no constituye un problema trivial. Dado que la citometría de flujo requiere células vivas, las muestras deben ser manipuladas en condiciones estériles. En los laboratorios que no dispongan de esta tecnología, hay que preparar una muestra nueva y enviarla a un laboratorio de citometría de flujo en condiciones estériles para su evaluación. Los factores incontrolables tales como las variaciones de temperatura, una mala manipulación, contaminación bacteriana o retrasos en el envío pueden hacer que las muestras ya no sean válidas para su análisis. Además, la citometría de flujo requiere técnicos que hayan recibido una formación especializada y que se dediquen exclusivamente a dicha tecnología, lo que aumenta aún más los costes del procedimiento. Se deben analizar volúmenes de células relativamente grandes para obtener resultados estadísticamente significativos durante el análisis. Además, hay que eliminar los eritrocitos de la muestra antes del análisis. Esto es porque el número de eritrocitos en muestras de sangre y médula ósea es muy superior al resto de tipos celulares, y los números de corte por sí solos podrían desbordar los detectores sensibles de las máquinas. El procedimiento de preparación de muestras requiere por lo tanto una separación Ficoll-Hypaque, seguida de varios lavados y una etapa de lisis para lisar los eritrocitos que queden. Este procedimiento elimina virtualmente los megacariocitos de la mayoría de análisis y destruye frecuentemente las células malignas delicadas (particularmente los tumores relativamente comunes como linfoma de células grandes y la enfermedad de Hodgkin). Es en estas situaciones cuando la gran sensibilidad y complejidad de la citometría de flujo puede ser una desventaja.

A pesar de los problemas descritos anteriormente, no obstante, la citometría de flujo puede identificar con gran precisión y sensibilidad la presencia de células malignas y caracteriza el tipo de células malignas. Sin la información que la citometría de flujo ofrece, los casos pueden ser diagnosticados incorrectamente con frecuencia, con consecuencias catastróficas para el paciente. Esto es particularmente válido en el marco de un tipo de biopsia llamada aspiración por aguja fina en la que la exploración de un solo portaobjetos con un microscopio óptico puede ser bastante difícil.

Lo que sería muy útil para el patólogo de un hospital medio, o para cualquier médico en un entorno ambulatorio o remoto, es un dispositivo o un kit que pudiera permitir el mismo tipo de análisis monoparamétrico o multiparamétrico de las muestras usando materiales más baratos y más fácilmente disponibles. Esto eliminaría la necesidad de laboratorios especializados y técnicos dedicados exclusivamente a la propia tecnología de la citometría de flujo y permitiría que cualquier técnico de laboratorio con formación clínica accediera fácilmente al mismo tipo de análisis. Además, si se pudiera eliminar la necesidad de células vivas, las células podrían conservarse con fijadores apropiados que ampliarían la disponibilidad de datos del inmunofenotipado.

En los últimos 20 años ha habido un enorme crecimiento en la identificación y caracterización de moléculas expresadas por las células sanguíneas en sus membranas celulares (llamadas antígenos de membrana). Este crecimiento en el conocimiento ha estado acompañado por el refinado de las tecnologías que permiten la identificación rápida y sensible de estas moléculas en la superficie de las células vivas. No obstante, la abrumadora mayoría de estos antígenos de superficie celular no son exclusivos de un solo tipo celular. Sólo rara vez hay un sólo marcador de diagnóstico para identificar un tipo celular. De hecho, la mayoría de poblaciones celulares debe ser caracterizada analizando varios parámetros al mismo tiempo.

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmunitario corporal que tienen la capacidad de unirse a una sola molécula específica (conocida como antígeno). Los complejos antígeno-anticuerpo se forman cuando un anticuerpo se une a sus antígenos respectivos. Normalmente, el sistema inmunitario elimina estos complejos para proteger el cuerpo de una infección. No obstante, el sistema inmunitario tiene una capacidad virtualmente limitada para producir anticuerpos únicos, que pueden ser modificados específicamente para identificar sustancias particulares, incluso cuando se encuentran en cantidades muy pequeñas. Actualmente, hay anticuerpos comercialmente disponibles produ-

cidos literalmente, para cientos de distintos antígenos. Además, los anticuerpos pueden ser fácilmente etiquetados con moléculas marcadoras, tal como moléculas fluorescentes, tinciones u otras sustancias que hacen que la identificación de la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo sea una tarea relativamente sencilla. Se ha utilizado esta conocida reacción bioquímica para desarrollar una metodología llamada citometría de flujo. En citometría de flujo, las células intactas se tratan con anticuerpos que se unen específicamente a los marcadores de la superficie celular. Los anticuerpos están, a su vez, etiquetados con una molécula fluorescente y entonces por la suspensión celular pasa un haz de luz con un detector de luz láser que pasa a través de la célula. Parte de la luz pasa a través de la célula (denominada dispersión frontal de la luz) y parte se refracta con cierto ángulo (denominada dispersión lateral). La dispersión frontal aumenta con el diámetro celular y la dispersión lateral aumenta con la complejidad interna de la célula (principalmente gránulos dentro del citoplasma). De este modo, usando estas dos mediciones, se pueden clasificar aproximadamente los tipos celulares individuales. No obstante, también hay detectores de luz, que, usando los filtros de color apropiados, pueden detectar específicamente la fluorescencia emitida por los anticuerpos que están unidos a la superficie celular. Esta tecnología ha demostrado ser tremendamente útil en la identificación de poblaciones celulares malignas en muestras de sangre y tejidos de pacientes.

En citometría de flujo, se trata una suspensión de células con anticuerpos etiquetados con moléculas fluorescentes (fluorocromos), se lava y se coloca en la máquina. La suspensión de células se “enfoca” usando soluciones tampón de modo que las células pasen a través del detector de flujo en una fila de a uno. Cuando cada célula pasa a través del detector de flujo, un haz de luz láser pasa a través de la célula. Parte de la luz pasa a través de la célula (denominada dispersión frontal de la luz) y parte se refracta con cierto ángulo (denominada dispersión lateral). La dispersión frontal aumenta con el diámetro celular y la dispersión lateral aumenta con la complejidad interna de la célula (principalmente gránulos dentro del citoplasma). De este modo, usando estas dos mediciones, se pueden clasificar aproximadamente los tipos celulares individuales. No obstante, también hay detectores de luz, que, usando los filtros de color apropiados, pueden detectar específicamente la fluorescencia emitida por los anticuerpos que están unidos a la superficie celular. Puesto que el estado actual de las máquinas de última generación actuales tiene hasta cuatro detectores de color diferentes (conocidos como citometría de flujo de cuatro colores), se pueden añadir hasta cuatro anticuerpos diferentes al mismo tubo. Las muestras de pacientes individuales normalmente se dividen en varios tubos, cada uno de los cuales contiene varios anticuerpos. Los análisis de los datos es, por lo tanto, bastante compleja y requiere ordenadores que sean capaces de visualizar simultáneamente varias bandas de cada tubo. A esto se lo conoce como análisis multiparamétrico. Este análisis simultáneo de varios parámetros es necesario para aislar en primer lugar electrónicamente y después caracterizar las poblaciones celulares. Por lo tanto, aunque los citómetros de flujo modernos analizan hasta 6 parámetros simultáneamente (dispersión frontal, dispersión lateral y cuatro anticuerpos), 3 de los parámetros deben ser usados para aislar electrónicamente los tipos celulares (dispersión frontal, dispersión lateral e intensidad de tinción CD 45). En la técnica se conocen amplias categorías de células presentes en las muestras hematológicas, y entre ellas se incluyen células mieloides, monocitos, linfocitos, megacariocitos y eritrocitos. En otras palabras, estos 3 parámetros deben ser usados para mimetizar aproximadamente lo que el ojo humano hace sin esfuerzo: identificar o caracterizar amplias categorías de células. De hecho, los laboratorios contratan comúnmente técnicos con 2 años de formación (sólo parte de los cuales es en el área de hematología) que puede, con un razonable grado de exactitud y precisión, identificar o caracterizar diferentes tipos de células en muestras de sangre. Con alguna formación adicional, también pueden enumerar correctamente los tipos de células de las muestras de aspirados de médula ósea. De este modo, si el ojo humano estuviera además equipado con los medios para identificar también los antígenos de superficie de las células, no habría necesidad de utilizar la citometría de flujo con este propósito. Además, de los 3 parámetros restantes disponibles para el análisis de la citometría de flujo, sólo 2 pueden visualizarse en cualquier gráfica lineal aunque existiera un software nuevo que pudiera presentar gráficos tridimensionales. Aunque los gráficos tridimensionales añadan practicidad y sean aplicables en situaciones limitadas, dos análisis de parámetros son ya suficientes en la mayoría de los casos. Este último punto es crítico, puesto que cualquier procedimiento que busque sustituir la citometría de flujo debe ser capaz de caracterizar al menos 2 marcadores de superficie celular simultáneamente.

El análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo no es un proceso trivial y requiere personal con una gran formación tal como se ha indicado anteriormente. Se pueden realizar tanto análisis monoparamétricos como los multiparamétricos. Si los datos se analizan como histogramas de fluorescencia de un solo marcador en función del número de células, entonces se realiza un análisis monoparamétrico. El análisis de dos histogramas de una única población de células podría denominarse análisis monoparamétrico simultáneo. Un ejemplo de análisis monoparamétrico simultáneo implicaría el uso de tales gráficos para identificar la expresión en la superficie celular del marcador de linfocitos B CD20 y la cadena ligera kappa. El análisis de la capacidad de unión de cada conjunto de anticuerpos es independiente de los otros. En un análisis multiparamétrico, la unión de los dos anticuerpos está vinculada y no es independiente. Los procedimientos analíticos requieren la unión de ambos anticuerpos simultáneamente unificados en un solo histograma como fluorescencia 1 en función de la fluorescencia 2. La caracterización de la población celular diana se realiza mejor analizando este gráfico de fluorescencia 1 en función de la fluorescencia 2 y analizando las características de unión de cada uno de estos anticuerpos juntos. Esto reduce la posibilidad de un error que pudiera analizar incorrectamente dos poblaciones celulares superpuestas como una única población celular.

Finalmente, con la excepción limitada de análisis de ploidía del ADN, la caracterización de tumores sólidos y tumores no hematopoyéticos es bastante limitada mediante citometría de flujo. A menudo, no hay protocolos correctamente desarrollados para la producción de suspensiones celulares. Además, las células tumorales pueden ser delicadas y puede que no sobrevivan al proceso. Además, muchos marcadores usados para tumores sólidos tales como la vimentina o la actina de músculo liso son antígenos intracitoplasmáticos y pueden ser difíciles de ensayar mediante citometría de flujo. Además, los marcadores más disponibles para estos otros tumores no son marcadores específicos para los tumores y muchas células normales, incluyendo células presentes en el fondo de la muestra disponible, pueden dar positivos muy fuertes con los mismos marcadores. Por lo tanto, la interpretación de este tipo de muestras sin una correlación morfológica específica es como poco peligrosa.

Un objeto de la invención es dar a conocer un procedimiento más barato y accesible para análisis monoparamétricos y multiparamétricos de poblaciones celulares. Este análisis no se limita sólo a marcadores de superficie celular sino que incluye opcionalmente la identificación de regiones receptoras activas en las superficies celulares, pérdida de proteínas de superficie celular, proteínas intracelulares y secuencias nucleotídicas intracelulares. Una de las características de esta invención es que la población celular diana se analiza mediante características morfológicas de las células que se conservan para el análisis. Además, también es posible contar eventos para obtener números celulares específicos con respecto a un volumen de muestra específico. Debido al gran número de etapas en la preparación de la citometría de flujo, la obtención de números de células absolutos no es posible, sólo porcentajes de células analizadas.

Características de la invención

Procedimiento para caracterizar células que comprende las etapas de:

- a) disponer una suspensión de células en un medio líquido, incluyendo dichas células las primeras células,
- b) poner en contacto un grupo de primeras perlas con dicha suspensión, estando recubierta cada una de dichas primeras perlas con una sustancia de unión o siendo magnéticas, de modo que cada primera perla se adapte para poder unirse al menos a una de dichas primeras células,
- c) incubar dichas primeras perlas con dicha suspensión durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas primeras células se unan a dichas primeras perlas y formen complejos primera perla-primera célula, comprendiendo cada complejo primera perla-primera célula una primera perla y una primera célula,
- d) separar dichos complejos primera perla-primera célula de dicha suspensión por filtración a través de un filtro, y transfiriendo a un portaobjetos de vidrio dichos complejos primera perla-primera célula separados por dicha filtración y
- e) examinar dichos complejos primera perla-primera célula y caracterizar dichas primeras células.

La invención está dirigida además a un procedimiento de caracterización celular, que comprende las etapas de:

- a) disponer una suspensión de células en un medio líquido,
- b) poner en contacto un grupo de primeras perlas con dicha suspensión, estando recubierta cada una de dichas primeras perlas con una sustancia de unión de modo que cada primera perla se adapte para poder unirse a un tipo preseleccionado de células,
- c) incubar dicho grupo de primeras perlas con dicha suspensión durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas primeras perlas se unan a dicho tipo preseleccionado de células para formar complejos perla-célula,
- d) filtrar dicha suspensión para retener en un filtro cualquier complejo perla-célula que se haya formado, y transferir a un portaobjetos de vidrio cualquier complejo perla-célula separado por dicha filtración, y
- e) examinar los resultados de las etapas de filtración y transferencia para caracterizar las células en dicha suspensión.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración esquemática que muestra una células unida a un anticuerpo que está unido a una perla o recubriéndola.

La figura 2 es una ilustración esquemática que muestra varias células unidas a una perla.

La figura 3 es una ilustración esquemática que muestra varias células unidas a una perla en el centro, y cinco perlas más pequeñas unidas a cinco de las células.

La figura 4 es una ilustración esquemática de un dispositivo automatizado para realizar el análisis fenotípico o inmunofenotípico según la presente invención.

La figura 5 es una ilustración esquemática de un solo portaobjetos para usar con el dispositivo automatizado de la figura 4.

Descripción detallada de la realización preferente de la invención

Según se emplea en el presente documento, cuando se indica un intervalo preferente tal como, 5-25, esto significa al menos 5 y, separada e independientemente, preferentemente no más de 25. Las células de la presente memoria descriptiva son preferentemente células humanas. Si un primer grupo de células no incluye miembros de un segundo

grupo de células y el segundo grupo de células no incluye miembros del primer grupo de células, los dos grupos no se solapan. "Visualmente distinguible" incluye visualmente distinguible a través de un microscopio óptico. "Cuantificar" incluye estimar o enumerar o contar el número.

5 "Fenotipar" incluye inmunofenotipado y genotipado.

La invención usa perlas. Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende por perlas unas pequeñas partículas o superficies de soporte, preferentemente microesferas, más preferentemente microesferas de plástico, más preferentemente microesferas de poliestireno (también conocidas como perlas, esferas o microesferas de látex), que han sido preferentemente recubiertas con una sustancia de unión o que son magnéticas. Tal como se usa en las reivindicaciones, "primeras perlas" incluye perlas que han sido recubiertas con una sustancia de unión o que son magnéticas. La perla puede ser cualquier superficie o partícula de soporte sólida que se pueda suspender en una solución apropiada. Las perlas preferentes están disponibles como microesferas de poliestireno en Bangs Laboratories, Fisher, IN. Los diámetros de las perlas son preferentemente mayores de 5 μm de diámetro, preferentemente 5,5-10,3 μm , menores preferentemente como mínimo a 5,5 ó 10 ó 12 μm y preferentemente no mayores de 12, 15, 20 ó 30 μm de diámetro, mucho menos preferentemente menores de 5 μm , tal como por ejemplo al menos 1, 2 ó 3 μm de diámetro. Se prefieren perlas de 5,5 y 10,3 μm . Las perlas también pueden tener color, tal como rojo o azul, menos preferentemente verde, púrpura, naranja, marrón, amarillo o cualquier otro color. Las perlas están preferentemente recubiertas con una sustancia de unión, tal como, anticuerpos o proteínas inmunorreactivas, o cualquier molécula que pueda unirse o interaccionar con una superficie celular de modo que entren en contacto la célula y la perla y/o se adhieran unas con otras o se unan unas con otras; alternativamente, la perla puede ponerse en contacto o unirse con la superficie celular a través de interacciones de carga electrostática o interacciones magnéticas; recuperándose todos estos conceptos con los términos "uniéndose a" o "unir a". Cuando una perla se une a una célula, forma un complejo perla-célula. En la invención, la interacción célula-perla forma un complejo lo suficientemente grande como para impedir el paso a través de un filtro con un tamaño de poros apropiado. Los filtros preferentemente tienen un diámetro y se seleccionan de modo que las células y las perlas sin unión pasen a través de los poros pero no lo hagan las células unidas a las perlas. Estos complejos se transfieren a continuación a un portaobjetos de vidrio con una variedad de tinciones para visualizar los complejos mediante un microscopio óptico. Se examinan estos complejos y células y se caracteriza a las células. Ejemplos de sustancias de unión o sustancias reactivas que pueden usarse para recubrir la superficie de la perla incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos contra proteínas de superficie celular específicas, moléculas pequeñas que se unen a receptores u otras moléculas de la superficie celular tales como, IL-2 ó GM-CSF, avidina, biotina, o las perlas pueden quedar sin recubrir en una suspensión que interaccione por otros medios con las células. Los anticuerpos que se pueden usar son aquellos conocidos en la técnica. Existen muchos anticuerpos comerciales disponibles tales como los de Zymed Inc., South San Francisco, CA y Dako Corp., Carpinteria, CA.

Las perlas o microesferas pueden proceder de una variedad de sustancias incluyendo oro, ferritina, poliacrilamida o poliestireno. La última se encuentra entre las sustancias preferentes puesto que las perlas pueden diseñarse con precisión y con cualquier tamaño específico y se pueden conjugar uniformemente tanto con brazos de enlace molecular como con sustancias de unión reactivas. Las microesferas de poliestireno (también conocidas como "microesferas de látex") se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica que en la presente memoria descriptiva se incorporan a modo de referencia. Las sustancias de unión que se pueden usar incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, mezclas "cóctel" de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (tales como partes Fc, o fragmentos Fab o Fab' tanto en formas monovalentes como bivalentes), moléculas pequeñas que se unen a receptores de la superficie celular específicos, enlazadores covalentes y no covalentes, y adherencia indirecta, tal como utilización de atracción electrostática, magnética o paramagnética.

La técnica anterior incluye las patentes U.S.A. Nº 5.554.505, 5.348.859, 5.340.719, 5.231.005, 5.260.192, 5.338.689, 5.256.532 y 5.501.949, incorporándose todo el contenido de las mismas en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Estas patentes incluyen discusiones sobre el uso de determinadas microesferas o perlas para la identificación de células. En la técnica se conoce cómo dar a conocer una suspensión de células en un medio líquido para análisis.

Una segunda característica de una realización preferente de la presente invención es que concentra las células usando un filtro apropiado sin manipulación adicional de la suspensión celular por lisis celular o etapas de incubación adicionales de las microesferas paramagnéticas submicroscópicas. Los filtros que pueden usarse en la invención pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica, tal como filtros ginecológicos de Cytec Corp., Boxborough, MA. Los filtros tienen preferentemente un tamaño de poros mayor que las perlas que se están usando de modo que todas o la mayoría o cantidades sustanciales de perlas no unidas y células no unidas pasen atravesándolos, pero el tamaño de poro es preferentemente suficientemente pequeño de modo que todas o la mayoría o cantidades sustanciales de perlas unidas a células queden retenidas en el filtro, de manera que sea el tamaño de poros del filtro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 ó 12 micras mayor que el tamaño de la perla. Los tamaños de poro del filtro preferentes incluyen tamaños de poro de 10-15, menos preferentemente 7-20, 7-30 ó 7-40 μm . Alternativamente, los tamaños de poro del filtro pueden ser al menos de 15 ó 20 μm . El filtro se monta preferentemente sobre un soporte sólido, tal como el extremo de un tubo a través del cual circula la suspensión.

Preferentemente se prepara una suspensión celular a partir de sangre periférica, un aspirado de médula ósea, un aspirado de aguja fina, una biopsia de ganglio linfático o una muestra corporal *in situ*. En el procedimiento descrito en la presente memoria descriptiva, es posible un análisis monoparamétrico, simultáneamente monoparamétrico y

verdaderamente multiparamétrico que compara el nivel de sofisticación del análisis posible por citometría de flujo. A la suspensión celular pueden añadirse perlas que se pueden distinguir fácilmente unas de otras ópticamente ya sea por tamaño, color, o ambos, simultánea o secuencialmente. La unión positiva a la población celular diana resulta en un complejo perla-célula que tiene un tamaño físico significativamente superior al de las células o perlas sin unión.

Estos complejos pueden concentrarse y separarse fácilmente del resto de la solución usando un filtro de diámetro apropiado con un tamaño de poros suficiente para permitir que las células y las perlas sin unirse pasen atravesándolo, mientras que los complejos quedan retenidos en el filtro. El procedimiento también se puede usar en sentido inverso, en el que las poblaciones celulares anómalas no pueden unirse a perlas mientras que las células normales lo hacen fuertemente. Un ejemplo de este último procedimiento puede encontrarse con los síndromes mielodisplásicos (SMD), que actualmente no se pueden diagnosticar por citometría de flujo con ningún grado de fiabilidad. Las células mieloides humanas normales expresan fuertemente en su superficie una gran cantidad de marcadores como CD11b, CD13, CD15, CD16 y CD33. No obstante, en el SMD, estas poblaciones celulares pierden parte de la expresión de estos marcadores. No obstante, como las células normales degeneran después de un almacenamiento prolongado o una mala manipulación de las muestras, tal como temperaturas extremas, que pueden producirse durante el transporte de las muestras, también pierden parte de la expresión de estos marcadores. La citometría de flujo no puede diferenciar entre estas dos situaciones. No obstante, las células degeneradas se reconocen morfológicamente fácilmente entre las células displásicas de SMD. La pérdida de capacidad de unión de las perlas recubiertas con anticuerpos a estos marcadores se podría identificar fácilmente (con una portaobjetos con las células que pasaron a través del filtro así como las retenidas en el filtro). Por lo tanto, este procedimiento es el primer procedimiento fácilmente disponible para diagnosticar SMD, en la actualidad sólo diagnosticable en aquella minoría de casos que muestren una citogenética anómala o anomalías hematológicas permanentes después de un seguimiento clínico prolongado. Como ejemplo de análisis de SMD, puede observarse un frotis periférico. Si las células degeneran, se procesa una nueva muestra. Si las células no degeneran, se incuba la suspensión celular con perlas grandes recubiertas con anticuerpos anti CD13. A continuación se añaden perlas de tamaño reducido, recubiertas con anticuerpos anti CD15 y, se dejan reaccionar. Después, se filtra la solución (puede ser un tamaño de poros pequeño para retener las células unidas y las no unidas, o de tamaño de poros grande para retener sólo las células unidas, en cuyo caso se recogen las células no unidas que atravesaron el filtro). Si el resultado es una enorme cantidad de complejos como en la figura 3 y pocas células no unidas, esto indica células normales. Si hay pocas células unidas y muchas células no unidas, esto sugiere SMD. Las células inmaduras tienen también una capacidad de unión débil, pero puede observarse morfológicamente. El mismo procedimiento puede realizarse con CD11b y CD16.

También se pueden contar las perlas retenidas en el filtro antes de transferir al portaobjetos de vidrio. Usando procedimientos tales como dispersión de luz, reflectancia, fluorescencia o cambios de campos electrostáticos, se puede contar el número de perlas retenidas en el filtro. Se puede obtener un número medio de células unidas a cada perla y una estimación del número de células en el volumen de la muestra original.

Haciendo referencia a la figura 1, se muestra, no a escala, una perla (2), tal como una microesfera de poliestireno, que está recubierta y unida a una sustancia de unión (4) tal como un anticuerpo. Existe además, una célula (6), tal como una célula diana, que tiene un marcador de superficie celular (8). La sustancia de unión (4) o el anticuerpo se une al marcador de superficie celular (8) de la célula diana (6). La figura 2 ilustra cómo puede aparecer este tipo de reacción en un portaobjetos de vidrio; un grupo de células o células diana (12) se han unido a una perla (10). Esto muestra una unión de parámetro único de las células a las perlas. La proporción entre perlas y células debería ajustarse correspondientemente para obtener unos resultados eficaces. El número real de células que se unen a la perla es variable, oscilando desde una sola célula a numerosas células que se acumulan en la superficie de la perla.

Haciendo referencia a la figura 3, se muestra una perla (14) de grandes dimensiones, recubierta con una sustancia de unión que ha unido ocho células (16), (18), (20), (22). Las perlas pequeñas o perlas con un color diferente (24) recubiertas con una sustancia de unión diferente se han unido a las células (22) pero no a las células (16), (18), (20). Esto proporciona una identificación positiva de las células diana (22). Esto ilustra un análisis multiparamétrico. Las células (22) son un conjunto de las células (16), (18), (20), (22). A cada célula (22) se puede unir un número variable de perlas (24). En algunos casos, cada célula unida a la perla (14) se unirá a más perlas (24), o cada una de las células unidas a la perla (14) puede no estar unida a las perlas pequeñas. Se debe observar que los diferentes tipos de células se pueden unir a la perla grande (14) que, en algunos casos, se puede distinguir morfológicamente. Preferentemente, la perla de grandes dimensiones (14) se añade en primer lugar a la suspensión celular de modo que una gran variedad de células puedan unirse a su superficie. Después, se añaden las perlas pequeñas (24) para unirse a la periferia del complejo. Alternativamente, las perlas pequeñas (24) se pueden añadir primero, o las perlas pequeñas (24) y las perlas grandes (14) se pueden añadir simultáneamente. El orden de adición depende en gran medida de las concentraciones relativas y áreas de superficie de las perlas y las células. Por ejemplo, es posible que no se desee añadir las perlas (14) ó (24) en unas concentraciones tales que cubran completamente u obturen el área de superficie de las células diana, impidiéndose así el acceso a las mismas por otras perlas. Preferentemente, hay un exceso de células diana para recubrir completamente a la perla. Opcionalmente, la suspensión se puede filtrar después de que se forma el primer complejo, para retener el primer complejo y resuspenderlo antes de añadir las segundas perlas. De este modo, se puede filtrar un grupo de complejos y resuspenderlos antes de añadir un conjunto subsiguiente de perlas; esto puede conducir a resultados más seguros y claros al eliminar los materiales que podrían ocasionar interferencias. Las perlas se pueden distinguir por tamaño, por color, o por ambas características. Se pueden realizar niveles adicionales de análisis multiparamétricos, por ejemplo, añadiendo a la figura 3 otro conjunto de perlas con un tamaño o un color diferente que se unieran a un primer conjunto de células (22) pero no a las células (22) restantes, ofreciendo así una

identificación positiva de dicho primer conjunto de células (22). De esta manera, se pueden realizar niveles posteriores o adicionales de análisis multiparamétricos.

- Se puede utilizar una gran variedad de perlas disponibles y las seleccionadas dependerán de la aplicación específica.
- 5 En los análisis multiparamétricos, son preferibles las perlas que se pueden distinguir fácilmente por tamaño o color. Por ejemplo, se pueden usar dos grupos de perlas incoloras con un tamaño de 10 y 5 μm , respectivamente, para aislar una población de linfocitos B usando las perlas de 10 μm recubiertas con anticuerpos contra un antígeno de todos los linfocitos B, tal como CD19 y las perlas de 5 μm recubiertas con anticuerpos anti-kappa. Hay disponibles análisis multiparamétricos que no se puedan imitar fácilmente por citometría de flujo con una pequeña variación de este
- 10 ejemplo. Se usan perlas de 10 μm incoloras para unir los linfocitos B usando perlas recubiertas con anticuerpos anti CD19. Las perlas de 5 μm incoloras están recubiertas con anticuerpos anti kappa mientras que las perlas de 5 μm de color azul oscuro están recubiertas con anticuerpos anti lambda. De modo similar, se puede analizar una población de blastocitos usando perlas de 10 μm recubiertas con anticuerpos anti CD34 y perlas de 5 μm recubiertas con anticuerpos anti CD19. Las perlas de 5 micras con color, recubiertas con anticuerpos anti CD13 se añaden simultáneamente para
- 15 lograr una rápida caracterización de la población de blastocitos.

Procedimientos preferentes

- 1) Las perlas sustancialmente idénticas se compran ya recubiertas con estreptavidina (Bangs Laboratories, Fishers, IN). Se resuspende una pequeña cantidad en una solución salina tamponada tal como una solución salina con tampón fosfato o un disolvente de anticuerpos comercialmente disponible. Las perlas se incuban con anticuerpos de cabra anti-ratón biotinilados durante 30 minutos (no obstante, puede usarse cualquier anticuerpo antiallogénico con biotinilación). Se centrifuga la suspensión y se extrae el sobrenadante. La incubación se repite dos veces para garantizar el recubrimiento del área máxima posible de superficie disponible de las perlas. Después se lavan las perlas tres veces usando el mismo tampón. Después se incuban la suspensión con anticuerpos de ratón antihumanos específicos durante 1 hora (o se puede usar cualquier anticuerpo antiallogénico no biotinilado específico, para la población celular diana). La suspensión se lava de nuevo tres veces y se diluye hasta la concentración deseada. La suspensión resultante se puede refrigerar a 4 grados centígrados hasta su uso. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos primarios biotinilados sin el uso de anticuerpos secundarios. Las perlas producidas por esta técnica son sustancialmente idénticas.
- 2) Las perlas son recubiertas previamente con anticuerpos anti receptor Fc (Bangs Laboratories, Fishers, IN) tal como anticuerpos receptores Fc de IgG de ratón. Estas perlas se pueden resuspender a continuación en una solución de anticuerpos que podrían unirse espontáneamente a los sitios de unión anti receptor Fc de las perlas. En el ejemplo dicho anteriormente, los anticuerpos antihumano de ratón se unirían a las perlas después de las etapas de lavado correspondientes de modo similar al descrito con anterioridad.
- 3) Las sustancias de unión tales como cualquier proteína, péptido o secuencia nucleotídica pueden unirse con otros métodos de unión químicos o específicos. Por ejemplo, las microesferas de poliestireno se dejan recubiertas "naturalmente" con grupos sulfato de superficie después de fabricarlas. Estos ligandos pueden usarse para enlazar proteínas y péptidos directamente a la superficie de las perlas. Los ejemplos de dichos grupos de superficie funcionales que pueden recubrir la superficie incluyen, pero no se limitan a, ligandos reactivos de aldehído, amina alifática, amida, amina aromática, ácido carboxílico, clorometilo, epoxi, hidrazida, hidroxilo, sulfonato y tosi (sulfonilo de tolueno). Éstos se pueden usar a su vez para enlazar péptidos, proteínas, oligonucleótidos y otros ligandos bioquímicos a la superficie. Estos ligandos o sustancias de unión se usarían a su vez para unir sitios específicos de la superficie celular a los que se uniría la célula en la superficie de la perla. Por ejemplo, se podría utilizar una molécula pequeña tal como la hormona IL-2 por uno de los anteriores procedimientos para recubrir perlas con la intención de unirse a los receptores de IL-2 (CD25) de la superficie celular. Esto se podría usar para unir células tales como linfocitos T, monocitos y células neoplásicas tales como leucemia de células pilosas.

Otros procedimientos

- Las microesferas paramagnéticas submicroscópicas (preferentemente de menos de 1 μm de diámetro) se unen a cualquier marcador biológico reactivo de interés. El tipo de unión que se usa podría ser cualquiera de los procedimientos anteriores. Después las células se permeabilizan y fijan usando una variedad de detergentes y soluciones fijadoras débiles tales como paraformaldehído al 1%. Alternativamente, para este propósito, hay disponibles varios kits comerciales de permeabilización, tales como IntraStain (Dako Corp., Carpinteria, CA). Después la suspensión celular se incuban con el marcador biológico reactivo, tal como anticuerpos antimieloperoxidasa, anticuerpos anti terminal deoxitidil transferasa terminal, o sondas de ARN o ADN específicas. Los marcadores biológicos y las partículas paramagnéticas penetran en la célula y, por ejemplo, la sonda se une a la diana intracelular. Después se lavan las células y se resuspenden en un tampón adecuado, tal como PBS o RPMI. Después la suspensión se incuban con las perlas magnéticas o con las microesferas de un tamaño o color fácilmente visible, tal como, de 1 a 20, o 3-15, o 5-10, o 10-20 μm . Las perlas magnéticas se unen a la superficie celular, pero no pueden cruzar la membrana, para crear un complejo célula-perla que sea fácilmente retenido, por ejemplo, a través de una filtración.

En un ejemplo, los blastocitos anómalos en una suspensión de médula ósea se pueden permeabilizar e incuban con anticuerpos antimieloperoxidasa unidos a microesferas paramagnéticas submicroscópicas. La suspensión se lava

entonces tres veces en una solución salina tamponada y se resuspende e incuba con perlas magnéticas grandes de un tamaño preferente de 5-15 μm de diámetro para dar lugar a células unidas a las perlas grandes.

En otro ejemplo, se unen secuencias específicas de ADN (sondas) a las microesferas paramagnéticas submicroscópicas usando procedimientos tales como microesferas con avidina y sondas biotiniladas. Las células de un paciente con leucemia mielógena crónica se permeabilizan e incuban con sondas que se unen a la traslocación bcr-abl específica que es el diagnóstico para esta enfermedad. La suspensión entonces se lava y se incuba con perlas magnéticas grandes de un tamaño preferente de 5-15 μm de diámetro para dar lugar a células unidas a las perlas grandes.

10 *Detección y análisis*

Los complejos célula-perla (células unidas a perlas) suministradas u obtenidas tal como se describe anteriormente se pasan después a través de un filtro de soporte sólido con un tamaño de poros suficiente para permitir que las células y perlas no unidas pasen atravesándolos. Se pasa la suspensión a través del filtro usando una variedad de procedimientos aceptables que incluyen la gravedad, succión (aplicación de vacío), presión positiva en la fracción líquida, o absorción por capilaridad del líquido a través del filtro usando un material absorbente poroso tal como, almohadillas de gasa. Hay varios dispositivos que se pueden usar para crear una presión negativa para hacer pasar el líquido a través del filtro, como pistones, jeringas o procedimientos de succión. En una realización preferente, se usa un único filtro sólido con un tamaño de poros de 10-15 μm . Los complejos célula-perla quedan retenidos en el filtro y la capa se transfiere después a un portaobjetos de vidrio por contacto directo con el portaobjetos y aplicando una ligera presión.

La preparación en el portaobjetos resultante se puede teñir con una variedad de tinciones disponibles comercialmente tal como, hematoxilina y eosina, tinción Papanicolau o cualquier tinción Romanowsky. En una realización preferente, las células quedan resuspendidas en un tampón compatible, tal como PBS, RPMI, o un disolvente de anticuerpos comercialmente disponible y el portaobjetos resultante se tiñe con tinción Wright-Giemsa. Alternativamente, las células se pueden resuspender en etanol o un fijador comercialmente disponible tal como Cytolyte (Cytoc Corp., Boxborough, MA). El portaobjetos resultante se tiñe entonces con Papanicolau, o tinciones con hematoxilina y eosina. Se examinan los complejos y las células se caracterizan mediante un microscopio óptico normal.

La invención puede usarse para realizar un análisis monoparamétrico asociado con la morfología, un análisis monoparamétrico simultáneo o un análisis multiparamétrico. En los análisis monoparamétricos, (descritos en las figuras 1 y 2), se añade un solo tipo de perla a una suspensión de células en un medio líquido de modo que, después de la filtración, se obtiene un portaobjetos con una población celular única enriquecida. Esto es útil como una criba sencilla para determinar si una población celular tiene una característica particular, tal como monocitos distinguibles de linfocitos B monocitoides, tal como se indica en el ejemplo 1 siguiente. En esta configuración, las células se unen a las perlas y son visibles en el portaobjetos de vidrio para proceder a su análisis. Alternativamente, puede estudiarse una población celular de linfocitos B para analizar la expresión de kappa o lambda usando dos portaobjetos diferentes o varios pocillos de un portaobjetos, conteniendo cada uno de ellos un solo tipo de perla (anti kappa o anti lambda). Otra variante de este análisis es añadir simultáneamente a la suspensión celular dos tipos de perlas diferentes, una anti kappa y una segunda anti lambda. Éste es un ejemplo de análisis monoparamétrico simultáneo ya que la unión de cada tipo de perla es independiente del otro, pero los resultados se analizan a la vez. En el análisis por citometría de flujo se produce una situación análoga cuando se visualiza la fluorescencia en función del número de células para obtener un solo histograma. En los análisis kappa y lambda, sólo se puede detectar una población monoclonal por análisis simultáneo de ambos histogramas y buscando picos individuales de fluorescencia. Finalmente, se puede realizar un análisis multiparamétrico vinculando la detección de dos características diferentes, de modo que esos análisis se realizan a la vez. En este caso, la unión de un grupo de perlas se produce después de un segundo y opcionalmente más grupos de perlas (véase la figura 3). Los análisis buscan uniones simultáneas de más de un grupo de perlas a la población celular diana (como se describe en el siguiente ejemplo 2).

La invención puede usarse para detectar pérdidas anómalas de unión cuando se desea una unión fuerte. Por ejemplo, se desea que las células mieloides normales, tales como los granulocitos maduros y los monocitos en sangre periférica expresen fuertemente marcadores de superficie CD13, CD33, CD11b y CD16. En una muestra de médula ósea habría un intervalo continuo de aumento de expresión de estos marcadores a medida que la célula madura. No obstante, las células que muestran una maduración anómala, como se observa en la mielodisplasia, presentarían una reducción en la expresión de estos marcadores. Este fenómeno ya ha sido descrito previamente por Davis y otros y puede verse en un análisis de citometría de flujo como patrones de expresión anómalos en los histogramas apropiados. No obstante, se observa una pérdida de expresión cuando las células mueren y degeneran como ocurre en las muestras manipuladas incorrectamente o envejecidas. Puesto que la correlación morfológica es menos que óptima por citometría de flujo, el fenómeno tiene una utilidad diagnóstica limitada, particularmente cuando se ha transportado la muestra a largas distancias. En la presente invención, las células pueden visualizarse en el portaobjetos de vidrio para confirmar su viabilidad. Las células normales se unirían fuertemente a las perlas recubiertas con estos marcadores, pero habría una menor unión de las perlas en células con mielodisplasia. En una mielodisplasia menor, tal como una anemia refractaria y una anemia refractaria con sideroblastos anulares, no hay habitualmente criterios diagnósticos para confirmar el diagnóstico. El estado de la técnica actual en tales casos requiere un seguimiento prolongado y un diagnóstico por exclusión de otras posibles entidades como toxicidad por etanol o anemia megaloblástica de vitamina B12 o carencia de folato. El procedimiento de la invención ofrece una prueba diagnóstica positiva mucho más necesaria.

Un procedimiento de detección complementario consiste en que antes de transferir las células a un portaobjetos de vidrio, el filtro se aclara ligeramente y se explora usando un haz de luz blanca o de una longitud de onda específica que corresponda con la longitud de onda de excitación de las perlas fluorescentes. El número de eventos que se recuentan electrónicamente y las células se transfieren entonces a un portaobjetos de vidrio y se tiñen. El número medio de células por microesfera se obtiene después manualmente y se puede realizar una estimación del número total de células diana en la muestra (suponiendo que se usa un volumen conocido de muestra). Aplicaciones preferentes:

- 1) Los análisis monoparamétricos de tumores y otras poblaciones celulares específicas. Se puede analizar una sospecha de tumor con un inmunofenotipo conocido para confirmar la presencia de un único marcador tal como se describe en los siguientes ejemplos 1 y 3. Esto es lo más útil en las situaciones en las que sólo es necesario fijar un único tema en relación al fenotipo celular. En el ejemplo 1, sabiendo que la población celular anómala es de origen linfóide B es información suficiente para continuar con más estudios, ya que esto sugiere (pero no demuestra) malignidad. En el siguiente ejemplo 3, sabiendo que la población linfóide es de origen linfóide T, se sugiere que el paciente tiene un infiltrado reactivo en lugar de un infiltrado maligno. Si este ensayo estuviera clínicamente disponible en ambos casos inusuales, los resultados del estudio sencillo del ejemplo 1 justificarían un gasto añadido para una evaluación adicional. Los resultados del ejemplo 3 justifican el no realizar citometría de flujo y proceder al tratamiento de meningitis. Otras aplicaciones de este tipo de análisis pueden ser útiles en otros tipos de tumores tales como detección de MN/CA9 para el cáncer cervical, identificando tipos específicos de tumores en infiltrados malignos tales como melanoma (usando marcadores tales como HMB-45), o identificando una enfermedad micrometastásica en ganglios linfáticos y médula ósea. Además, los análisis monoparamétricos se pueden usar en análisis genéticos fenotípicos y genotípicos. Por ejemplo, se puede permeabilizar y tratar una muestra de sangre periférica con una sonda específica para la traslocación bcr-abl. La sonda puede etiquetar con microesferas paramagnéticas submicroscópicas. Las células se pueden tratar después con perlas magnéticas grandes para identificar la presencia de la traslocación que pudiera ser el diagnóstico de la leucemia mieloide crónica. Alternativamente, se puede usar un procedimiento similar para identificar la presencia de proteínas intracelulares o secuencias de ARN usando los anticuerpos o las secuencias nucleotídicas correspondientes, por ejemplo, la expresión de la proteína intracelular deoxirribonucleotidil transferasa (TdT) usando un anticuerpo etiquetado además con microesferas paramagnéticas y detectando la reacción usando perlas magnéticas de superficie. Finalmente, se ha propuesto el uso de la expresión CD64 como una prueba diagnóstica rápida para la reacción inflamatoria aguda clínicamente significativa (Lab. Hematol. 1995; 1:3-12). Por las razones descritas anteriormente, la citometría de flujo es además cara y difícil para usar como procedimiento de detección de enfermedades comunes. El procedimiento de la invención permite un análisis monoparamétrico rápido y barato de la expresión de CD64 en granulocitos periféricos.
- 2) El análisis monoparamétrico simultáneo se realiza en el caso en el que existe un análisis simultáneo de marcadores que sean independientes entre sí. Más comúnmente, se usa en poblaciones de linfocitos B para determinar la expresión de restricción de cadenas ligeras kappa o lambda por inmunoglobulinas de superficie expresadas. Esto puede realizarse usando perlas similares como se usa en dos portaobjetos de vidrio independientes analizados simultáneamente, o usando un solo portaobjetos con utilización de dos grupos de perlas que se pueden distinguir fácilmente por tamaño, color o ambos rasgos. Esto es extremadamente útil para una visualización rápida y económica para monoclonalidad de linfocitos B. Otros tipos útiles de análisis monoparamétricos simultáneos se realizan en el caso de un tumor maligno de origen desconocido, en el que se puede analizar una suspensión celular usando varios portaobjetos independientes o un solo portaobjetos con varios grupos de perlas que se pueden distinguir por tamaño, color o ambos rasgos. En este ejemplo, estos grupos de perlas incluyen típicamente perlas marcadas para CD45 (antígeno común de leucocitos), HMB-45 (melanoma) y marcador de citoqueratina general (a menudo un cóctel de AE1 y AE3 para tumores epiteliales). Un tercer tipo de esta clase de análisis es analizar una población de linfocitos para determinar si esta población está compuesta por linfocitos B, linfocitos T, otras células o cualquier combinación de estos tipos.
- 3) La invención incluye además análisis multiparamétricos en los que la expresión de marcadores se analizan junto con otros marcadores. Un ejemplo sencillo pero común de este tipo de análisis se describe en el siguiente ejemplo 2. En el ejemplo 2, la reacción de unión positiva por las perlas recubiertas con anti CD20, que aíslan los linfocitos B, está vinculada a la expresión de las cadenas ligeras kappa o lambda. El análisis multiparamétrico potencia el análisis ya que identificar correctamente determinadas poblaciones celulares requiere una asociación lógica de múltiples subgrupos de marcadores. Un caso de leucemia aguda es un ejemplo útil de este tipo de análisis. El examen morfológico es uno de los mejores procedimientos para identificar los blastocitos anómalos, pero no caracteriza el tipo de blastocitos presentes. La combinación de análisis morfológicos con la presente invención produciría el siguiente tipo típico de análisis. Las perlas recubiertas con anticuerpos anti CD34 se combinan con perlas recubiertas con anticuerpos anti HLA-DR para confirmar la expresión de ambos tipos de marcadores en la población de células malignas. La expresión positiva de ambos marcadores respalda el diagnóstico de leucemia aguda. Las células se pueden analizar entonces con perlas recubiertas con anticuerpos anti CD13 y anticuerpos anti CD33, junto con perlas recubiertas con anticuerpos anti CD19 y anticuerpos anti CD2, para determinar si las células son de origen mieloide o linfóide. Si se unen a CD13, CD33, o ambos, esto confirma la derivación mieloide de las células. Las células también se pueden analizar con anticuerpos anti CD15, anti CD14, anti CD56, anti CD7 y anti CD4 para determinar el subtipo (mieloide, monocítica, o ambos) y para ofrecer información

pronóstica. Es de particular interés el análisis con éxito de la leucemia promielocítica aguda (FAB subtipo M3). Los análisis de este tipo de tumores por citometría de flujo presentan errores, y el tumor puede perderse ya que está compuesto por células mieloides en fase de maduración. Usando la presente invención, los análisis morfológicos confirmarían la presencia de niveles excesivos de células promielocíticas. Además, los promielocitos normalmente serían negativos para HLA-DR y también se podría analizar la traslocación de los cromosomas 15 y 17 (t(15;17)) que es el diagnóstico de la enfermedad. Este tipo de análisis es particularmente útil en la variante microgranular de la enfermedad, en la cual las células pueden parecer monoblastos. Las leucemias monocíticas también se pueden analizar para detectar otros marcadores monocíticos tales como CD36. Se pueden realizar tipos parecidos de análisis para otras enfermedades hematológicas, otros tipos de tumores y otras poblaciones celulares específicas. Además, el procedimiento se puede utilizar a la inversa para ofrecer una prueba diagnóstica para la mielodisplasia. Las células mieloides normales se unen fuertemente a los marcadores CD11b, CD13, CD16 y CD33. Entre los cambios que se observan en la mielodisplasia, se reduce la expresión de estos marcadores por citometría de flujo. No obstante, las células que degeneren, como ocurre en una muestra excesivamente envejecida, las temperaturas extremas u otras formas de manipulación incorrecta de las muestras causan además una reducción en la expresión de estos marcadores. Puesto que la correlación morfológica con la citometría de flujo es tan pobre, esta forma de análisis no ha obtenido una aceptación clínica significativa, ya que la citometría de flujo no puede distinguir entre células normales degeneradas y células mielodisplásicas. En el procedimiento de la invención existe correlación morfológica excelente, y los observadores con la debida formación reconocerán fácilmente las células degeneradas. Por lo tanto, las células normales pueden distinguirse fácilmente de las células displásicas, ya que las células normales se unirán fuertemente a las perlas recubiertas con anticuerpos contra estos marcadores mientras las células displásicas no lo harán.

Otra aplicación similar puede utilizarse para el cáncer de mama para determinar factores pronósticos tales como la sobreexpresión de Her2/neu. El estado actual de la técnica utiliza, en primer lugar, una inmunohistoquímica para localizar el tumor real entre el tejido mamario que lo rodea por métodos visuales. La expresión de membrana citoplasmática de Her2/neu es calculada por un observador visualmente con una escala expresada desde 0+ positivo (sin expresión) hasta 4+ positivo (mayor expresión posible). No hay procedimientos cuantitativos objetivos para estimar el nivel de sobreexpresión de Her2/neu. Alternativamente, la expresión de Her2/neu puede ser usado más objetivamente usando hibridación fluorescente *in situ* (FISH) que etiqueta cada copia génica con una marca fluorescente. El número de copias del gen en cada célula se puede estimar meramente contando las marcas dentro del núcleo de cada célula. No obstante, puesto que las células no pueden ser fácilmente recontadas, teñidas y observadas, es difícil localizar una célula epitelial mamaria maligna de una célula benigna adyacente, o incluso de una célula del estroma de la matriz que soporta la mama. Por lo tanto, el análisis por FISH tiene menos aceptación en el marco clínico. Más recientemente, la expresión de Her2/neu se puede realizar por citometría de flujo, sin embargo, dado que no existe un procedimiento similar al FISH para evaluar si la célula analizada es una célula maligna o benigna. Usando un análisis multiparamétrico como se describe en la presente invención, las células epiteliales en una suspensión celular se pueden distinguir de células del estroma usando perlas grandes (10 μ m) recubiertas con anticuerpos anti citoqueratina. Sólo las células epiteliales se unirían a esta perla. Se añaden después a la mezcla perlas pequeñas de 5 μ m recubiertas con los anticuerpos anti Her2/neu correspondientes y se filtra la suspensión. La expresión de Her2/neu se puede analizar objetivamente mediante varios procedimientos. En un procedimiento, se puede analizar el mismo filtro para determinar la cantidad de perlas de 5 μ m presentes en el filtro usando métodos tales como, fluorescencia (si las perlas de 5 μ m son fluorescentes), valoración electrostática u otro cualquiera de la variedad de procedimientos de recuento conocidos. En un procedimiento alternativo, la suspensión se transfiere a un portaobjetos de vidrio después de la filtración y se tiñe el portaobjetos. Las células benignas se pueden distinguir de las malignas a través de una valoración morfológica y se puede estimar el número medio de perlas unidas a células malignas. Esto puede hacerlo el observador manualmente o de modo semiautomático usando un análisis visual electrónico para contar el número de perlas unidas a cada célula que el observador haya identificado como malignas.

- 4) Amplificación de la señal de antígenos débilmente expresados. Una de las principales ventajas de la citometría de flujo es su capacidad para detectar los antígenos débilmente expresados en la superficie de las células. Existen muchos antígenos que se incluyen en esta categoría y no pueden ser fácilmente detectados usando medios alternativos tales como inmunotinciones rutinarias usando procedimientos de detección colorimétrica estándar tales como diaminobencidina (DAB). Este problema en las inmunotinciones se ha superado parcialmente usando procedimientos de amplificación de señal tal como amplificación de la señal de tiramida que está disponible comercialmente como Conjunto de Amplificación de señal Catalizada (Dako Corp., Carpinteria, CA). En el procedimiento, el anticuerpo primario se conjuga al enzima peroxidasa (por lo general peroxidasa de rábano picante o HRP) y se generan radicales libres de oxígeno. En presencia de tiramida, las propias moléculas de tiramida se convierten en radicales libres que son especies altamente reactivas con una corta existencia. Se conjugan fácilmente con moléculas cercanas y se fijan en el área inmediata del anticuerpo primario. La amplificación de señal deriva de la facilidad con la que la tiramida se conjuga tanto con una molécula fluorescente como con la peroxidasa. Esta peroxidasa añadida se usa para generar una señal de DAB adicional y así se amplifica la señal. Esta técnica de amplificación de la señal también se puede aplicar al procedimiento de la invención que se describe en la presente memoria descriptiva. En un ejemplo, los anticuerpos primarios se conjugan a HRP para generar radicales libres de tiramida biotinilada según las instrucciones del fabricante. Después las perlas con avidina se unen fácil y

espontáneamente a la superficie celular y a los sitios correspondientes. Procedimiento alternativo usa perlas submicroscópicas que son invisibles para un microscopio óptico corriente que se recubren con el anticuerpo de interés que también tiene un generador de radicales libres de peróxido tal como, una HRP unida al anticuerpo o a la superficie de la perla. Los radicales libres de tiramida biotinilada se generan según las instrucciones del fabricante y después se lavan las células (o se filtran) y se tratan con perlas grandes con avidina que son fácilmente visibles con un microscopio óptico (típicamente las perlas oscilan entre 5 y 20 μm). Este procedimiento de amplificación de señal potencia en gran medida la débil unión de las perlas cuando, están presentes solamente antígenos raros en la superficie celular. La amplificación sencilla también se puede lograr usando (1) el sistema polimérico Envision con dos etiquetas de Dako Corp., Carpinteria, CA. o (2) la técnica de anticuerpos complementarios especulares, un conjunto que está disponible comercialmente en The Binding Site Company, Birmingham, Inglaterra.

- 5) Se puede realizar un procedimiento alternativo de análisis multiparamétrico usando primero un grupo único de perlas para aislar la población de células diana. El segundo parámetro puede ser entonces detectado usando técnicas inmunohistoquímicas rutinarias o convencionales, tales como inmunofluorescencia, procedimientos colorimétricos tales como los basados en DAB reducida o fosfatasa alcalina, o potenciación con inmuno-oro/plata. Este sistema de detección del anticuerpo secundario se puede aplicar a la suspensión celular o después al portaobjetos pero antes de la tinción CD 45. La elección del procedimiento y del método de detección dependerá de la tinción deseada en el producto final y el anticuerpo particular que se vaya a usar. Dado que este procedimiento deriva la fijación y el procesamiento usados en las secciones incluidas en parafina, los anticuerpos que no pueden usarse en estas parafinas, tales como CD10, CD2, o CD 19, se pueden usar en este procedimiento.

Los siguientes ejemplos ilustran con más detalle varios aspectos de la invención, incluyendo los análisis monoparamétricos y multiparamétricos.

Ejemplo 1

Un varón de 30 años presentó pancitopenia y esplenomegalia. La exploración de un frotis periférico confirmó la pancitopenia. Además, había células dispersas que presentaban características citológicas blandas, con un aspecto monocitoide. Los núcleos de estas células eran redondos u ovalados, con un solo nucleolo intermedio. Hubo abundante citoplasma azul grisáceo que presentaba numerosas proyecciones citoplasmáticas. Una exploración de la médula ósea mostró un aspirado hipocelular con células similares presentes. En la biopsia del núcleo había pequeños grupos de células anómalas. Una muestra recubierta beige del frotis periférico se resuspendió en perlas incoloras de 10 μm recubiertas con anticuerpos anti CD20 para distinguir las células anómalas de los monocitos. La suspensión se pasó a través de un filtro apropiado y las células se transfirieron después a un portaobjetos de vidrio y se tiñó. En la figura 2 se muestra un esquema de la preparación del portaobjetos resultante. La capacidad de unión positiva de la población celular anómala a las perlas de 10 micras fue un hallazgo sospechoso y sugirió una población celular de linfocitos B anómalos. La citometría de flujo realizada en el aspirado de médula ósea reveló una población monoclonal de linfocitos B monocitoides que expresan CD19, CD11c, CD103, una restricción de cadena ligera kappa que confirma el diagnóstico de leucemia de células pilosas.

Ejemplo 2

Un varón de 68 años con un historial conocido de leucemia linfocítica crónica (LLC) se presentó a una revisión médica rutinaria. La exploración clínica reveló que el paciente tenía un recuento de leucocitos periféricos de 435.500 células/ml (intervalo normal 4.300-11.000 células/ml) que incluía un 87% de linfocitos. La exploración morfológica del frotis de sangre periférica reveló predominancia de una población anómala de linfocitos pequeños con una población pequeña pero significativa de células transformadas grandes. Se facilitó una suspensión de células en un medio líquido. Esta muestra se analizó usando perlas de 10 μm recubiertas con anticuerpos anti CD20, perlas de 5 μm incoloras recubiertas con anticuerpos anti kappa y perlas de 5 μm incoloras recubiertas con anticuerpos anti lambda en dos tubos separados. En el procedimiento, se colocó la misma muestra en 2 tubos. A cada tubo se añadieron perlas de 10 μm recubiertas con anticuerpos anti CD20. Éstas se unieron fuertemente a los linfocitos B. Entonces la cuestión fue si los linfocitos B eran kappa, lambda o una combinación de ambos. Por lo tanto, al primer tubo se añadieron las perlas de 5 μm anti kappa y al segundo tubo, las perlas de 5 μm anti lambda. Después se analizaron los resultados tras filtrar y colocar en un portaobjetos de vidrio. Las células se unieron fuertemente a las perlas de 10 μm y no visualizaron unión a las perlas anti lambda y una unión dispersa a las perlas anti kappa (es decir, como en la figura 3, con la excepción de usar sólo 1-2 perlas pequeñas por complejo). Estos resultados son típicos de la LLC ya que este tumor expresa típicamente CD20 pero con restricción de cadena ligera débil cuando se analiza por citometría de flujo. Como procedimiento alternativo, las perlas anti kappa de 5 μm podrían ser rojas y las perlas anti lambda de 5 μm podrían ser azules. El procedimiento aún podría realizarse en dos tubos tal como se ha descrito anteriormente, o las perlas anti kappa y anti lambda se podrían añadir simultáneamente al primer tubo. El análisis de este último resultado visualizaría un complejo como en la figura 3 con azul sólo rodeando la periferia (lo que indica lambda monoclonal), sólo rojo rodeando la periferia (lo que indica kappa monoclonal) o una combinación de rojo y azul rodeando la periferia (lo que indica linfocitos B policlonales).

Ejemplo 3

Un varón de 19 años se presentó en urgencias con dolor de cabeza y cuello rígido. Su evaluación incluyó la obtención de una muestra de líquido cefalorraquídeo cerebral, cuya evaluación patológica urgente del líquido se solicitó llevarla a cabo en presencia de “blastocitos”. La evaluación mostró una población relativamente uniforme de linfocitos pequeños, y se sugirió un diagnóstico de meningitis vírica. El médico del paciente solicitó una citometría de flujo para descartar completamente la posibilidad de un proceso maligno. Dado que no había disponible un exceso de fluido, se trató una pequeña muestra con perlas de 10 micras recubiertas con anticuerpos anti CD20 y perlas de 5 μ m recubiertas con anticuerpos anti kappa y anti lambda en dos tubos usando esencialmente el mismo procedimiento como el descrito en el ejemplo 2 anterior. La mayoría de células no se unió ni a las perlas anticuerpos anti CD20, ni a los anti kappa, ni a los anti lambda, lo que sugiere que la población linfoide estaba compuesta predominantemente por linfocitos T. Los análisis de citometría de flujo recibidos dos días después confirmaron aproximadamente un 60% de linfocitos T y un 40% de linfocitos B con conjuntos normales de linfocitos T y linfocitos B politípicos lo que coincide con una meningitis vírica.

Una ventaja principal de la invención es que los análisis de las poblaciones celulares ahora se pueden realizar con una sencilla inspección del portaobjetos de vidrio por parte de un médico o un técnico. Este tipo de análisis se puede usar sobre cualquier tipo de población celular que exprese los marcadores de superficie celular específicos y e una amplia variedad de condiciones (el linfoma es un ejemplo). Los clones malignos procedentes de pacientes con leucemia aguda se pueden analizar de modo similar (usando diferentes tipos de marcadores), como las poblaciones celulares de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Finalmente, como aparecen disponibles marcadores tumorales para neoplasmas sólidos, se puede realizar además de modo similar este tipo de análisis. Por ejemplo, el nuevo anticuerpo MN/CA9 parece expresarse especialmente en células escamosas de cuello uterino displásicas y malignas. Puesto que estas células se pueden resuspender en un mar de células normales, pueden ser difíciles de identificar incluso con una inmunohistoquímica de rutina. Este procedimiento de análisis puede identificar estas células y enriquecer una preparación citológica para las mismas de modo que puedan ser más fácilmente analizadas.

La presente invención también ofrece un kit para practicar la invención. El kit contiene uno o más grupos de perlas tal como se describe anteriormente. Cada grupo de perlas se encuentra preferentemente en un envase tal como un tubo de ensayo con cierre estanco. En algunos casos de análisis monoparamétricos simultáneos o multiparamétricos, se pueden mezclar previamente dos o más grupos de perlas, pero típicamente se pueden conservar separadas. El conjunto contiene además preferentemente uno o más filtros apropiados tal como se describe anteriormente y preferentemente un conjunto de instrucciones.

La metodología descrita en la presente memoria descriptiva también se puede automatizar y condensar. Un ejemplo de dispositivo semiautomatizado (25) para la realización de este tipo de análisis se describe en la figura 4. Se prepara una muestra para hacer una suspensión celular. Entonces, la muestra se carga en el cargador de muestras (26) de la máquina (25), que se programa para el tipo de análisis deseado (detección de linfoma, análisis de leucemia aguda, mielodisplasia, etc.). La muestra se divide en el número apropiado de cámaras de reacción (28) (por ejemplo, 2, 4, 6, 8, 10 ó 12) y se añade un número preprogramado de grupos de perlas (por ejemplo, grupos de perlas 1, 2, 3, 4, etc.) secuencial o simultáneamente a cada cámara de reacción. Las perlas se incuban en la suspensión celular y se permite la unión a las células y después todas las muestras de las cámaras de reacción se transfieren a una cámara de filtración 30 en la que se filtran las muestras de cada cámara de reacción. Los filtros resultantes o los materiales filtrados se disponen de modo que todos se transfieran simultáneamente a un único portaobjetos de vidrio tal como, el portaobjetos de vidrio (32). El portaobjetos resultante contiene una serie de pocillos, correspondiendo cada pocillo a una muestra de una cámara de reacción. El portaobjetos con pocillos múltiples se puede teñir, y después se puede explorar en un microscopio. Cada pocillo puede corresponder a un análisis multiparamétrico, que se realiza en minutos. La figura 5 es un esquema para un portaobjetos con un panel de linfoma sugerido usando un procedimiento de este tipo. La figura 5 muestra 6 pocillos, conteniendo cada uno de ellos un grupo de 3 perlas tal como se muestra para el análisis multiparamétrico. En la esquina superior izquierda aparece “CD20/kappa/lambda”. Esto indica un pocillo en el que la máquina ejecutó el análisis CD20/kappa/lambda descrito previamente en la presente memoria descriptiva. Los otros 5 pocillos ofrecen información sobre los anticuerpos para análisis de ejecución similares tal como se conoce en la técnica. Opcionalmente, se puede añadir un cuarto o quinto grupo de perlas para posteriores niveles de análisis. Preferentemente, después de realizar una incubación y una filtración monoparamétrica o multiparamétrica, los complejos resultantes (tales como en la figura 3) se tiñen por inmunohistoquímica o hibridación *in situ* y después se evalúan. Se prefieren portaobjetos de vidrio recubiertos, para aumentar la adhesividad. Preferentemente, se tiñen los portaobjetos, se cubren y se examinan con un microscopio óptico de rutina para ensayar la unión. Las células unidas a las perlas se valoran preferentemente para caracterizar y garantizar el tipo de células.

En la presente invención, las células en suspensión en fijadores o medios de cultivo se pueden fenotipar con perlas recubiertas con anticuerpos y aislar de los medios adyacentes usando un filtro con un tamaño de poros adecuado. Estas células unidas, separadas de este modo de la cantidad de otras células, se pueden transferir a un portaobjetos de vidrio y teñir con una variedad de tinciones para su visualización. Además, si no se desea un inmunofenotipado, se puede preparar una preparación citológica usando una variedad de procedimientos tales como Citospina, bloqueo celular, o Thin- Pre.

ES 2 275 511 T3

Se pueden usar análisis monoparamétricos para fenotipar las células de interés, tal como enumerando los números relativos de linfocitos B que expresan las cadenas ligeras kappa y lambda. Otra aplicación es el aislamiento de células epiteliales cervicales positivas MN/CA9.

- 5 Determinados marcadores de superficie celular se pueden semicuantificar aislando primero las células de interés y después enumerando el número medio de perlas unidas a la superficie.

- 10 Debería ser evidente que esta descripción es a título de ejemplo y que se pueden hacer varios cambios añadiendo, modificando o eliminando detalles sin desviarse del alcance imparcial de la información contenida en esta descripción. La invención no se limita por lo tanto a detalles particulares de esta descripción excepto en el alcance de las siguientes reivindicaciones, por las cuales se limita necesariamente.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para caracterización de células, que comprende las etapas de:

- a) disponer una suspensión de células en un medio líquido, incluyendo dichas células primeras células,
- b) poner en contacto un grupo de primeras perlas con dicha suspensión, estando recubierta cada una de dichas primeras perlas con una sustancia de unión, o siendo magnéticas, de modo que cada primera perla se adapte para poder unirse al menos a una de dichas primeras células,
- c) incubar dichas primeras perlas con dicha suspensión durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas primeras células se unan a dichas primeras perlas y formen complejos primera perla-primera célula, comprendiendo cada complejo primera perla-primera célula una primera perla y una primera célula,
- d) separar dichos complejos primera perla-primera célula de dicha suspensión por filtración a través de un filtro y transfiriendo a un portaobjetos de vidrio dichos complejos primera perla-primera célula separados por dicha filtración, y
- e) examinar dichos complejos primera perla-primera célula y caracterizar dichas primeras células.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, que además comprende las etapas de:

- a) antes de poner en contacto las primeras perlas con la suspensión, permeabilizar dichas primeras células e incubar dichas primeras células con partículas paramagnéticas que están unidas a un marcador biológico reactivo, de modo que ese marcador biológico reactivo se una a dicha primera célula, o al interior de dicha primera célula, y en el que cada primera perla es magnética.

3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha suspensión de células incluye segundas células, formando grupos dichas segundas células y dichas primeras células en grupos que no se solapan, incluyendo dicho procedimiento análisis monoparamétricos simultáneos, y comprendiendo además las etapas de:

- 1) antes de dicha etapa de filtración, añadir a dicha suspensión un grupo de segundas perlas, estando recubierta cada una de dichas segundas perlas con una sustancia de unión o siendo dicha segunda perla magnética de modo que se adapte a una segunda célula,
- 2) incubar dichas segundas perlas con dicha suspensión durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas segundas perlas se unan a dichas segundas células para formar complejos segunda perla-segunda célula, y
- 3) separar simultáneamente dichos complejos segunda perla-segunda célula y dichos complejos primera perla-primera célula de dicha suspensión por filtración.

4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha suspensión de células incluye segundas células que son un conjunto de dichas primeras células, incluyendo dicho procedimiento el análisis multiparamétricos, y que además comprende las etapas de:

- 1) antes de dicha etapa de filtración, añadir a una suspensión, comprendiendo dichas primeras perlas y primeras células un grupo de segundas perlas, estando recubierta cada una de dichas segundas perlas con una sustancia de unión, o siendo magnética dicha segunda perla, de modo que se adapte a una segunda célula,
- 2) incubar dichas segundas perlas con dicha suspensión durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas segundas perlas se unan a dichas segundas células para formar complejos primera perla-segunda célula-segunda perla, comprendiendo cada complejo primera perla-segunda célula-segunda perla una primera perla, una segunda célula y una segunda perla, y
- 3) separar dichos complejos primera perla-segunda célula-segunda perla de dicha suspensión por filtración.

5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que las terceras células son un conjunto de dichas primeras células, y en el que dichas terceras células son un conjunto de dichas segundas células o son diferentes de dichas segundas células, comprendiendo además dicho procedimiento las etapas de:

- 1) añadir a (a) una suspensión que contiene dichas primeras perlas, dichas primeras células, dichas segundas células y dichas segundas perlas o (b) una suspensión que contiene dichas primeras perlas y dichas primeras células pero no dichas segundas perlas, un grupo de terceras perlas, estando recubierta cada una de las terceras perlas con una sustancia de unión, o siendo magnética, de manera que dicha tercera perla se adapte para unirse a una tercera célula,

ES 2 275 511 T3

2) incubar dichas terceras perlas en la suspensión a la que se han añadido durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas terceras perlas se unan a dichas terceras células y formen complejos primera perla-tercera célula-tercera perla, comprendiendo cada complejo primera perla-tercera célula-tercera perla una primera perla, una tercera célula y una tercera perla y

3) filtrar dicha suspensión a la que se añadieron dichas terceras perlas para separar los complejos perla-célula que se hayan formado.

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dichas primeras perlas y dichas segundas perlas son visualmente distinguibles por tamaño o color.

7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichas primeras perlas tienen un diámetro al menos de $1\ \mu\text{m}$ y no más de $30\ \mu\text{m}$.

8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende la etapa de amplificación de la señal de un antígeno débilmente expresado en la superficie de dichas primeras células para facilitar la unión de dichas primeras perlas.

9. Procedimiento para la caracterización de células, que comprende las etapas de:

a) disponer una suspensión de células en un medio líquido,

b) poner en contacto un grupo de primeras perlas con dicha suspensión, estando recubierta cada una de dichas primeras perlas con una sustancia de unión de modo que cada primera perla se adapte para poder unirse a un tipo preseleccionado de células,

c) incubar dicho grupo de primeras perlas con dicha suspensión durante un periodo de tiempo eficaz para permitir que dichas primeras perlas se unan a dicho tipo preseleccionado de células para formar complejos perla-célula,

d) filtrar dicha suspensión para retener en un filtro cualquier complejo perla-célula que se haya formado, y transferir a un portaobjetos de vidrio cualquier complejo perla-célula separado por dicha filtración, y

e) examinar los resultados de las etapas de filtración y transferencia para caracterizar las células en dicha suspensión.

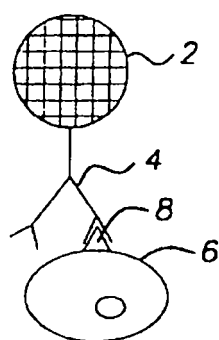


FIG. 1

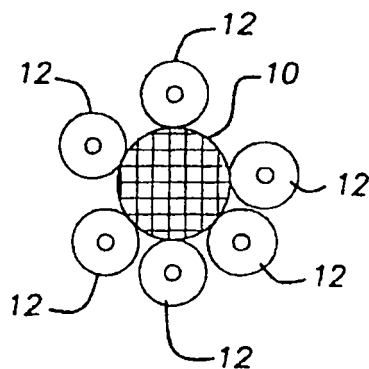


FIG. 2

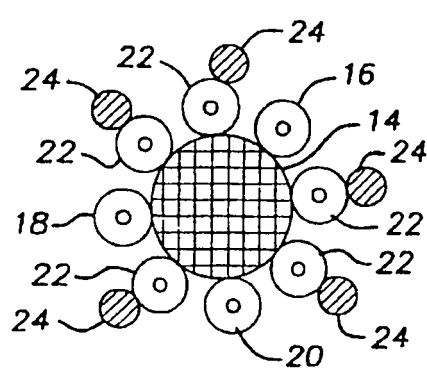


FIG. 3

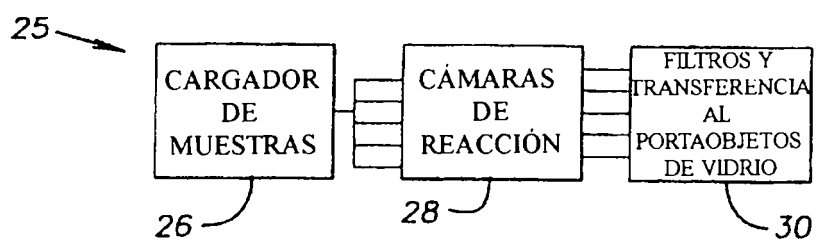


FIG. 4

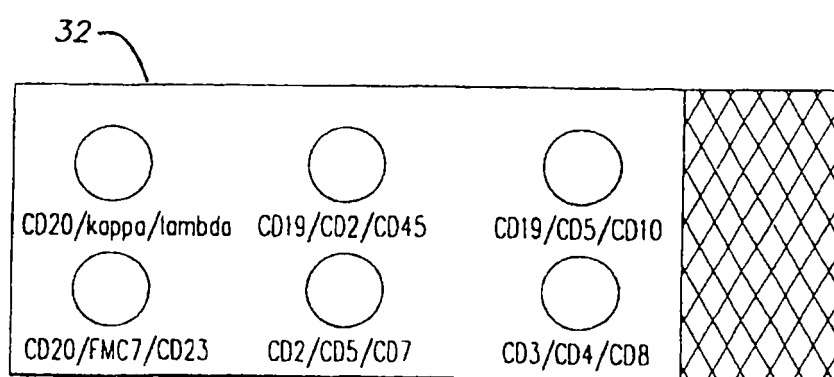


FIG. 5