



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 671**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06256613 .8**

96 Fecha de presentación : **29.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1813945**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2007**

54 Título: **Procedimiento de determinación del fenotipo de células.**

30 Prioridad: **30.12.2005 US 755611 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.07.2011

73 Titular/es: **CENTOCOR ORTHO BIOTECH Inc.**
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, Pennsylvania 19044, US

72 Inventor/es: **Popma, Sicco H.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 671 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

Procedimiento de determinación del fenotipo de células

Campo de la invención

5 La presente invención se dirige a procedimientos para la determinación rápida, eficaz y precisa del fenotipo de las células. En particular, esta invención se dirige a procedimientos que emplean anticuerpos.

Antecedentes

10 La superficie de cada célula del organismo está recubierta de proteínas. Estas proteínas de la superficie celular tienen varias funciones. Por ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden ser receptores, que tienen la capacidad de unirse o adherirse selectivamente a otras moléculas de "señalización". Alternativamente, estas proteínas pueden ser funcionales o estructurales. Por ejemplo, la proteína puede facilitar la adherencia de la célula a un sustrato, o la proteína puede facilitar la secreción de una molécula. Cada tipo celular, por ejemplo una célula hepática, tiene una determinada combinación de proteínas sobre su superficie que la hace distinguible de los otros tipos de células o sistemas celulares.

15 La expresión de las proteínas de la superficie celular de un tipo determinado de células puede variar, dependiendo de diversos factores. Puede incluir, por ejemplo, cambios como resultado de la proliferación y diferenciación celular, enfermedad, aislamiento de la célula del organismo y cultivo in vitro. Por ejemplo, se ha notificado que las proteínas de la superficie celular tienen funciones vitales en múltiples etapas de la metástasis del cáncer de próstata, como la separación de las células tumorales de la matriz extracelular, resistencia de las células tumorales a la apoptosis inducida por la separación, adhesión de las células tumorales a las células endoteliales y angiogénesis como apoyo al crecimiento tumoral. Puede que haya proteínas de la superficie celular expresadas de forma exclusiva o diferenciada tanto en células epiteliales como endoteliales que son importantes para los procesos individuales de la metástasis del cáncer de próstata.

20 Los investigadores han aprovechado la exclusividad biológica de las proteínas de la superficie celular y de propiedades celulares de determinados compuestos para etiquetas o "marcar" las células. Las células marcadas de esta forma pueden aislarse y caracterizarse fácilmente. En muchos casos, se usa una combinación de marcadores múltiples para identificar un tipo celular en particular.

25 Los anticuerpos se utilizan ampliamente como herramientas de diagnóstico en una amplia selección de análisis diferentes. Los anticuerpos monoclonales y recombinantes pueden utilizarse como sondas para etiquetar o marcar células. Los inmunoensayos a base de anticuerpos son el tipo de ensayo diagnóstico utilizado con mayor frecuencia y sigue siendo una de las tecnologías en más rápido crecimiento para el análisis de biomoléculas. Otro ejemplo con especial importancia en el diagnóstico que se ha convertido en rutinario durante la pasada década es el análisis por citometría de flujo. La citometría de flujo es un procedimiento para cuantificar componentes o características estructurales de las células principalmente mediante sistemas ópticos. Aunque realiza determinaciones de una célula cada vez, pueden procesarse miles de células en pocos segundos. Puesto que los diferentes tipos celulares pueden distinguirse cuantificando características estructurales, la citometría de flujo puede usarse para contar células de tipos diferentes en una mezcla. También pueden emplearse citómetros de flujo para seleccionar o "clasificar" células en base a su expresión de marcadores de la superficie celular.

30 Los componentes intracelulares también pueden ponerse de manifiesto mediante sondas fluorescentes, incluyendo el ADN total/célula (lo que permite el análisis del ciclo celular), el ADN recién sintetizado, secuencias de nucleótidos específicos en el ADN o ARNm, filamentos de actina y cualquier estructura para la cual se disponga de un anticuerpo. Con la citometría de flujo también se pueden controlar los cambios rápidos en el calcio libre intracelular, el potencial de membrana, el pH o las vías de señalización celular. Por ejemplo, Krutzik y col. (Journal of Immunology, 2005, 175: 2357-2365) establecen que "la citometría de flujo fosfoespecífica ha surgido como una herramienta poderosa para analizar los acontecimientos de señalización intracelular en poblaciones complejas de células debido a su capacidad para discriminar simultáneamente tipos celulares en función de la expresión de marcadores superficiales y de los niveles medidos de fosfoproteínas intracelulares. Esto ha proporcionado una introspección novedosa dentro de la naturaleza específica de la célula y de las vías de señalización inmune".

35 El análisis por citometría de flujo y los estudios de clasificación usando anticuerpos monoclonales para definir los marcadores superficiales en poblaciones celulares normales y neoplásicas crearon la base para los ensayos de diagnóstico clínico de rutina que ahora alcanzan desde la clasificación de la leucemia al control de la pérdida de células T CD4+ al tiempo que progresa la enfermedad por VIH.

40 A pesar de la versatilidad de la citometría de flujo, hay algunos inconvenientes. Por ejemplo, los anticuerpos elegidos como reactivos de citometría de flujo pueden no ser óptimos: Puede que no sean específicos, lo que produce una elevada tinción de fondo. Además, la eficacia de conjugación del fluorocromo al anticuerpo puede variar de un lote a otro. Por tanto, las comparaciones entre poblaciones de células pueden complicarse adicionalmente.

Además, para evaluar parámetros múltiples en poblaciones celulares, es necesaria una inversión importante para comprar los anticuerpos requeridos. Por ejemplo, el análisis de 90 parámetros individuales requerirá comprar los 90 anticuerpos independientes, lo que pueden ascender a varias decenas de miles de dólares y un gran número de células por análisis. Esto es problemático si el número de células es finito y limitado. Por tanto, existe una necesidad significativa de reactivos y anticuerpos rentables, validados y reproducibles para el fenotipado o análisis de células.

Rosa y col. (Nature Medicine, 7, 245 - 248, 2001) identificaron células T vírgenes humanas usando citometría de flujo.

Borowitz y col. (Blood, 89:11, 3960-3966, 1997) usaron la citometría de flujo para medir la expresión de antígeno de la superficie de la membrana en pacientes diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B.

Hamann y col. (J. Exp. Med., 186:3, 1407-1418, 1997) caracterizaron células T CD8+ humanas de memoria y efectoras usando citometría de flujo.

En el documento WO 02/074789 (Escuela de Medicina de Baylor) se caracterizaron monocitos de sangre de pacientes con VIH usando citometría de flujo.

Sumario

La presente invención proporciona un kit que comprende una placa multipocillo que contiene anticuerpos liofilizados o configurados de otra forma para un transporte y conservación convenientes, en la que los anticuerpos son para detectar el panel de marcadores de fenotipo descritos en la Tabla 2.

La presente invención también proporciona un kit para comparar el estado fenotípico de una primera muestra de material desconocido con un material de muestra de un estado fenotípico conocido donde el material de la muestra no procede de un embrión humano que comprende:

- a. el panel de marcadores fenotípicos descritos en la Tabla 2 y
- b. anticuerpos para detectar la presencia de los marcadores fenotípicos de la Tabla 2 en una materia de muestra.

La presente invención también proporciona un procedimiento para comparar el estado fenotípico de un primer material de muestra desconocido con un material de muestra de un estado fenotípico conocido que comprende las etapas de:

- a. Obtener un primer material de muestra desconocido y;
- b. Poner en contacto el primer material de muestra desconocido con anticuerpos para detectar la presencia de los marcadores fenotípicos del panel descrito en la Tabla 2 en el primer material de muestra desconocido y
- c. Registrar la presencia de marcadores fenotípicos en el primer material de muestra desconocido y;
- d. Obtener un material de muestra de un estado fenotípico conocido y
- e. Poner en contacto el material de muestra de un estado fenotípico conocido con dichos reactivos para detectar la presencia de dicho panel de marcadores fenotípicos donde el material de muestra no procede de un embrión humano en el material de muestra de un estado fenotípico conocido y;
- f. Registrar la presencia de marcadores fenotípicos en el material de muestra de un estado fenotípico conocido y
- g. Notificar las diferencias entre el material de muestra desconocido y el material de muestra de un estado fenotípico conocido.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: esquema del procedimiento de la presente invención.

Figura 2: análisis del estado fenotípico de una población de células usando la selección de reactivos marcadores mostrada en la Tabla 2.

Figura 3: análisis de los efectos del tratamiento enzimático sobre el estado fenotípico de diferentes muestras de poblaciones de la célula X usando la selección de reactivos marcadores mostrada en la Tabla 2.

Figura 4: comparación del estado fenotípico de una muestra de la célula X con una muestra de fibroblastos dérmicos humanos, usando la selección de reactivos marcadores mostrada en la Tabla 2.

Figura 5: análisis fenotípico de sangre completa. La Figura 5 A muestra el nivel de expresión de un epítipo

seleccionado en muestras de células heterogéneas. Las poblaciones de leucocitos, monocitos y granulocitos se seleccionaron en función del tamaño y la granularidad. Se evaluaron el porcentaje de acontecimientos positivos y la intensidad media de fluorescencia de todas las poblaciones celulares seleccionadas para cada epítipo probado. Como ejemplo, se muestran los niveles de expresión de CD63 en todas las poblaciones celulares. En la Figura 5 B se muestra el porcentaje de acontecimientos positivos y los niveles de expresión de leucocitos, monocitos y granulocitos para la selección de epítipes de superficie mostrada. Las poblaciones celulares se seleccionan y analizan a partir de tres donantes sanos en 11 pruebas independientes (media \pm ETM). En la Figura 5 C se muestran los niveles de expresión de los epítipes en la selección de reactivos mostrada en la tabla 1 para una población de leucocitos obtenida de un individuo sano.

10 **Descripción detallada**

Según la presente invención, se proporcionan los componentes y procedimientos del ensayo para la caracterización del fenotipo de las células. Como reconocerán los expertos en la materia, la invención tiene un enorme número de aplicaciones en las técnicas diagnósticas de ensayo. Los reactivos pueden prepararse, por ejemplo, de modo se detecte o analice cualquier de las diversas características de la muestra, enfermedades o reactivos. La presente invención proporciona un panel de reactivos que se seleccionan para cubrir diversas aplicaciones.

Los reactivos

Los reactivos adecuados para su uso en la presente invención son anticuerpos que reconocen marcadores fenotípicos. Los marcadores fenotípicos pueden ser proteínas expresadas en la superficie de las células o pueden ser proteínas que se expresan a nivel intracelular. Alternativamente, pueden ser proteínas que secreta la célula. Alternativamente, los marcadores fenotípicos pueden ser ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos o cualquier biomolécula.

Los reactivos adecuados para su uso en la presente invención son anticuerpos que reconocen específicamente los marcadores fenotípicos. En una realización, los reactivos están marcados con un marcador fluorescente. Alternativamente, el reactivo puede ser intrínsecamente fluorescente.

Los anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales o puede generarse mediante una aplicación específica. En una realización, los anticuerpos están marcados con un marcador fluorescente. Los ejemplos de anticuerpos y marcadores fenotípicos adecuados para su uso en la presente invención se muestran en la Tabla 2.

Los paneles de reactivos

La presente invención proporciona reactivos optimizados y rentables para el análisis reproducible de células. En una realización, el reactivo está en forma de kit, que comprende una placa multipocillo que contiene anticuerpos liofilizados o en otra configuración que permiten su transporte y conservación apropiados. Las placas multipocillo pueden tener formatos diferentes como de 6, 8, 12, 24, 96 o 384 pocillos y similares. Los anticuerpos se seleccionan según el análisis que se va a realizar. Los anticuerpos pueden seleccionarse para cubrir epítipes inmunes relacionados. Alternativamente, pueden seleccionarse para cubrir epítipes de cáncer o epítipes de células madre. Los anticuerpos pueden reconocer moléculas extracelulares o pueden reconocer moléculas intracelulares.

Los anticuerpos seleccionados pueden dispensarse dentro de placas multipocillo según las distribuciones marcadas en las Tablas 2 y 3. Las distribuciones son exclusivas del panel de marcadores fenotípicos específicos. Cada pocillo de la placa multipocillo puede contener un único anticuerpo o múltiples anticuerpos. Los anticuerpos seleccionados se proporcionan en grandes cantidades y se dispensan en un gran número de placas para reducir la variación entre muestras. Los anticuerpos pueden conservarse en las placas en solución antes del análisis. Alternativamente, los anticuerpos pueden conservarse liofilizados y reconstituirse antes del análisis.

El procedimiento

En una realización, el procedimiento de la presente invención comprende un sistema que conlleva las etapas de recogida del material de muestras de un estado fenotípico desconocido y recogida de material de muestra de un estado fenotípico conocido. El material de muestra puede comprender, por ejemplo, células, sangre o cualquier muestra biológica. El sistema analiza los materiales de muestra para identificar patrones de marcadores de epítipes en el material de muestra del estado fenotípico conocido que se usan como comparadores para el material de muestra de estado fenotípico desconocido. La identidad de los epítipes en el patrón identificado puede ser conocida. Alternativamente, más de un epítipo en el patrón identificado puede ser desconocido. En la **Figura 1** se muestra un esquema del procedimiento de la presente invención.

Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden usarse con fines de control de calidad. En este caso, el material de muestra de estado fenotípico conocido puede obtenerse a partir de una población de células control. A continuación, este material de muestra puede usarse como comparador para el material de muestra de estado fenotípico desconocido que consiste en poblaciones de células obtenidas de series de producción. Los cambios en los patrones de marcadores de epítipes en el material de muestra de fenotipos conocidos pueden

usarse para rechazar o aceptar las series de producción. Un ejemplo de esto se muestra en el **Ejemplo 1**.

Alternativamente, la presente invención puede usarse para notificar cambios en el patrón de marcadores de epítopes en una población de células tras el tratamiento con un factor o agente farmacéutico. Un ejemplo de esto se muestra en el **Ejemplo 2**. Alternativamente, la presente invención puede usarse para notificar cambios en el patrón de marcadores de epítopes entre poblaciones de células. Un ejemplo de esto se muestra en el **Ejemplo 3**.

En una realización, la presente invención también puede notificar cambios en el patrón de marcadores de epítopes en poblaciones de células en sangre completa. Las poblaciones celulares pueden ser de una muestra de sangre de un paciente. Alternativamente, pueden usarse muestras de más de un paciente.

Los procedimientos de la presente invención pueden emplearse para analizar una muestra o, alternativamente, más de una muestra. En una realización, puede realizarse el análisis de alto rendimiento de un número grande de muestras. Las etapas del procedimiento de la presente invención pueden realizarse manualmente. Alternativamente, al menos una de las etapas puede estar automatizada. Pueden hacerse múltiples copias de una placa con un reactivo marcador fenotípico y usarse para el análisis de muestras.

El análisis de las muestras puede realizarse mediante cualquier plataforma adecuada conocida por los expertos en la técnica. Entre estas plataformas pueden incluirse, por ejemplo, un equipo de citometría de flujo, un equipo de espectrometría de masas o un microscopio de fluorescencia y similares.

Los equipos de citometría de flujo dependen del flujo de células u otras partículas en una corriente de flujo líquido para determinar una o más características de las células estudiadas. Adicionalmente, el equipo de citometría de flujo es útil para identificar la presencia de determinadas células o partículas de interés, para la enumeración de estas células o partículas y, en determinadas circunstancias, para proporcionar una capacidad de clasificación de modo que se puedan recoger aquellas células o partículas de interés. En un equipo de citometría de flujo típico, una muestra líquida que contiene células es dirigida a través del equipo de citometría de flujo en una corriente líquida que se mueve rápidamente de modo que cada célula pasa de forma seriada, y básicamente una cada vez, a través de una región de detección. El volumen celular puede determinarse mediante los cambios en la impedancia eléctrica cada vez que una célula pasa a través de la región de detección. De forma similar, si se dirige un haz de luz incidente a la región de detección, las células en paso dispersan dicha luz mientras que pasan a su través. Esta luz dispersada sirve como función de la forma y tamaño de la célula, índice de refracción, opacidad, rugosidad y similares. Adicionalmente, la fluorescencia emitida por las células marcadas, o células fluorescentes, que se han excitado como resultado de su paso a través de la energía de excitación del rayo de luz incidente es detectable para la identificación de las células que tienen propiedades fluorescentes. Después de realizar el análisis de las células mediante el equipo de citometría de flujo, pueden separarse aquellas células que se han identificado como poseedoras de las propiedades deseadas si el equipo se ha diseñado con esta capacidad.

En las patentes de EE. UU. N° 3.826.364 y 4.284.412 y en la publicación de Herzenberg y col., "Fluorescence-activated Cell Sorting," Sci. Am. 234 (3):108, 1976 se describen equipos de citometría de flujo representativos.

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero sin limitaciones, mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: control de calidad, criterios de liberación

Preparación de placas originales: se diseñó un molde de anticuerpo para controlar los cambios de expresión a lo largo de una amplia selección de epítopes para establecer la consistencia del producto celular entre la producción y las series de expansión. Los anticuerpos se seleccionaron y dispensaron dentro de una placa multipocillo según la distribución de la Tabla 2. Los anticuerpos se obtuvieron a partir de las fuentes mostradas en la Tabla 1. Los anticuerpos se diluyeron en PBS en una placa original de 96 pocillos y se conservaron en un frigorífico antes de su análisis. Para cada ensayo se transfirieron 10 µl de la solución original de anticuerpos de la placa original a una nueva placa de 96 pocillos de modo que se creó una copia. La selección contenía anticuerpos marcados con fluoresceína ficoeritrina frente a un marcador específico por pocillo. Esto eliminaba la necesidad de compensación de la máquina, simplificaba el ensayo y reducía el sesgo por operador. Además, el protocolo de tinción se diseñó para minimizar el número de células necesarias para el ensayo y eliminar etapas, como la de lavado, que pueden causar errores.

Ensayo: se descongeló un vial de células, se lavó y finalmente se diluyó a 2×10^5 células por ml en PBS y se transfirieron 100 µl a cada pocillo (20.000 células/pocillo) que contenía los anticuerpos diluidos. La placa se incubó durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón de fijación (Cytofix BD, N° de catálogo 554655) y se dejó durante 15 minutos. Se estableció en modo análisis un equipo FACSCalibur con un sistema de alto rendimiento y se adquirieron 10.000 acontecimientos por pocillo.

Análisis de los datos: en este estudio, los datos adquiridos se exportaron a un programa de análisis de software y se evaluó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada pocillo de muestra. La IMF de la muestra no teñida se sustrajo de cada IMF de la muestra y se dibujó esta IMF delta para cada epítope. Esto se repitió ocho veces en

experimentos independientes creando un patrón de expresión medio para nuestro producto celular.

Resultados: las células obtenidas de series de producción/expansión diferentes se tiñeron de forma rutinaria usando la selección de la placa de 96 pocillos, se dibujo la IMF y se comparó frente al patrón de marcadores de epítopes obtenidos del material de muestra de estado fenotípico conocido. Los resultados se muestran en la Figura 2.

5 **Ejemplo 2: comparación de reactivos de disociación**

Procedimiento: los procedimientos y el panel de reactivos utilizados para este ensayo son los mismos que los descritos en el **Ejemplo 1**. Las células se crecieron en 3 frascas de cultivo independientes en condiciones idénticas. Estos cultivos se recogieron cada uno con una mezcla de enzimas de disociación diferente. Las células se tiñeron a continuación usando el procedimiento de 96 pocillos y se determinó la intensidad media de fluorescencia para cada parámetro que se comparó con el patrón de marcadores de epítopes obtenido del material de muestra del estado fenotípico conocido.

Resultados: cada mezcla de enzimas mostró resultados diferentes cuando se comparó con el patrón de los marcadores de epítopes obtenido a partir del material de muestra del estado fenotípico conocido. La mezcla C (Acutasa) parece afectar a la expresión de un determinado marcador fenotípico más que las mezclas patrones A (Tripsina) y B (TriplE). Por ejemplo, el marcador de adhesión CD49f y la molécula de señalización CD63 muestran niveles de expresión bajos tras el procedimiento de recogida, lo que puede afectar a la función del producto celular. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Conclusión: este procedimiento permite una evaluación rápida de una amplia selección de proteínas expresadas sobre la superficie celular. Los cambios en el estado fenotípico que pueden ocurrir tras el tratamiento con enzimas pueden evaluarse fácilmente mediante este procedimiento. La disponibilidad de una placa original permite una evaluación rápida de los cambios fenotípicos a través de una amplia selección de marcadores fenotípicos debido al tratamiento de las células.

Ejemplo 3: comparación de estado fenotípico de dos poblaciones celulares diferenciadas

Procedimiento: los procedimientos y el panel de reactivos utilizados para esta prueba fueron los mismos que los descritos en el **Ejemplo 1**. En este ensayo, se probaron los niveles de expresión mediante la placa original en un cultivo celular homogéneo diferente. El cultivo celular de interés se creció hasta la confluencia y se recogió según nuestro protocolo convencional. A continuación, ambos cultivos celulares se tiñeron en la placa original de 96 pocillos y se analizaron según los procedimientos descritos anteriormente. Se comparó el estado fenotípico de las poblaciones celulares y se identificaron las diferencias claves.

Resultados: los dos tipos celulares tienen niveles de expresión similares para la mayoría de los epítopes excepto, por ejemplo, CD11a y CD54. Estos epítopes se expresaban de forma diferencial. Seleccionamos un punto de corte arbitrario para una significancia a una delta de 25 IMF comparada con el material de muestra del estado fenotípico conocido. Los resultados se muestran en la **Figura 4**.

Conclusión: hemos demostrado diferencias de expresión entre dos tipos celulares de nuestro panel. Estas diferencias pueden explorarse adicionalmente y pueden convertirse en puntos de partida importantes de una investigación adicional, especialmente si los cambios en el marcador fenotípico pueden ligarse a diferencias de eficacia *in vivo*.

Ejemplo 4: análisis fenotípico de la sangre completa

Procedimiento: los procedimientos y el panel de reactivo utilizados para esta ensayo fueron los mismos a los descritos en el **Ejemplo 1**. Se obtuvo sangre periférica heparinizada a partir de voluntarios sanos y se aislaron los leucocitos. Los leucocitos se lavaron y resuspendieron en PBS y se transfirieron a la placa de marcaje de 96 pocillos (50.000 células por pocillo) y se adquirieron los datos según el protocolo convencional. Sin embargo, el análisis de datos es diferente puesto que la muestra contiene poblaciones celulares múltiples, cada una con su patrón de expresión específico para cada epítope. El análisis de las células como un todo puede oscurecer estos efectos. Por tanto, se seleccionaron tres poblaciones principales en función del tamaño y granularidad, y en cada una se analizó el porcentaje de acontecimientos positivos dentro de la puerta y los niveles de expresión de cada epítope probado (**Figura 5 A, B y C**).

Resultados: Usando la plataforma de 96 pocillos, somos capaces de evaluar rápidamente los niveles de expresión de nuestra selección de epítopes para tres poblaciones diferenciadas en sangre periférica (**Figura 5**).

Conclusión: la placa de 96 pocillos también puede usarse para una población celular heterogénea. Sin embargo, el procesamiento y la minería de los datos se hacen significativamente más complejos. Están en desarrollo novedosos procedimientos de análisis para simplificar el análisis, lo que es especialmente importante cuando este procedimiento se expande a citometría de flujo de color múltiple. Este procedimiento puede usarse para determinar el patrón de marcadores de epítopes en muestras de sangre periférica fácilmente accesibles para individuos sanos (fenotipo no enfermo) y esto se usa como un comparador para los citomas obtenidos de individuos con una

enfermedad en particular. Las diferencias pueden explotarse para, pero sin limitaciones, el desarrollo de procedimientos diagnósticos, la determinación de la eficacia del fármaco y la selección de los regímenes de tratamiento.

Tabla 1: descripción de los marcadores fenotípicos

Identificación del CD	MOLÉCULA	Nombre del gen	Fluorescencia	Compañía
CD3	Receptor del antígeno de la célula T/CD3 (TCR)	CD3G/Z	PE	Caltag
CD4	OKT4, Leu 3a, T4	CD4	PE	BD Pharmingen
CD5	T1, Leu1	CD5	PE	BD Pharmingen
CD7	Leu 9, 3A1, gp40, antígeno de leucemia de células T	CD7	PE	BD Pharmingen
CD8	Receptor de MHC de clase I	CD8	PE	BD Pharmingen
CD9	proteína transmembrana de tipo III (agregación/activación de plaquetas)	CD9	PE	BD Pharmingen
CD10	CALLA, metaloendopeptidasa de membrana	MME	PE	BD Pharmingen
CD11a	alfaL; LFA-1, gp180/95	ITGAL	PE	BD Pharmingen
CD13	Amino peptidasa N, APN, gp150, EC 3.4.11.2	ANPEP	PE	BD Pharmingen
CD15	Fucosiltransferasa 4 (alfa (1,3) fucosiltransferasa, específica de línea mieloide)	FUT4	PE	BD Pharmingen
CD16	R Fc gamma III	FCGR3A	PE	Caltag
CD16a	R Fc gamma IIIa	FCGR3A	PE	BD Pharmingen
CD18	Cadena β 2 de integrina, antígeno de macrófago 1 (mac-1)	ITGB2	PE	BD Pharmingen
CD19	B4, asociado con CD21, CD81, CD225, Leu-13, Lyn, Fyn, Vav, P13-quinasa	CD19	PE	BD Pharmingen
CD20	4 dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1	MS4A1	PE	BD Pharmingen
CD21	Receptor de C3d, CR2, gp140; receptor de EBV	CR2	PE	BD Pharmingen
CD22	Bgp135; BL-CAM, Siglec2	CD22	FITC	BD Pharmingen
CD25	Receptor de interleuquina-2 (IL-2R, respuesta inflamatoria)	IL2RA	PE	BD Pharmingen
CD29	Cadena β 1 de integrina; GPIIa de plaquetas; cadena beta de VLA (CD49)	ITGB1	PE	BD Pharmingen

ES 2 362 671 T3

CD30	Miembro 8 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral. KI-1	TNFRSF8	PE	BD Pharmingen
CD31	PECAM-1; GPIIa de plaquetas; endocam	PECAM1	PE	BD Pharmingen
CD32	Receptor Fcgamma de tipo II (FcγRII), gp40	FCGR2A	PE	BD Pharmingen
CD33	gp67	CD33	PE	BD Pharmingen
CD34	My10, gp105-120	CD34	PE	BD Pharmingen
CD35	Receptor de C3b/C4b; receptor de complemento de tipo 1 (CR1)	CR1	PE	BD Pharmingen
CD36	GPIV, GPIIb de plaquetas, antígeno OKM-5	CD36	PE	BD Pharmingen
CD38	T10; gp45, ADP-ribosil ciclasa	CD38	PE	BD Pharmingen
CD40	Bp50, Receptor 5 de TNF	TNFRSF5	PE	BD Pharmingen
CD44	Pgp-1; gp80-95, antígeno Hermes, ECMR-III y HUTCH-I.	CD44	PE	BD Pharmingen
CD45	LCA, B220, proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, C	PTPRC	PE	BD Pharmingen
CD49a	Cadena a1 de integrina, antígeno muy tardío, VLA 1a	ITGA1	PE	BD Pharmingen
CD49b	Cadena a2 de integrina, cadena alfa de VLA-2, gplc de plaquetas	ITGA2	PE	BD Pharmingen
CD49c	Cadena a3 de integrina, cadena alfa de VLA-3	ITGA3	PE	BD Pharmingen
CD49d	Cadena a4 de integrina, cadena alfa de VLA-4	ITGA4	PE	BD Pharmingen
CD49e	Cadena a5 de integrina, cadena alfa de VLA-5	ITGA5	PE	BD Pharmingen
CD49f	Cadena a6 de integrina, cadena alfa de VLA-6, gplc de plaquetas	ITGA6	PE	BD Pharmingen
CD50	ICAM-3, molécula de adhesión intercelular 3	ICAM3	fitc	BD Pharmingen
CD51	Cadena alfa de integrina, cadena a del receptor de vitronectina	ITGAV	PE	BD Pharmingen
CD54	ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1	ICAM1	PE	BD Pharmingen
CD55	Factor de aceleración de descomposición (DAF, previene el daño celular)	DAF	PE	BD Pharmingen
CD56	Molécula de adhesión de célula neural 1 (NCAM1), NKH-1 (marcador de	NCAM1	PE	Caltag

ES 2 362 671 T3

	células NK)			
CD58	Antígeno 3 asociado con la función linfocitaria (LFA-3, interacciona con CD2 durante la adhesión celular)	CD58	PE	BD Pharmingen
CD59	MACIF, MIRL, P-18, protectina	CD59	PE	BD Pharmingen
CD61	Glicoproteína IIIa, beta3 integrina	ITGB3	PE	BD Pharmingen
CD62E	E-selectina, LECAM-2, ELAM-1	SELE	PE	BD Pharmingen
CD62L	L-selectina, LAM-1, Mel-14	SELL	PE	Caltag
CD62P	P-selectina, proteína de membrana granular-140 (GMP-140)	SELP	PE	BD Pharmingen
CD63	LIMP, gp55, antígeno neuroglandular LAMP-3, granulofisina	CD63	PE	BD Pharmingen
CD64	FcγR1, R1 Fc gamma (receptor de IgG)	FCGR1A	PE	Caltag
CD69	Antígeno de activación de células T más temprano	CD69	PE	BD Pharmingen
CD71	Receptor de transferrina	TFRC	PE	BD Pharmingen
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa	NT5E	PE	BD Pharmingen
CD79a	Antígeno CD79A (alfa asociado con inmunoglobulina), MB1	CD79A	PE	BD Pharmingen
CD79b	Antígeno CD79B (beta asociado con inmunoglobulina), B29	CD79B	PE	BD Pharmingen
CD80	B7-1; BB1	CD80	PE	BD Pharmingen
CD81	Diana de un anticuerpo antiproliferativo (TAPA-1); M38	CD81	PE	BD Pharmingen
CD83	HB15	CD83	PE	BD Pharmingen
CD86	B7-2; B70	CD86	PE	Caltag Laboratories
CD87	Activador de plasminógeno, receptor de uroquinasa (PLAUR), uPAR	PLAUR	PE	BD Pharmingen
CD88	Receptor de C5a	C5R1	PE	BD Pharmingen
CD90	Thy-1	THY1	PE	BD Pharmingen
CD95	APO-1, Fas, TNFRSF6	TNFRSF6	PE	BD Pharmingen
CD100	SEMA4D	SEMA4D	PE	Serotec

ES 2 362 671 T3

CD103	Integrina, alfa E (antígeno 1 de linfocitos de mucosa humana; polipéptido alfa)	ITGAE	PE	BD Pharmingen
CD104	Subunidad beta 4 de integrina, TSP-1180	ITGB4	PE	BD Pharmingen
CD105	Endoglina	ENG	PE	Caltag
CD106	VCAM-1 (molécula de adhesión a la célula vascular 1), INCAM-110	VCAM1	PE	BD Pharmingen
CD114	G-CSFR, HG-CSFR, CSFR3	CSF3R	PE	BD Pharmingen
CD117	SCFR, c-kit, receptor del factor de células madre	KIT	PE	BD Biosciences
CD119	Cadena alfa del receptor de IFN (GIR-208)	IFNGR1	PE	BD Pharmingen
CD120b	TNFR1; TNFRp55	TNFRSF1B	PE	BD Pharmingen
CD126	Cadena alfa del receptor de IL-6	IL6R	PE	BD Pharmingen
CD134	Receptor 4 del factor de necrosis tumoral, OX40 (promueve la expresión de BCL2/BCL-xL)	TNFRSF4	PE	Caltag
CD135	Tirosina quinasa relacionada con fms 3	FLT3	PE	BD Pharmingen
CD140b	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas b(PDGF)	PDGFRB	PE	BD Pharmingen
CD141	Trombomodulina (TM), fetomodulina	THBD	PE	BD Pharmingen
CD142	Factor tisular, tromboplastina, factor de coagulación III	F3	PE	BD Pharmingen
CD146	Muc 18, MCAM, Mel-CAM, s-endo	MCAM	PE	BD Pharmingen
CD147	Basigina, M6, inductor de metaloproteinasas extracelular (EMMPRIN)	BSG	PE	Serotec
CD151	Antígeno tetraspanina endotelial plaqueta (PETA)-3	CD151	PE	BD Pharmingen
CD152	Antígeno asociado a linfocitos T citolíticos (CTLA-4)	CTLA4	PE	BD Pharmingen
CD163	M130, GHI/61, RM3/1	CD163	PE	BD Pharmingen
CD164	MUC-24, MGC 24, proteína central multiglucosilada 24	CD164	PE	BD Pharmingen
CD165	AD2, gp 37		PE	BD Pharmingen
CD178	Ligando de FAS, ligando de CD95	TNFSF6	PE	Caltag Laboratories

ES 2 362 671 T3

CD181	CXCR1 CDw128a: receptor alfa de IL-8,	IL8RA	PE	BD Pharmingen
CD182	CXCR2	IL8RB	PE	BD Pharmingen
CD183	Receptor de quimiocina CXCR3, receptor 9 conjugado a proteína	CXCR3	PE	BD Pharmingen
CD184	Receptor de quimiocina CXCR4, Fusina	CXCR4	PE	BD Pharmingen
CD200	OX2 (regula la actividad de Mf)	CD200	PE	BD Pharmingen
CD273	B7DC, PDL2	PDCD1 LG2	PE	BD Pharmingen
CD274	B7H1, PDL1	PDCD1LG1	PE	BD Pharmingen
CD275	B7H2, ICOSL	ICOSL		
CD276	B7H3	N/A		
CD277	BT3.1	BTN3A1		
CD278	ICOS	ICOS		
CD279	PD1	PDCD1		
CD280	ENDO180	MRC2		
CD281	TLR1	TLR1		
CD282	TLR2	TLR2		
CD283	TLR3	TLR3		
CD284	TLR4	TLR4		
CD289	TLR9	TLR9		
CD292	BMPR1A	BMPR1A		
CDw293	BMPR1B	BMPR1B		
CD294	CRTH2	GPR44		
CD295	LeptinaR	LEPR		
CD296	ART1	ART1		
CD297	ART4	DO		
CD298	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa b3	ATP1B3		
CD299	Relacionado con DCSIGN	CD209L		
CD300a	CMRF35H			
CD300c	CMRF35A			
CD300e	CMRF35L1			
CD301	MGL, CLECSF14	CLECSF14		
CD302	DCL1	N/A		

ES 2 362 671 T3

CD303	BDCA2	CLECSF7		
CD304	BDCA4, Neuropilina 1	NRP1		
CD305	LAIR1	LAIR1		
CD306	LAIR2	LAIR2		
CD307	IRTA2	N/A		
CD309	VEGFR2, KDR	KDR		
CD312	EMR2	EMR2		
CD314	NKG2D	KLRK1		
CD315	CD9P1	PTGFRN		
CD316	EWI2	IGSF8		
CD317	BST2	BST2		
CD318	CDCP1	N/A		
CD319	CRACC	SLAMF7		
CD320	8D6A	N/A		
CD321	JAM1	F11R		
CD322	JAM2	JAM2		
CD324	Cadherina E	CDH1		
CDw325	Cadherina N	CDH2		
CD326	Ep-CAM	TACSTD1		
CDw327	siglec6	SIGLEC6		
CDw328	siglec7	SIGLEC7		
CDw329	siglec9	SIGLEC9		
CD331	FGFR1	FGFR1		
CD332	FGFR2	FGFR2		
CD333	FGFR3	FGFR3		
CD334	FGFR4	FGFR4		
CD335	NKp46	NCR1		
CD336	NKp44	NCR2		
CD337	NKp30	NCR3		
CDw338	ABCG2, BCRP	ABCG2		
CD339	Jagged-1	JAG1		
ABCG2				
Fosfatasa alcalina				
BCL-xL	Similar a BCL2-1	BCL2L1	PE	Chemicon
bCL-2	LLC de linfocitos B /linfoma-2	BCL2	PE	BD

				Pharmingen
CK 5	Citoqueratina 5			
CK 6	Citoqueratina 6			
CK 7	Citoqueratina 7			
CK 8	Citoqueratina 8			
CK 10	Citoqueratina 10			
CK 13	Citoqueratina 13			
CK 14	Citoqueratina 14			
CK 15	Citoqueratina 15			
CK 16	Citoqueratina 16			
CK 18	Citoqueratina 18			
CK 19	Citoqueratina 19			
EGFr	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (crecimiento y diferenciación)	EGFR	PE	BD PharMingen
HGF-R	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos	HGFR		
NGFr	NGFR (p75)	NGFR	PE	BD Pharmingen
RANTES	Ligando 5 de CCL5 (quimiocina (motivo C-C))	CCL5	PE	Caltag
b2-microglobulina	Se asocia con el complejo antígeno HLA de clase I	B2M	PE	BD Pharmingen
HLA-ABC	MHC de clase I ABC		PE	BD Pharmingen
HLA-DP	MHC II HLA-DP beta-1	HLA-DPB1	PE	Serotec
HLA DR			PE	BD Pharmingen
SSEA-1	Antígeno embrionarios de células madres 1	SSEA1		
SSEA-3	Antígeno embrionarios de células madres 3	SSEA3		
SSEA-4	Antígeno embrionarios de células madres 4	SSEA4		

Tabla 2: placa de selección de marcadores fenotípicos de células madre de la invención

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sin teñir	CD9	CD10	CD11a	CD13	CD14	CD16					
B	CD18	CD25	CD29	CD31	CD32	CD34	CD35	CD36	CD40	CD44	CD45	CD49a
C	CD49b	CD49c	CD49d	CD49e	CD49f	CD51	CD54	CD55	CD58	CD59	CD61	CD62E
D	CD62L	CD62P	CD63	CD64	CD71	CD73	CD80	CD81	CD86	CD90	CD95	CD100
E	CD104	CD105	CD106	CD117	CD119	CD120a	CD126	CD134	CD140a	CD140b	CD141	CD142
F	CD146	CD147	CD178	CD181	CD182	CD183	CD184	CD200	CD273	CD274	β2-microglobulina	HLA-ABC
G	HLA-DP	EGFR	NGFR	RANTES	CD3	CD4	CD7	CD15	CD19	CD20	CD21	CD22
H	CD38	CD50	CD62L	CD83	CD88	CD112	CD114	CD151	CD164	CD165	CD172	HLA-DR

Tabla 3. Ejemplo de placa de selección de marcadores fenotípicos de oncología

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sin teñir	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD9					
B	CD10	CD11a	CD13	CD14	CD15	CD16	CD18	CD19	CD20	CD22	CD25	CD29
C	CD30	CD31	CD32	CD33	CD34	CD35	CD36	CD38	CD40	CD44	CD45	CD49a
D	CD49b	CD49c	CD49d	CD49e	CD49f	CD51	CD54	CD55	CD56	CD58	CD59	CD61
E	CD62E	CD62L	CD62P	CD63	CD64	CD69	CD71	CD73	CD79a	CD79b	CD80	CD81
F	CD86	CD87	CD90	CD95	CD100	CD103	CD104	CD105	CD106	CD117	CD119	CD120a
G	CD126	CD134	CD135	CD140a	CD140b	CD141	CD142	CD146	CD147	CD152	CD163	CD178
H	CD181	CD182	CD183	CD184	CD200	CD273	CD274	β2-microglobulina	EGFR	HLA-ABC	HLA-1 (DP)	RANTES

REIVINDICACIONES

1. - Un kit que comprende una placa multipocillo que contiene anticuerpos liofilizados o configurados de otra forma para un transporte y conservación convenientes, en el que los anticuerpos son para detectar el panel de marcadores de fenotipo descritos en la Tabla 2.
- 5 2. - Un kit para comparar el estado fenotípico de un primer material de muestra desconocido con un material de muestra de un estado fenotípico conocido que comprende:
 - a. el panel de marcadores fenotípicos descritos en la Tabla 2 y
 - b. anticuerpos para detectar la presencia de los marcadores fenotípicos de la Tabla 2 en un material de muestra.
- 10 3. - El kit de la reivindicación 1 o 2 en el que los anticuerpos son anticuerpos liofilizados.
4. - El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que los anticuerpos están marcados con un marcador fluorescente.
5. - Un procedimiento para comparar el estado fenotípico de un primer material de muestra desconocido con un material de muestra de un estado fenotípico conocido que comprende las etapas de:
 - 15 a. Obtener un primer material de muestra desconocido y;
 - b. Poner en contacto el primer material de muestra desconocido con anticuerpos para detectar la presencia de los marcadores fenotípicos del panel descrito en la Tabla 2 en el primer material de la muestra desconocido y
 - c. Registrar la presencia de marcadores fenotípicos en el primer material de muestra desconocido y;
 - 20 d. Obtener un material de muestra de un estado fenotípico conocido y
 - e. Poner en contacto el material de muestra de un estado fenotípico conocido con dichos reactivos para detectar la presencia de dicho panel de marcadores fenotípicos de la Tabla 2 en el material de muestra de un estado fenotípico conocido y
 - 25 f. Registrar la presencia de marcadores fenotípicos en el material de muestra de un estado fenotípico conocido y
 - g. Notificar las diferencias entre el material de muestra desconocido y el material de muestra de un estado fenotípico conocido.
6. - El procedimiento de la reivindicación 5 para su uso con fines de control de calidad.
- 30 7. - El kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o del procedimiento de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6 en el que el material de muestra son células.

Figura 1:

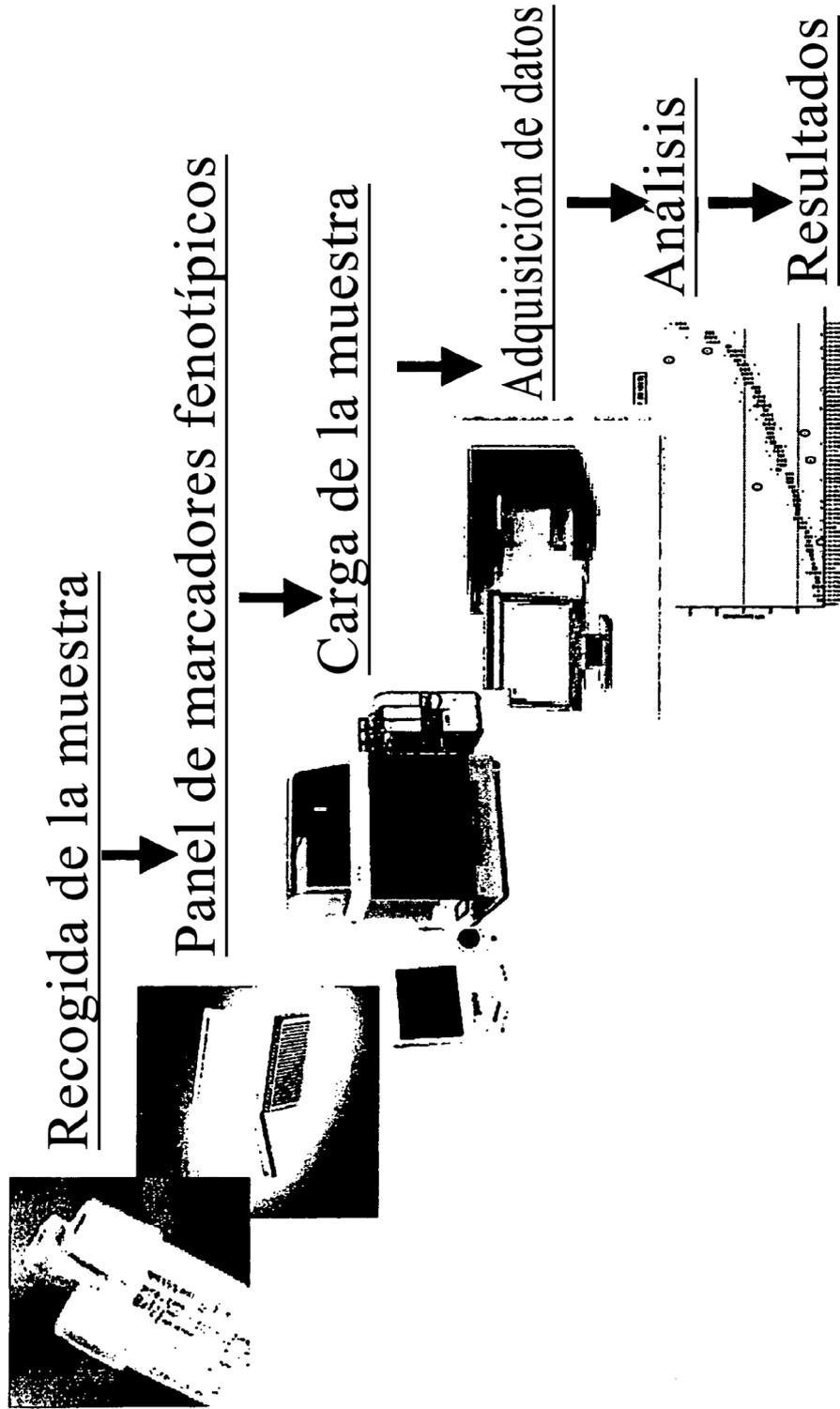


Figura 2:

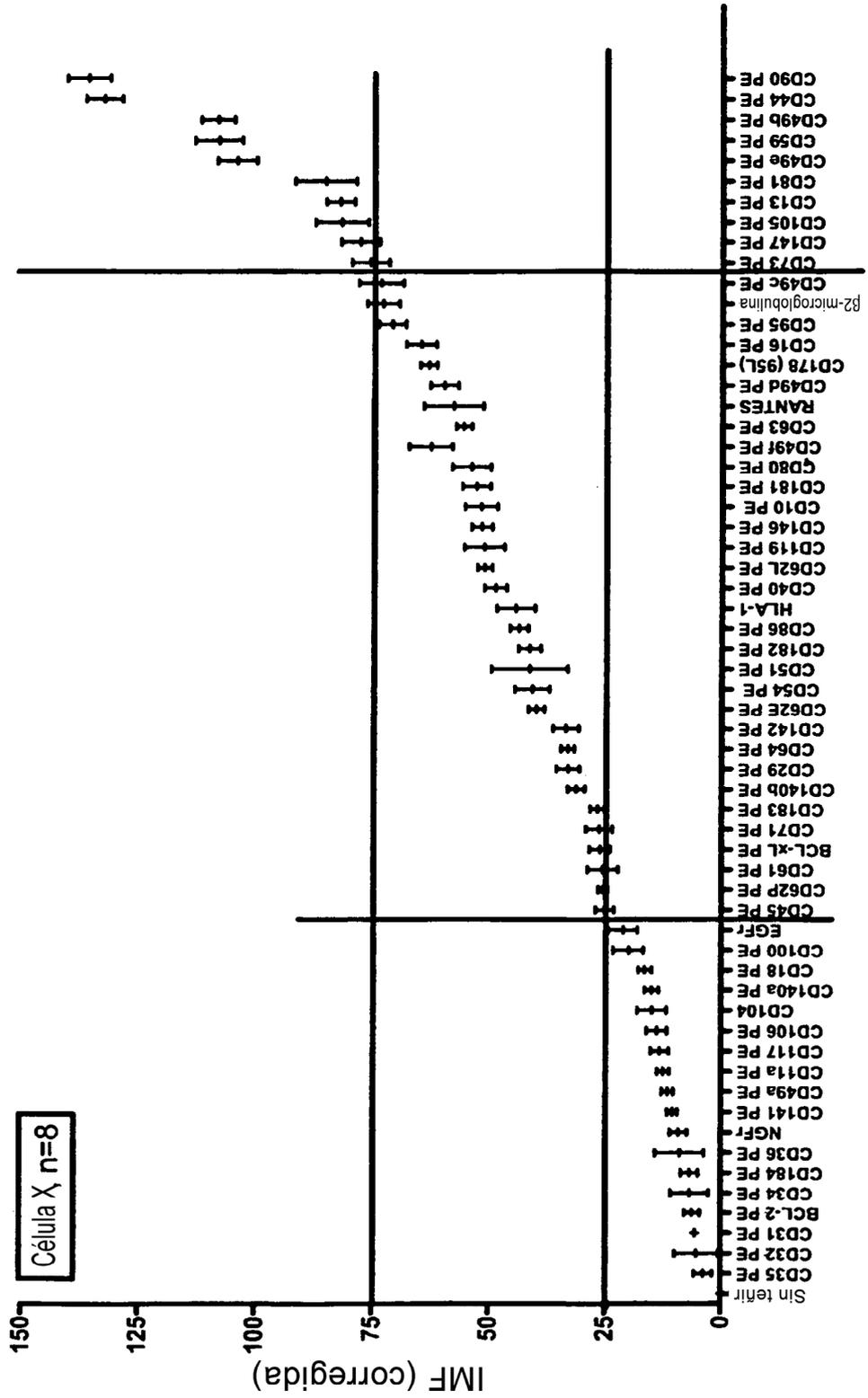


Figura 3
 Comparación de reactivos de disociación

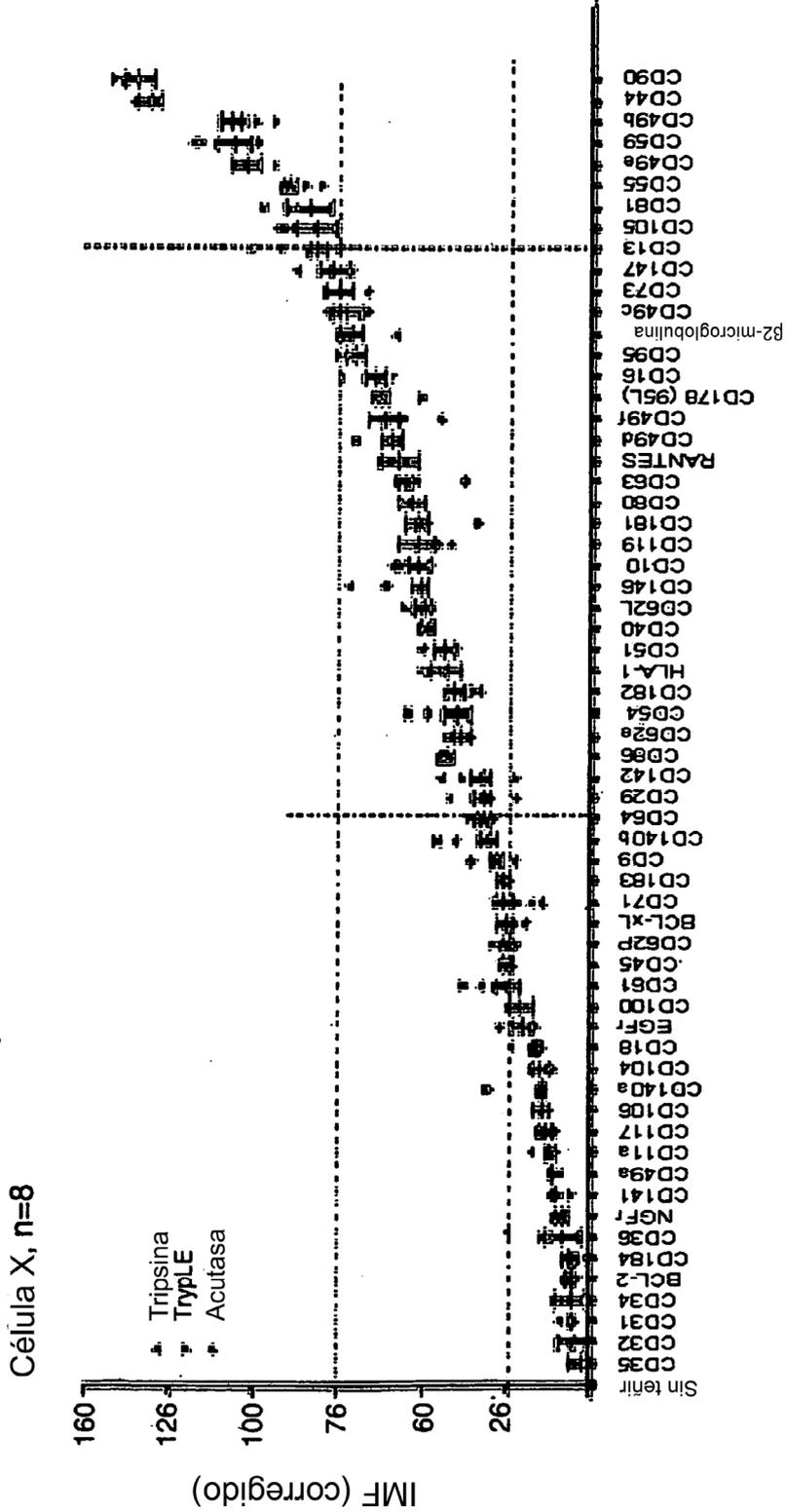


Figura 4:

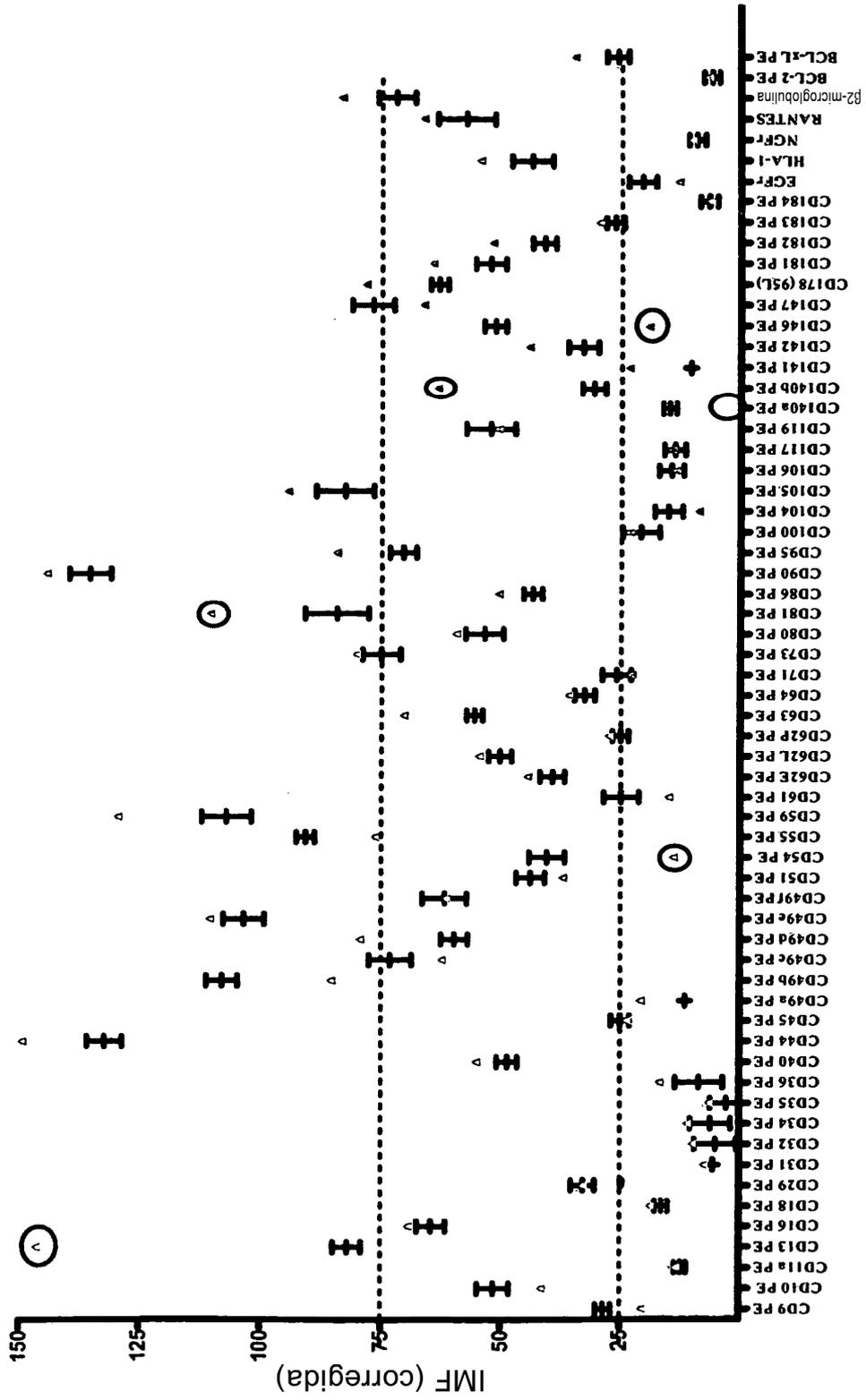


Figura 5A:

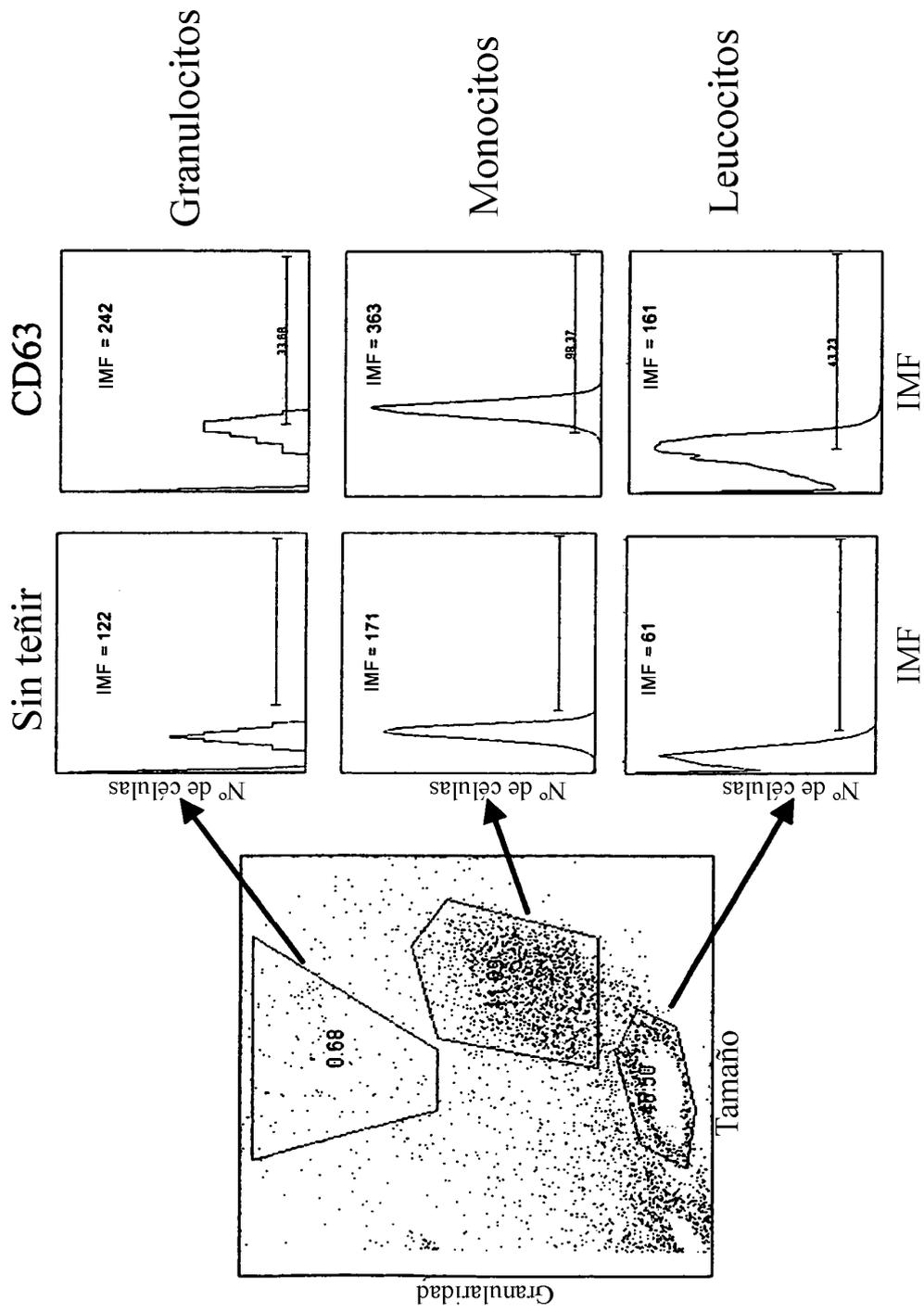


Figura 5B:

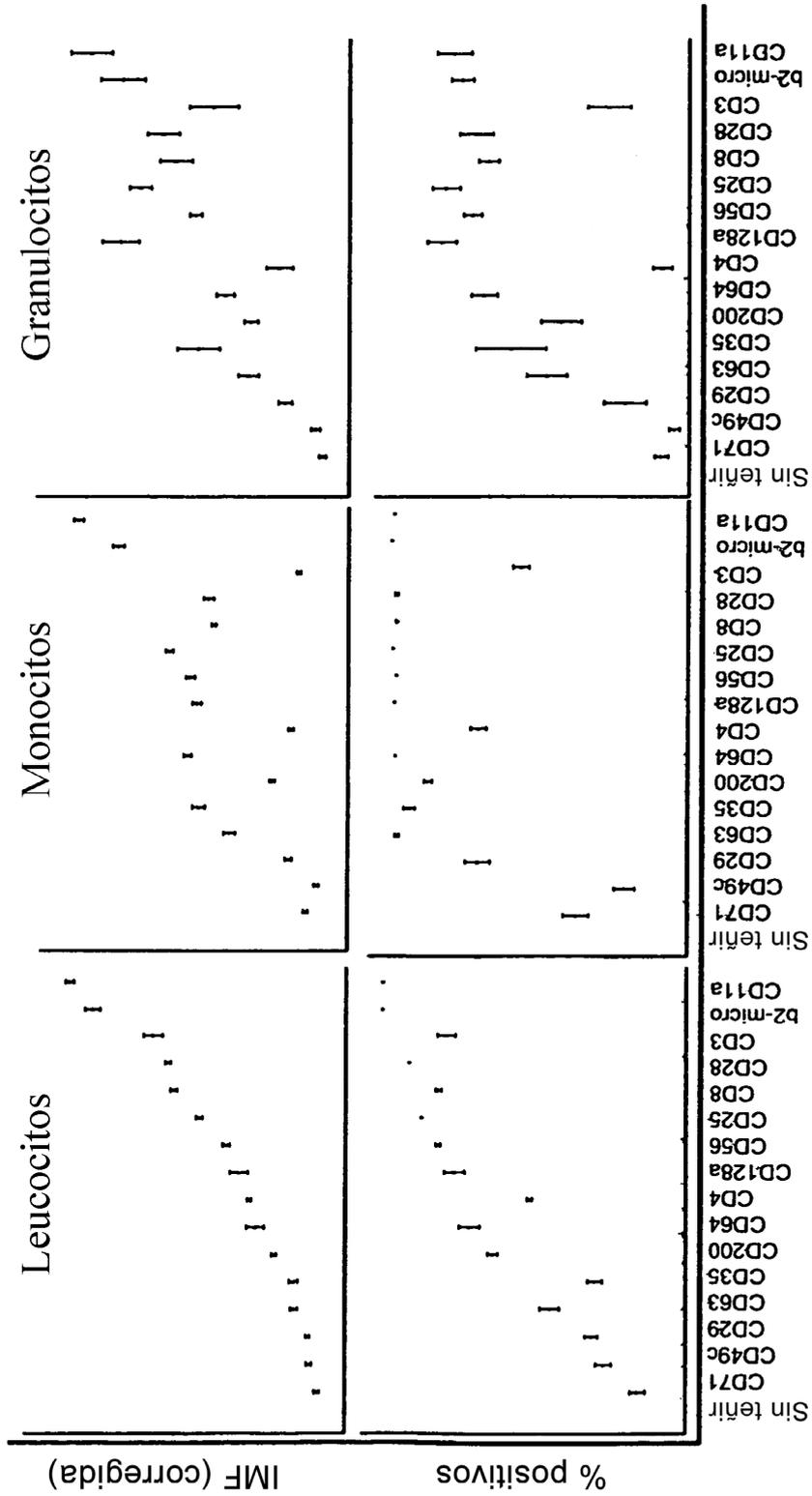


Figura 5C:

