



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 112 211**

②① Número de solicitud: 9600715

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q 1/04

C12N 5/10

G01N 33/533

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **26.03.96**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.98**

Fecha de concesión: **12.11.98**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.98**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.12.98**

⑦③ Titular/es: **Universidad de Salamanca  
Patio de Escuelas Menores No. 1  
37008 Salamanca, ES**

⑦② Inventor/es:  
**Orfao de Matos Correia e Vale, José Alberto**

⑦④ Agente: **Hernández Covarrubias, Arturo**

⑤④ Título: **Procedimiento para el estudio del ciclo celular de subpoblaciones de células presentes en muestras celulares heterogéneas.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para el estudio del ciclo celular de subpoblaciones de células presentes en muestras celulares heterogéneas.

Comprende: incubar la muestra de forma secuencial con: 1) un pool de anticuerpos monoclonales diferentes marcados con un mismo fluorocromo y 2) con un fluorocromo que se une de forma específica a ácidos nucleicos; medir por citometría de flujo las emisiones fluorescentes; determinar el ciclo celular de forma específica de las subpoblaciones de células de la muestra identificadas mediante análisis multiparamétrico que permite conocer todos los tipos celulares identificados la proporción de células en las fases G0/G1, de síntesis de ADN (S) y G2/mitosis (G2/M) del ciclo celular.

ES 2 112 211 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Procedimiento para el estudio del ciclo celular de subpoblaciones de células presentes en muestras celulares heterogéneas.

Esta invención se relaciona principalmente, aunque no de forma exclusiva, con un procedimiento para el estudio rápido, económico, sensible y específico en citometría de flujo del ciclo celular de subpoblaciones de células tumorales y de células normales presentes en muestras celulares heterogéneas, para el conocimiento de la biología celular y para fines e investigaciones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

Se conoce como ciclo celular a las fases por las que una célula ha de pasar para poder multiplicarse y dar lugar a dos células hijas en principio idénticas. Durante este período y de forma secuencial, células en reposo (fase G0) en determinadas circunstancias o tras recibir estímulos concretos, inician la síntesis de ARN y proteínas (fase G1) necesarias para llevar a buen término la multiplicación de su ADN y la división en dos células hijas; a continuación se inicia la síntesis de ADN (fase S); una vez que la célula ha duplicado su ADN se inicia un segundo período de síntesis proteica tardía (fase G2) que prepara la mitosis o segregación de los núcleos y la división celular (fase M).

El estudio del ciclo celular, fundamentalmente a través del análisis de la distribución de las células a lo largo de las fases G0/G1, S y G2/M, ha demostrado ser de utilidad, entre otras áreas, en el análisis de muestras tumorales o en el estudio de la respuesta proliferativa a determinados estímulos, demostrándose en conjunto una gran utilidad de este tipo de análisis tanto para el conocimiento de la biología celular como para fines diagnósticos pronósticos y terapéuticos.

De las diferentes metodologías empleadas hoy día, la de uso mas extendido se basa en la tinción de células con fluorocromos específicos de ADN; en base a la cantidad de fluorescencia/ADN obtenida; mediante modelos matemáticos, se calcula la proporción de células que, en una muestra, están en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.

Uno de los principales problemas encontrados en el estudio del ciclo celular a partir de muestras obtenidas in vivo se debe a la ausencia, habitualmente, en ellas de subpoblaciones celulares puras; con frecuencia (por ejemplo, en muestras tumorales o en otras muestras biológicas) existe una mezcla a proporciones variables de distintos tipos de células que pueden presentar una distribución diferente a lo largo del ciclo celular.

Así, el estudio global del ciclo celular no proporciona una información directa sobre la proliferación de cada una de las subpoblaciones diferentes presentes en la muestra.

Estudios recientes han demostrado la posibilidad de realizar marcajes con un anticuerpo monoclonal y un fluorocromo de ADN, para llevar a cabo el análisis de forma específica de la distribución de células tumorales a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Sin embargo, diversos factores como la heterogeneidad de las células tumorales para la expresión de un marca-

dor (ya sea dentro de una misma muestra tumoral o dentro de pacientes diferentes con un mismo diagnóstico), la utilización de fluorocromos que se unen de forma específica al ADN y que absorben parte de la fluorescencia asociada al anticuerpo monoclonal utilizado y la necesidad de utilizar en la mayoría de estos procedimientos de sustancias que permeabilizan y en cierta medida alteran la membrana celular y la unión del anticuerpo monoclonal, hacen que la discriminación entre células que se pretende identificar de forma específica para estudiar en ellas el ciclo celular y los demás elementos celulares de la muestra no sea óptima.

Así, hasta la fecha no se ha descrito ningún procedimiento en el que la identificación en una muestra de una subpoblación de células, en las que se pretende analizar el ciclo celular mediante tinción con fluorocromos específicos de ácidos nucleicos, se realice utilizando un pool de diferentes anticuerpos monoclonales marcados con un mismo fluorocromo.

Por tanto, un objeto de esta invención consiste en proporcionar una solución para el estudio específico del ciclo celular de una subpoblación de células presente en una muestra, en la que se obtenga una discriminación óptima entre las células de interés y los demás elementos celulares de la muestra.

Igualmente, otro objeto de la invención consiste en conocer la distribución de las restantes células (células negativas para el pool de anticuerpos empleados) a lo largo de las distintas fases del ciclo celular.

El procedimiento de esta invención consiste en emplear un pool de anticuerpos monoclonales marcados con un mismo fluorocromo (FL1), por ejemplo el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que identifican en su conjunto el total de las células de la muestra a identificar de forma específica y un fluorocromo específico de ácidos nucleicos (FL2), por ejemplo el yoduro de propidio o el bromuro de etidio.

La preparación de la muestra, el marcaje celular con anticuerpos monoclonales y con fluorocromos específicos de ácidos nucleicos, la selección durante el análisis de las células a estudiar, así como la calibración y ajuste del citómetro de flujo, se realizan de acuerdo con métodos ampliamente descritos y recomendados.

Para el análisis de los resultados y para la cuantificación exacta de cada fase del ciclo celular de cada población estudiada, pueden emplearse diferentes programas informáticos comercialmente disponibles. En el análisis, además de seleccionar de la muestra el subgrupo de células que interesa estudiar deben de excluirse aquellos eventos que corresponden a células que han pasado de dos en dos, tres en tres, etc., así como los restos celulares.

La invención puede ser utilizada tanto en muestras normales como patológicas, humanas o de animales de experimentación, en vegetales, bacterias y otros microorganismos, para todos los fines en los que se requiera analizar la distribución de un subgrupo de células presentes en una muestra a lo largo de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular, para fines de investigación, es-

tudios diagnósticos, pronósticos y de evaluación terapéutica.

Como se deduce de lo anteriormente expuesto, pueden variarse los anticuerpos monoclonales utilizados dependiendo fundamentalmente del tipo celular a identificar. Asimismo, se entiende que en esta invención están contenidas variaciones en las que se cambien los fluorocromos o en las que el número de anticuerpos monoclonales utilizados con un mismo fluorocromo sea superior a dos. Finalmente se entiende que en esta invención están contenidas aquellas variaciones en las que se utilicen mas de un pool de anticuerpos monoclonales, eso si, marcados con fluorocromos diferentes para la identificación de forma específica y simultánea en la misma muestra de dos subpoblaciones celulares diferentes.

Con esta invención se optimiza de forma importante el estudio del ciclo celular en muestras biológicas mejorando la selección de células de interés y la rapidez del estudio.

De considerarse además que la posibilidad de emplear un pool de anticuerpos monoclonales marcados con un mismo fluorocromo para el estudio del ciclo celular proporciona una información detallada sobre la proliferación de las células estudiadas de gran interés para conocer de forma sistemática su situación y su utilidad en diferentes situaciones normales y patológicas.

A continuación, la invención será ilustrada por dos ejemplos no limitativos del alcance de la misma.

#### Ejemplo 1

##### 1.- *Material y Métodos*

Se recogió sangre periférica (SP) de 10 pacientes diagnosticados de síndromes linfoproliferativos crónicos de células B (SLP-B) en EDTA líquido (K3) por punción venosa y se mantuvo a temperatura ambiente hasta la preparación de las muestras. El estudio del ciclo celular se llevó a cabo en el espacio de 5 horas usando técnica de inmunofluorescencia directa y tinción con yoduro de propidio medidas en citometría de flujo.

##### 2.- *Preparación de muestras*

Se preparó un tubo para cada una de las muestras conteniendo 100 $\mu$ L de sangre periférica en las que estaban contenidas entre 0.5-1 x 10<sup>6</sup> leucocitos. La muestra se incubó con tres anticuerpos monoclonales marcados con FITC.

Las especificidades de las combinaciones de los anticuerpos monoclonales usados y su procedencia, fueron como sigue:

1) FMC63-FITC (CD19); marcador pan-B (Serotec, Inglaterra).

2) Leu14-FITC (CD22); marcador pan-B (Becton/Dickinson, USA).

3) Leu16-FITC (CD20); marcador pan-B (Becton/Dickinson, USA).

Los tubos fueron agitados suavemente y se incubaron en la oscuridad durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después de este período de incubación se añadieron a cada tubo 2 ml de una solución lisante de cloruro amónico, seguido por 4-5 segundos de agitación. A continuación las células se incubaron durante 10 minutos mas en oscuridad (temperatura ambiente). Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 300g durante 5 minutos (4°C). Se

aspiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular libre de hematies sometiéndolo a una agitación vigorosa (1-2 segundos). En cada tubo se añadió 1 mL de una solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo 1 g/L de albumina bovina (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). Se realizó otro centrifugado (300g, 5 minutos), resuspendiéndose finalmente las células en 1 mL de una solución de PBS con 0,5% de Tween-20 (Sigma), 100mg/mL de ARNasa (Sigma Chemicals) y 5 $\mu$ g/mL de yoduro de propidio (Sigma Chemicals). Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en esta solución y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo.

##### 3.- *Adquisición y análisis de datos*

Las mediciones fueron realizadas en un citómetro de flujo FACSsort (Becton/Dickinson) equipado con una láser de argón sintonizado a 488nm y 15 m wattios. El instrumento se calibró usando el reactivo DNA-QC (Becton/Dickinson). La compensación de fluorescencias entre FITC y el yoduro de propidio se llevó a cabo con las bolas CALIBRITE y hematies de polo marcados con yoduro de propidio.

El análisis se realizó en dos etapas. En primer lugar se seleccionaron las células de interés (positivas para FITC) correspondientes a las células B neoplásicas eliminando no sólo las células no-B como también los restos y los agregados celulares. Para ello se utilizó el programa informático PAINT-A-GATE PLUS (Becton/Dickinson). A continuación y empleando el modelo matemático RFIT incluido en el programa informático CELLFIT (Becton/Dickinson) se calculó sobre el histograma de yoduro de propidio/ADN la proporción dentro de la población seleccionada de las células en fase G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.

#### Ejemplo 2

##### 1.- *Material y Métodos*

Se recogió en EDTA líquido (K3) médula ósea (MO) de 15 pacientes diagnosticados de mieloma múltiple y se mantuvo a temperatura ambiente hasta la preparación de las muestras. El estudio del ciclo celular se llevó a cabo en el espacio de 5 horas usando técnica de inmunofluorescencia indirecta y tinción con yoduro de propidio medidas en citometría de flujo.

##### 2.- *Preparación de muestras*

Se preparó un tubo para cada una de las muestras conteniendo 100 $\mu$ L de médula ósea en las que estaban contenidas entre 0.5-1 x 10<sup>6</sup> leucocitos. La muestra se incubó con dos anticuerpos monoclonales.

Las especificidades de las combinaciones de los anticuerpos monoclonales usados y su procedencia, fueron como sigue:

1) BB4; marcador de células plasmáticas (Serotec, Inglaterra).

2) GR7A4 (CD38); marcador que se expresa de forma intensa y características en células plasmáticas (Universidad de Granada).

Los tubos fueron agitados suavemente y se incubaron en la oscuridad durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después de este período de incubación se añadieron a cada tubo 2 mL de una solución salina tamponada con fosfato. Inmediatamente a continuación se cen-

trifugaron las células decantando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular en 200 $\mu$ L de la misma solución salina. Al botón celular se añadió un anticuerpo monoclonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con fluoresceína (DAKO, Dinamarca) a una dilución 1/100 y se realizó una segunda incubación durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalizada esta incubación, se añadieron 2 ml/tubo de una solución lisante de cloruro amónico, seguido por 4-5 segundos de agitación. A continuación las células se incubaron durante 10 minutos mas en oscuridad (temperatura ambiente). Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 300g durante 5 minutos (4°C). Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular libre de hematies sometándolo a una agitación vigorosa (1-2 segundos). En cada tubo se añadió 1 mL de una solución salina tamponada con fosfato (PBS) conteniendo 1 g/L de albúmina bovina (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). Se realizó otro centrifugado (300g, 5 minutos), resuspendiéndose finalmente las células en 1 mL de una solución de PBS con 0.5% de tween-20 (Sigma), 100mg/mL de ARNasa (Sigma Chemicals) y 5 $\mu$ g/mL de yoduro de propidio (Sigma Chemicals). Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en esta so-

lución y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo.

### 3.- Adquisición y análisis de datos

Las mediciones fueron realizadas en el citómetro de flujo FACSort (Becton/Dickinson) equipado con una láser de argón sintonizado a 488 nm y 15 m wattios. El instrumento se calibró usando el reactivo DNA-QC (Becton/Dickinson). La compensación de fluorescencias entre FITC y el yoduro de propidio se llevó a cabo con las bolas CALIBRITE y hematies de pollo marcados con yoduro de propidio.

El análisis se realizó en dos etapas. En primer lugar se seleccionaron las células de interés (positividad intensa para FITC) correspondientes a las células plasmáticas mielomatosas eliminando no solo las demás células presentes en la muestra sino también los restos y agregados celulares. Para ello se utilizó el programa informático PAINT-A-GATE PLUS (Becton/Dickinson). A continuación y empleando el modelo matemático RFIT contenido en el programa informático CELLFIT (Becton/Dickinson) se calculó sobre el histograma de yoduro de propidio/ADN la proporción, dentro de la población seleccionada de células plasmáticas, de las células en fase G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el estudio del ciclo celular en subpoblaciones de células presentes en muestras heterogéneas, **caracterizado** porque comprende las etapas de:

a) incubar la muestra de forma secuencial con un pool de anticuerpos monoclonales diferentes marcados con un mismo fluorocromo y dirigidos a todos a identificar de forma específica y sensible, las células de interés y con un fluorocromo específico de ácidos nucleicos;

b) medir por citometría de flujo las emisiones fluorescentes de los fluorocromos;

c) analizar los resultados obtenidos mediante análisis multiparamétrico para identificar la subpoblación celular a estudiar y analizar su distribución a lo largo de las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la etapa (a) se emplean muestras normales o patológicas obtenidas "in vivo", almacenadas o tratadas "in vitro".

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los anticuerpos monoclonales empleados y su número puede variar dependiendo del tipo celular a identificar, de su fenotipo o del tipo de muestra.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se puede emplear cualquier combinación de fluorocromos, técnicamente compatibles.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque se puede emplear más de un pool de anticuerpos monoclonales dirigidos a más de una subpoblación celular diferente, estando cada uno de los pools marcado con un fluorocromo distinto.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque además del marcaje para la subpoblación a estudiar y los ácidos nucleicos, se identifican otros marcadores incluidas oncoproteínas, proteínas relacionadas con el ciclo celular, la apoptosis o la activación y diferenciación celulares.

7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la identificación de células se realiza por presencia de marcaje para el pool de anticuerpos utilizados o por intensidad de positividad para los mismos.

8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la información obtenida sobre las células de la muestra permite detectar la existencia de alteraciones cuantitativas de ADN en un grupo de las células de la muestra.

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q 1/04, C12N 5/10, G01N 33/533

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	McMURRAY B.P. et al. "Sequential flow cytometric analysis of cell-cycle related changes in LFA-1 (CD18 CD11A) expression by Trisomy 21 (Down's Syndrome) lymphoblastoid cells" CELL TISSUE KINET. 1989. Vol. 22 (3), páginas 223-233	1-7
Y	US-4780406-A (DOLBEARE FRANK A. et al.) 25.10.88 * Reivindicaciones 1-23 *	1-7
Y	EP-0121262-A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 10.10.84 * Reivindicaciones 1-11 *	1-7
A	ES-2051651-B (UNIVERSIDAD DE SALAMANCA) 16.06.94 * Reivindicaciones 1-9 *	1-7
A	ANDREEFF M. et al. "Cellular ras Oncogene Expression and Cell Cycle Measured by Flow Cytometry in Hematopoietic Cell Lines". BLOOD. 1986. Vol. 67 (3), páginas 676-681	1-7

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

20.02.98

**Examinador**

A. Collados Martín Posadillo

**Página**

1/1