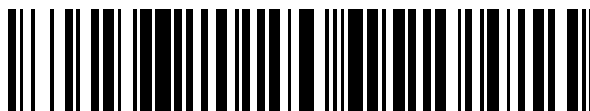


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 620**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/577** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2005 E 05717192 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 1724581**

54 Título: **Método para la detección multidimensional de fenotipos aberrantes en células neoplásicas para su uso para monitorizar niveles mínimos de enfermedad utilizando citometría de flujo**

30 Prioridad:

**03.03.2004 US 791994**

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

**13.11.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)  
Patio de Escuelas, no. 1  
37008 Salamanca, ES**

72 Inventor/es:

**ORFAO DE MATOS CORREIA E VALLE,  
ALBERTO;  
PEDREIRA, CARLOS EDUARDO y  
SOBRAL DA COSTA, ELAINE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 521 620 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

Método para la detección multidimensional de fenotipos aberrantes en células neoplásicas para su uso para monitorizar niveles mínimos de enfermedad utilizando citometría de flujo.

**Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la de la solicitud provisional con N° de serie 60/451,738 presentada el 4 de marzo de 2003.

**Antecedentes de la invención**

**1. Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el campo de la citometría de flujo y más particularmente con la detección secuencial de patrones aberrantes de expresión de proteínas en células neoplásicas y la identificación de números mínimos de células neoplásicas presentes entre una población mayoritaria de células normales en muestras de sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y ganglios linfáticos. La invención posibilita: 1) la identificación inequívoca de los fenotipos aberrantes presentes en células neoplásicas que permita su identificación sensible y específica, 2) la estimación de su utilidad para identificar números mínimos de células neoplásicas que presenten fenotipos aberrantes idénticos a los observados inicialmente en otra muestra del mismo individuo obtenida simultáneamente o posteriormente, y 3) el cálculo de la distribución de células neoplásicas en muestras de sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y ganglios linfáticos, tanto en términos del porcentaje de células como del número de células por microlitro de muestra, a través del análisis multiparamétrico por citometría de flujo de las células presentes en una muestra marcada con múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales mezclados con una suspensión de microperlas (micropartículas) en cantidad conocida.

**2. Antecedentes de la invención**

En la Patente de EE.UU. N° 5.047.321, Loken y Terstappen describen el análisis multiparamétrico de los componentes celulares presentes en un líquido corporal. Los líquidos corporales descritos incluyen sangre y médula ósea. Utilizando una combinación de dos colorantes de ácidos nucleicos, un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia y dos parámetros de dispersión de luz, Loken y Terstappen fueron capaces de distinguir entre varios componentes celulares de sangre y médula ósea, contar el número de células dentro de cada uno de estos componentes y proporcionar un análisis diferencial de cada uno de estos compartimientos celulares. A través de la tinción combinada con el colorante de ADN, LDS-751 (Exciton), con el colorante de ARN, naranja de tiazol (TO, Molecular Probes, Inc) y con un anticuerpo monoclonal anti-CD45 marcado con fluorescencia, junto con la medición de la dispersión frontal y lateral de luz en aspirados de sangre completa y médula ósea, estos autores fueron capaces de identificar y diferenciar entre células eritroides nucleadas, eritrocitos, reticulocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos, granulocitos neutrófilos, granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos y precursores de todas las células nucleadas. Sin embargo, no pudieron demostrar la capacidad de este enfoque para diferenciar específicamente entre células normales y células neoplásicas que coexistan en la misma muestra.

En la Patente de EE.UU. N° 6.287.791, Terstappen y Chen describen con más detalle algunos aspectos de la Patente de EE.UU. N° 5.047.321, pero no demostraron ninguna caracterización mejor de las distintas poblaciones de leucocitos.

En la Patente de EE.UU. N° 5.137.809, Loken y Sha describen el análisis multiparamétrico de componentes celulares en la médula ósea. En una primera etapa, los autores describen el uso de una combinación de anticuerpos monoclonales marcados, cada uno de ellos, con un fluorocromo distinto, para teñir todos los leucocitos y, en una segunda etapa, combinaciones adicionales para teñir poblaciones de leucocitos seleccionadas.

Todos los métodos descritos anteriormente fueron capaces de identificar varias poblaciones de leucocitos normales en muestras de sangre y médula ósea e identificaron solamente las subpoblaciones seleccionadas, tal y como se identifican por medio de la combinación específica de anticuerpos monoclonales y colorantes de ácidos nucleicos usados; sin embargo, no fueron capaces de ofrecer un enfoque para la identificación específica y reproducible de células neoplásicas mezcladas en una muestra de forma natural o artificialmente con células normales. Además estos enfoques permiten la enumeración de las subpoblaciones de leucocitos normales identificadas en cuanto al porcentaje de leucocitos totales. Por otra parte, el uso de estos métodos no permite relacionar fácilmente ni comparar directamente la información sobre la cantidad de luz dispersada y de fluorescencia medidas para las células contenidas en una primera muestra con las de las células contenidas en una segunda muestra diferente, especialmente si estas provienen de tejidos distintos del mismo individuo, de individuos distintos o si se han medido en condiciones distintas.

En la Patente de EE.UU. N° 5.627.037, Ward et al proponen una técnica en una sola etapa para calcular el número de una o más poblaciones de células que se encuentran en un volumen conocido de una muestra de sangre. Este

enfoque emplea una mezcla de reactivos que contiene una mezcla de uno o más marcadores celulares, una micropartícula cuantificada por fluorescencia y un fijador. La técnica descrita por Ward et al permite calcular los recuentos absolutos de leucocitos, tales como células T CD4+, pero no ofrece ninguna indicación específica sobre el procedimiento exacto a aplicar para la enumeración de subpoblaciones individuales de leucocitos de sangre.

5 En la última década se han publicado muchos estudios que demuestran que las células neoplásicas de una gran mayoría de pacientes que padecen enfermedades hematológicas malignas muestran patrones aberrantes de expresión de antígenos detectables mediante el uso de diferentes combinaciones triples y cuádruples de anticuerpos monoclonales analizadas mediante citometría de flujo (Revisado en Vidriales et al. Best Clin Res Pract, 2003; 10 16:599-612). Estos patrones anómalos de expresión de antígenos nunca se detectan en células normales e incluyen uno o más de los siguientes subtipos: 1) expresión de antígenos en linajes cruzados, 2) expresión asincrónica de antígenos, 3) sobreexpresión e infraexpresión de antígenos, 4) propiedades de dispersión de luz anormalmente elevadas o bajas, y 5) fenotipos ectópicos. Basándose en estas anomalías se han propuesto varios paneles específicos del tipo de enfermedad de combinaciones de reactivos de anticuerpos monoclonales de tres y cuatro 15 colores, para así poder identificar de forma sistemática células leucémicas que expresen fenotipos aberrantes, en prácticamente cualquier paciente con leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (LLA-CBP; Lucio et al, Leukemia, 2001; 15: 1185-1192), LLA-T (Porwit-MacDonaid, Leukemia, 2000; 14: 816-825), leucemia mieloblástica aguda (LMA; San Miguel et al, Blood, 2001; 98: 1746-1751), leucemia linfocítica crónica de células B (Rawstrom et al, Blood, 2001; 98: 29-35) y otros trastornos linfoproliferativos crónicos de células B (Sánchez et al, Leukemia, 2002; 20 16: 1460-1469), entre otras enfermedades.

En todos los enfoques descritos hasta ahora para la identificación de fenotipos aberrantes expresados por células neoplásicas, la interpretación de los resultados la realiza una persona experimentada, con amplio conocimiento de los patrones de expresión de proteínas en células normales. Mediante este enfoque se ha demostrado que las 25 células neoplásicas de pacientes estudiados en el momento del diagnóstico y en el momento de la recaída, habitualmente muestran más de un fenotipo aberrante, especialmente si se emplean para su identificación paneles relativamente amplios de combinaciones triples y cuádruples de anticuerpos monoclonales. Basándonos en todos los fenotipos aberrantes detectados en el diagnóstico, se diseñan y prueban nuevas combinaciones, en 3 o 4 colores, de anticuerpos monoclonales para la investigación de forma específica de estos fenotipos específicos de las 30 células neoplásicas para su uso posterior en la búsqueda de la infiltración mínima por células neoplásicas en otras muestras que se obtengan simultáneamente (por ejemplo, por razones de estadificación) o a posteriori (por ejemplo, para monitorizar la enfermedad y la terapia). Sin embargo, la necesidad de que los resultados sean interpretados por una persona experta con amplio conocimiento y experiencia de los patrones diferenciales de expresión de proteínas observadas entre células normales y neoplásicas, hace que la identificación de fenotipos aberrantes sea subjetiva y difícil de reproducir. Además, muchos de estos fenotipos aberrantes solo están presentes en un subconjunto de todas las células leucémicas presentes en una muestra concreta y pueden cambiar en el mismo paciente, e incluso con el tiempo, en otra muestra del mismo tejido. Además esto hace que la identificación de fenotipos aberrantes, además de subjetiva, sea imprecisa, con la posibilidad de que ocurran resultados falsos negativos y positivos. Además, los conocimientos actuales sobre los fenotipos de células normales de sangre, médula ósea, líquido 40 cefalorraquídeo y ganglios linfáticos presentes en frecuencias menores a  $10^{-4}$  son muy limitados; esto tiene un impacto negativo en la sensibilidad de estos enfoques para detectar números mínimos de células neoplásicas entre una mayoría de células normales de sangre y médula ósea que actualmente, en las mejores condiciones técnicas y biológicas, esta se sitúa entre  $10^{-3}$  (detección de una célula neoplásica entre 1000 células normales) y  $10^{-6}$  (una célula neoplásica entre un millón de células normales) dependiendo del linaje, estadio madurativo y tipo concretos de 45 las células neoplásicas, el fenotipo aberrante utilizado para identificar la célula neoplásica y el tipo de espécimen estudiado.

### Descripción de la invención

50 La presente invención se refiere a un nuevo método para mejorar la sensibilidad, la especificidad y la reproducibilidad de la detección de fenotipos aberrantes expresados por células neoplásicas, en el que los fenotipos aberrantes se refieren a patrones de expresión de proteínas en las células neoplásicas que difieren del patrón de las células normales o reactivas no neoplásicas, presentes en médula ósea, sangre periférica, líquido cefalorraquídeo y ganglios linfáticos.

55 La invención comprende las etapas de: 1) teñir por separado una o más muestras normales/reactivas y una población de micropartículas de referencia y una muestra neoplásica y una población de micropartículas de referencia, con múltiples combinaciones idénticas o al menos parcialmente superpuestas de al menos cuatro anticuerpos monoclonales, en las que cada anticuerpo monoclonal de cada combinación está conjugado a un fluorocromo diferente y teniendo en común cada combinación de anticuerpos monoclonales al menos tres anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo, siendo dichos anticuerpos monoclonales capaces de reconocer un antígeno diferente que se expresa en distintas cantidades en las diversas poblaciones de leucocitos y en las poblaciones de células neoplásicas en una muestra, 2) medir secuencialmente al menos dos dispersiones de la luz y al menos cuatro emisiones fluorescentes distintas asociadas con un gran número de células teñidas con 60 cada una de las combinaciones de anticuerpos monoclonales de las muestras normales/reactivas y de la muestra neoplásica, y dichas poblaciones de micropartículas de referencia, empleando citometría de flujo, 3) almacenar dos

archivos de datos en forma de listado independientes, conteniendo cada uno de ellos información obtenida tal y como se describe en la etapa (2) acerca de las características específicas de dispersión de luz y de fluorescencia de cada célula individual y micropartícula de referencia analizada, conteniendo una información correspondiente a las células y la micropartícula de referencia de las muestras normales/reactivas y conteniendo el otro información correspondiente a las células de la muestra tumoral y sus micropartículas de referencia, 4) crear nuevos archivos de datos combinando, en proporciones conocidas, los datos en forma de listado de los eventos celulares y los eventos de micropartículas de referencia del archivo de datos que contiene información de la luz dispersada y de la fluorescencia obtenida tal y como se describe en la etapa (2) acerca de las células y micropartículas de referencia presentes en la muestra neoplásica en el archivo de datos que contiene la información obtenida tal y como se describe en la etapa (2) acerca de las células y micropartículas de referencia presentes en las muestras normales, en el que la información de dos archivos de datos diferentes se fusiona después de ajustar una posición relativa de poblaciones de eventos celulares medidos según las micropartículas de referencia, 5) definir en un espacio multidimensional generado por las mediciones realizadas mediante citometría de flujo de la dispersión de luz y de las emisiones fluorescentes, aquellas áreas ocupadas por eventos correspondientes a células normales y aquellas áreas correspondientes a espacios vacíos en las muestras normales/reactivas y que pueden ser ocupadas por las células tumorales de las muestras neoplásicas, 6) identificar secuencialmente en los nuevos archivos de datos fusionados tal como se describe en la etapa (4) aquellos eventos correspondientes a células neoplásicas y aquellos eventos correspondientes a células normales en un espacio multidimensional generado por las mediciones realizadas mediante citometría de flujo de la luz dispersada y de las emisiones fluorescentes, 7) establecer las aberraciones fenotípicas más relevantes mostradas por las células neoplásicas en comparación con sus equivalentes normales, que permitan la identificación inequívoca y clara, sensible y específica de aquellos eventos correspondientes a células neoplásicas contenidos en el archivo de datos fusionado. Este procedimiento simula experimentos de dilución de células neoplásicas en una muestra normal mediante el uso de procedimientos computacionales y podría emplearse combinando la información bien directamente desde dos o más archivos de datos distintos o bien tras ajustar la posición relativa de las poblaciones de eventos celulares medida según unos patrones preestablecidos.

Tal y como se ha descrito brevemente con anterioridad, la primera etapa del método de esta invención comprende marcar una o más muestras normales/reactivas y una población de micropartículas de referencia, y una muestra neoplásica y población de micropartículas de referencia con múltiples combinaciones de al menos cuatro anticuerpos monoclonales, estando conjugado cada anticuerpo monoclonal en cada combinación con un fluorocromo diferente y teniendo en común cada combinación un subgrupo de al menos tres anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo, siendo dichos anticuerpos monoclonales capaces de reconocer un antígeno distinto que se expresa en distintas cantidades en las diversas poblaciones de leucocitos y en las poblaciones de células neoplásicas en una muestra.

Las muestras normales y neoplásicas son de uno de los siguientes tipos: sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y ganglios linfáticos.

Las muestras neoplásicas pueden contener células tumorales hematopoyéticas o células neoplásicas de cualquier origen no hematopoyético, tales como cáncer de mama, carcinomas renales, tumores de próstata, cáncer de pulmón, carcinomas de vejiga y tumores gástricos, entre otras.

Las muestras neoplásicas se obtienen en el momento del primer diagnóstico, de la recidiva de la enfermedad y en cualquier otro período de tiempo posterior al diagnóstico; pueden contener elevadas cantidades de células neoplásicas o enfermedad mínima. Pueden haberse marcado directamente tras su obtención y tras haberse cultivado *in vitro*.

El panel de combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizado para el marcaje de la muestra neoplásica es idéntico al panel de combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizado para la tinción de las muestras normales/reactivas: alternativamente, el primer panel puede ser más reducido que el segundo, pero una parte del primer panel está completamente contenida en el último panel de combinaciones de anticuerpos monoclonales.

Para cada par de paneles empleado para la tinción de las muestras normales/reactivas y de las muestras neoplásicas, el clon de cada reactivo de anticuerpo monoclonal utilizado en cada combinación individual de anticuerpos monoclonales, y el fluorocromo al que está conjugado, son idénticos en los dos paneles de combinaciones de anticuerpos monoclonales.

El número de componentes fluorescentes en cada una de las múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales comprende al menos cuatro fluorocromos diferentes, unidos cada uno de ellos a un anticuerpo monoclonal distinto, cuya emisión fluorescente es distinguible de la de los demás anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo. Los marcajes fluorescentes que se pueden utilizar en la práctica en esta invención incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína peridina clorofila (PerCP), aloficocianina, alexa flúor 488, alexa 647, pacific blue, alexa flúor 405, cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5) y conjugados de los mismos acoplados con PE, con APC o con PerCP (por ejemplo, PE/Cy5, PE/Cy5.5, PE/Cy7, APC/Cy7 y PerCP/Cy5.5). Cada anticuerpo monoclonal es capaz de reconocer un antígeno distinto, que se expresa en cantidades distintas en las diferentes poblaciones de

leucocitos y en las poblaciones de células neoplásicas de una muestra. Los anticuerpos monoclonales concretos que son comunes a todas las combinaciones de anticuerpos monoclonales empleadas para marcar un par de muestras normales/reactivas y neoplásicas puede variar dependiendo del tipo, del linaje y del estadio madurativo de las células tumorales de interés, contenidas en la muestra neoplásica.

5 Una vez seleccionado el panel de combinaciones multicolor de anticuerpos monoclonales a emplear para propósitos de tinción, las células presentes en un volumen de muestra conocido se mezclan entre sí con una solución de lisis, con cantidades conocidas de micropartículas fluorescentes y con la mezcla de reactivos de anticuerpos monoclonales. Para cada una de las múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizadas para teñir una muestra, se usa una alícuota distinta que contiene una copia de la muestra mezclada con una solución de lisis, una micropartícula fluorescente y la combinación específica de anticuerpos monoclonales. Tras la tinción de las células nucleadas y la lisis de las células eritroides no nucleadas, se puede lavar la muestra y medirse en un citómetro de flujo en el que las células se hacen pasar, una por una, a través de una o más regiones de detección, o se puede analizar directamente en un citómetro de flujo sin mediar ninguna etapa de lavado. De forma alternativa, la muestra se puede mezclar sólo con los anticuerpos monoclonales y con una población de micropartículas fluorescentes y, una vez teñida, medirse directamente en el citómetro de flujo.

La población de micropartículas de referencia puede ser uniforme o estar compuesta de múltiples poblaciones de micropérlas de distinto tamaño, distintas magnitudes de fluorescencia, densidad, forma, volumen, características de adhesión y otras propiedades fisicoquímicas. Una población de micropartículas puede estar compuesta por partículas fluorescentes, por micropartículas cuya superficie esté cubierta de anticuerpos contra inmunoglobulina o por una mezcla de ambas. Con objeto de poder calcular el número absoluto de una población celular concreta presente en un microlitro de muestra, se añade una población cuantificada de micropartículas a números conocidos por volumen de muestra.

25 En cada una de las regiones de detección del citómetro de flujo, las células y las micropartículas se exponen individualmente a una fuente luminosa a una o más longitudes de onda; para cada célula teñida en una muestra de células extraídas de sangre, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y ganglios linfáticos y para cada micropartícula, se toman al menos dos mediciones de luz dispersada y al menos cuatro mediciones de fluorescencia. La información registrada para todas las mediciones de luz dispersada y fluorescencia de cada célula individual y de cada micropartícula individual analizada, se almacena en un dispositivo de almacenamiento y análisis de datos, tal como un ordenador. La información de cada alícuota de muestra analizada, que contiene micropartículas y células teñidas con una combinación de anticuerpos monoclonales, puede almacenarse en un archivo de datos distinto; no obstante, en una realización preferente de esta invención, la información de las micropérlas y las células teñidas con todas las combinaciones de anticuerpos monoclonales empleadas para teñir una muestra, se almacenan en un único archivo de datos mediante la captura secuencial de información de cada alícuota distinta de la mezcla de muestra/micropartículas teñida con una combinación de anticuerpos monoclonales distinta; la identificación específica de aquellos eventos correspondientes a cada alícuota teñida con una combinación de anticuerpos monoclonales distinta que se ha medido secuencialmente puede lograrse mediante el uso de un parámetro tal como el "tiempo de captura". En cualquier caso, los datos de las muestras normales/reactivas y la muestra neoplásica se almacenan por separado en archivos de datos distintos. En la Patente de EE.UU. N° 4.284.412 y en la Patente de EE.UU. N° 4.727.020, se describen la configuración y el uso de un instrumento de citometría de flujo convencional equipado con un sistema informático de almacenamiento de datos y con una fuente luminosa simple y doble, respectivamente. En estos sistemas, normalmente los datos se almacenan en un formato FCS (estándar de citometría de flujo) en forma de listado. En este formato, la información para cada evento individual se muestra en un listado que incluye todos los parámetros medidos de forma secuencial, según la secuencia en la que se haya medido cada célula y micropartícula en el citómetro de flujo.

50 En caso de que la información de una única muestra esté contenida en archivos de búsqueda de datos independientes de los archivos de datos que contienen información de las características de dispersión de luz y fluorescencia de los eventos correspondientes a una mezcla de micropartículas y células teñidas con una combinación específica de anticuerpos monoclonales - información de todos los archivos de datos correspondientes a las múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales con los que se ha teñido la muestra, se fusiona en un único archivo de datos. En todos los archivos de datos resultantes de la fusión de los datos contenidos en dos o más archivos de datos distintos, la información correspondiente a cada archivo de datos individual fusionado se ordena en un listado distinto antes o después de los datos en forma de listado que contienen la información acerca de los eventos de los demás archivos de datos con los que se ha fusionado.

60 Un archivo de datos que contenga información acerca de las células procedentes de muestras normales/reactivas que se hayan medido en un citómetro de flujo puede estar compuesto por información obtenida tras la fusión de múltiples archivos de datos correspondientes a un número idéntico de alícuotas de muestra, teñidas cada una de ellas con una combinación de anticuerpos monoclonales distinta, correspondiendo todos ellos bien a una única muestra normal/reactiva o bien a múltiples muestras normales/reactivas. Un archivo de datos resultante de la fusión de la información recogida para dos o más muestras normales/reactivas, teñidas cada una de ellas por separado con un grupo idéntico de múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales, está compuesto por muestras normales/reactivas procedentes de individuos seleccionados aleatoriamente, de individuos procedentes de un

intervalo de edad bien definido o de cualquier otro grupo de individuos definido según su edad, género y condiciones no neoplásicas subyacentes, entre otras características.

Para la identificación de los fenotipos aberrantes expresados por células neoplásicas que se han teñido con un panel concreto de múltiples combinaciones de anticuerpos monoclonales, se generan nuevos archivos de datos combinando en proporciones conocidas los datos correspondientes a los eventos celulares del archivo de datos que contiene información de la luz dispersada y la fluorescencia obtenida tal como se describe en la etapa (2) acerca de las células y micropartículas de referencia presentes en la muestra neoplásica con el archivo de datos que contiene información de las células y micropartículas de referencia presentes en las muestras normales/reactivas, en el que la información procedente de dos archivos de datos se fusiona después de ajustar una posición relativa de las poblaciones de eventos celulares que se miden según las micropartículas de referencia. En el archivo de datos fusionado que contiene información acerca de los eventos celulares tanto de la muestra neoplásica como de las muestras normales/reactivas, los eventos correspondientes a cada uno de los dos archivos de datos se ordenan uno tras otro en un formato de datos en forma de listado y pueden marcarse de forma diferente en cualquier espacio multidimensional generado por las mediciones realizadas mediante citometría de flujo de luz dispersada y de las emisiones fluorescentes, empleando herramientas informáticas (por ejemplo, puntos de distintos colores).

Si se fusionan archivos de datos que contengan información de las características de dispersión de luz y de fluorescencia de células procedentes de múltiples muestras distintas, y si éstos se han capturado bajo diferentes condiciones (por ejemplo, distintos ajustes de calibración del instrumento), en instrumentos de citometría de flujo diferentes o a distintos tiempos (por ejemplo, en días, meses o años diferentes), mediante operaciones informáticas se ajusta automáticamente la posición relativa de cada evento celular en el espacio multidimensional formado por todos los parámetros medidos (dispersión de luz y emisiones fluorescentes) basándose en los cambios relativos observados en la posición de las poblaciones de micropartículas de referencia interna medidas simultáneamente con las células, para cada una de las muestras. Una vez ajustados, se controla el proceso de normalización, dado que la posición corregida de los eventos correspondientes a las micropartículas y a las poblaciones idénticas de células normales/reactivas contenidas en las múltiples muestras fusionadas, se superponen.

Pueden generarse diferentes archivos de datos que contengan información acerca de los eventos celulares medidos en una o más muestras normales y en una muestra neoplásica. Con tal propósito, toda la información correspondiente a la totalidad de la celularidad medida en la muestra neoplásica o en distintas partes de la misma y correspondiente a la totalidad de la información medida en un número variable de eventos seleccionados aleatoriamente y representativos de las células neoplásicas presentes en este archivo se añade a la información del archivo de datos obtenido tras la medición de las muestras normales/reactivas. Este procedimiento simula experimentos de dilución de células neoplásicas en una muestra normal mediante el uso de procedimientos computacionales. De este modo, se pueden crear diluciones en serie de los datos acerca de los eventos individuales de, por ejemplo, 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, y 1/10000000 (eventos/eventos) fusionando los datos procedentes de un archivo correspondiente a las muestras normales/reactivas con los datos procedentes de un archivo correspondiente a una muestra neoplásica.

Una vez fusionados los archivos de datos de las muestras normales/reactivas con los de una muestra neoplásica dando lugar a un único archivo de datos, las células neoplásicas presentes en este nuevo archivo de datos fusionado se identifican con ayuda de herramientas computacionales, como aquellas poblaciones de al menos 15 eventos que se encuentran en los espacios vacíos en el archivo inicial que contiene únicamente información acerca de las células de las muestras normales/reactivas. Mediante la cuantificación de la cantidad de luz dispersada y de fluorescencia medida para cada población individual de células neoplásicas en comparación con aquellas poblaciones de células normales marcadas con paneles idénticos, es posible derivar información estadística acerca de los fenotipos aberrantes con mayor poder de discriminación presentes en las células neoplásicas. Cada fenotipo aberrante puede estar compuesto por una combinación de dos o más mediciones de luz dispersada y fluorescencia y permite la identificación inequívoca, sensible y específica de aquellos eventos correspondientes a las células neoplásicas presentes en el archivo de datos fusionados, como diferente de todas las poblaciones de eventos correspondientes a las células normales/reactivas contenidas en el mismo archivo de datos fusionado.

El procedimiento de esta invención también podría usarse para detectar patrones anormales de expresión de antígenos con objeto de monitorizar la activación celular y la función celular.

#### **Descripción detallada de la realización preferente**

La invención se ilustrará por medio de dos ejemplos que no limitan sus áreas de aplicación, tal y como sigue.

#### **EJEMPLO 1.**

##### **1. Muestras**

Se extrajeron cinco ml de sangre periférica (SP) mediante punción venosa de 10 voluntarios sanos y se introdujeron en un tubo VACUTAINER™ (Becton Dickinson, Nueva Jersey, N.J.) que contenía EDTA como anticoagulante.

Además, se extrajo una muestra de 5 ml de SP de un paciente al que se le había diagnosticado una leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) y que presentaba una linfocitosis absoluta de  $5 \times 10^9/l$ .

2. Preparación de la muestra

Tras mezclar suavemente la mezcla, se colocaron 200 ul de cada muestra de SP conteniendo entre  $10^6$  y  $2 \times 10^6$  células nucleadas, en seis tubos repetidos diferentes y se lavaron durante 5 minutos a 540 g con 2 ml/tubo de solución salina tamponada con fosfato. Seguidamente, a cada tubo de cada una de las muestras de SP, se añadió una de las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales de cinco colores, conjugados cada uno de ellos con un fluorocromo distinto (FITC/PE/PE-Texas red/PerCP-Cy5.5/APC), añadiéndose cada anticuerpo monoclonal en cantidades saturantes en un volumen de 5 ul: 1) CD22/CD23/CD19/CD45/CD5, 2) CD43/CD79b/CD19/CD45/CD5, 3) anti-Lambda/anti-kappa/CD19/CD45/CD5, 4) anti-IgM/CD27/CD19/CD45/CD5, 5) CD1c/CD10/CD19/CD45/CD5, 6) CD103/CD25/CD19/CD45/CD5 y, 7) CD20/Zap70/CD19/CD45/CD5. Tras mezclar suavemente, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras esta incubación, se añadieron, a cada tubo repetido, 200 ul de una suspensión de microperlas (PerfectCOUNT, Cytognos, Salamanca, España), que contenía  $2 \times 10^3$  microperlas.

3. Adquisición de datos

Tras mezclar suavemente, se midió la luz dispersada y las emisiones fluorescentes de las células marcadas en un citómetro de flujo FACSARIA (Becton/Dickinson Biosciences BDB-, San José, Calif.) equipado con dos fuentes de emisión de luz láser sintonizadas a 488 y 635 nm, utilizando el programa informático FACS DIVA (BDB). Para cada muestra analizada se recogió un único archivo de datos que contenía información sobre la luz dispersada frontalmente (FSC) y la luz dispersada lateralmente (SSC), y las emisiones fluorescentes del FITC, PE, PE-texas red, PE-Cy5.5 y APC para cada célula y micropartícula analizada. Asimismo, también se registró información correspondiente al tiempo (de captura de los parámetros). Para cada muestra, la adquisición para los distintos tubos se realizó en la secuencia definida en la sección anterior relativa a la "preparación de la muestra" utilizando, como umbral, la fluorescencia roja asociada a CD45. Para cada combinación, se adquirió información sobre 500.000 células CD45+. La captura de información se detuvo entre dos tubos consecutivos, durante 10 segundos.

4.- Manipulación de datos y análisis de datos

Antes del análisis de los datos, los datos en forma de listado contenidos en los 10 archivos correspondientes a las 10 muestras normales de SP se fusionaron de forma ordenada desde la muestra 1 hasta la muestra 10 en un único archivo de datos. Con ese propósito, se introdujeron en una base de datos los datos correspondientes a las mediciones de FSC, SSC y de las emisiones fluorescentes del FITC, PE, PE-Texas red, PE-Cy5.5 y APC para cada microperla y cada evento celular se introdujo en una base de datos después de que fuera transformado en valores de canal (en una escala de 0 a 2048) utilizando el programa informático alphaFACS assistant 1.1a (Universidad de Stanford, Stanford, Calif.). Posteriormente se construyó un algoritmo basado en los datos de las muestras normales empleando el programa informático Lymphogram B (Versión: beta-test, Cytognos, Salamanca, España) a fin de identificar, mediante análisis de agrupamiento la totalidad de las distintas poblaciones de células normales identificadas con los parámetros comunes medidos para todas las alícuotas de muestra (FSC, SSC, CD19, CD45, CD5), así como para las micropartículas medidas en cada alícuota de muestra. A continuación se emplearon los datos estadísticos de cada población celular para cada parámetro medido, con objeto de estimar la función de distribución de probabilidad multidimensional, por ejemplo, mediante el uso de ventanas de Parzen (Duda R. O. et al., Pattern Classification, John Wiley & Sons 2001). Se establecieron uno o más prototipos (vectores del libro de códigos) como representativos de cada población de células y de microperlas presentes en el archivo de datos recogido para las muestras normales.

En paralelo, se realizó un análisis similar con el archivo de datos de LLC-B. Seguidamente se comparó la distribución estimada de las partículas de microperlas PerfectCount obtenida en el archivo de datos LLC-B con la posición obtenida en el archivo de datos Normal. En la LLC-B las microperlas mostraron una distribución idéntica pero en una posición distinta en el espacio  $R^7$ , observándose desplazamientos de diferente magnitud en cada dimensión. Basándose en los desplazamientos observados, se aplicó una función de corrección y se ajustó la posición de todos los eventos del archivo de datos de LLC-B según esta función. Tras ajustarlos, se calcularon los nuevos valores para los eventos correspondientes a la distribución de las poblaciones de células T CD5+/CD45+/CD19 residuales normales y de neutrófilos CD45+/SSC alto residuales normales, coexistentes con las células neoplásicas de la LLC-B en el archivo de datos LLC-B y se compararon con aquellos obtenidos para las mismas poblaciones normales presentes en el archivo de datos Normal. La distribución de ambas poblaciones de eventos fue idéntica en ambos archivos de datos ( $p > 0,05$ ). A continuación, se utilizaron los datos estadísticos multidimensionales de todas las poblaciones celulares y de microperlas, incluyendo la población de células B neoplásicas para construir uno o más prototipos y estimar la función de distribución de probabilidad de la población de células LLC-B neoplásicas, además de aquellas correspondientes a las poblaciones celulares residuales normales de los eventos celulares presentes en el mismo archivo de datos.

Tras esta etapa, una copia del archivo de datos que contenía la información acerca de las 10 muestras de SP normales (archivo de datos NORMAL) en distintas proporciones se fusionó con los datos correspondientes a los eventos procedentes del archivo de datos LLC-B tras ajustar los valores para la posición de cada evento procedente de este archivo de datos, según lo explicado anteriormente. Se emplearon los siguientes factores de dilución de eventos procedentes del archivo de datos correspondientes al archivo de datos LLC-B ajustado en el archivo de datos NORMAL: 99/1, 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 10000000 (archivos de datos NORMAL/ LLC-B). A continuación, se realizó un análisis de agrupamiento para los archivos de datos fusionados NORMAL/LLC-B, tal como se describe anteriormente. En todos los archivos de datos NORMAL/LLC-B, se identificó una población de células B neoplásicas CD5+/CD19+/CD45 alto/CD20 bajo/CD11c-/CD22-/CD23++/CD43+/CD79b bajo/IgM bajo/CD27+/CD103-/CD25 bajo/kappa bajo/lambda-/ZAP70-/CD10-, que estaba ausente en el archivo de datos NORMAL. De las demás poblaciones, la que mostró una relación más cercana estuvo representada por células B CD5+/CD19+/CD45 alto normales. Esta última población pudo distinguirse claramente de la anterior basándose en la combinación de CD20, CD22, CD79b, CD43, CD5 y CD25 (marcadores que definirían el fenotipo aberrante de las células LLC-B neoplásicas).

Por consiguiente, pese a que sólo se han presentado y descrito algunas realizaciones de la presente invención, resulta obvio que es posible realizar multitud de cambios y modificaciones a las mismas sin alejarse del alcance de la invención.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la identificación de fenotipos aberrantes, en el que los fenotipos aberrantes se refieren a patrones de expresión de proteínas en células neoplásicas que difieren del patrón de las células normales o reactivas no neoplásicas, en el que el método comprende las etapas de:
- 5 a) teñir por separado una o más muestras normales/reactivas y una población de micropartículas de referencia, y una muestra neoplásica y una población de micropartículas de referencia con múltiples combinaciones solapantes de al menos cuatro anticuerpos monoclonales, estando cada anticuerpo monoclonal en cada combinación conjugado a un fluorocromo distinto, y teniendo en común cada combinación al menos tres anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo, siendo dichos anticuerpos monoclonales capaces de reconocer un antígeno diferente
- 10 que se expresa en distintas cantidades en las diversas poblaciones de leucocitos y en las poblaciones de células neoplásicas de una muestra;
- b) medir secuencialmente al menos dos dispersiones de la luz y al menos cuatro emisiones fluorescentes distintas asociadas a un gran número de células teñidas con cada una de las combinaciones de anticuerpos monoclonales de las muestras normales/reactivas y la muestra neoplásica y de dichas poblaciones de micropartículas de referencia,
- 15 usando citometría de flujo;
- c) almacenar dos archivos independientes de datos en forma de listado, conteniendo uno la información obtenida tal como se describe en la etapa (b) acerca de las características específicas de dispersión de luz y de fluorescencia de cada célula y micropartícula de referencia analizadas a partir de las muestras normales/reactivas y conteniendo el otro la información obtenida tal como se describe en la etapa (b) acerca de las características específicas de dispersión de luz y de fluorescencia de cada célula y micropartícula de referencia analizadas a partir de la muestra
- 20 neoplásica;
- d) crear nuevos archivos de datos fusionando en proporciones conocidas los eventos celulares y los eventos de las micropartículas de referencia del archivo de datos que contiene la información de la luz dispersada y la fluorescencia obtenida tal como se describe en la etapa (b) acerca de las células y micropartículas de referencia presentes en la
- 25 muestra neoplásica en el archivo de datos que contiene la información obtenida tal como se describe en la etapa (b) acerca de las células y las micropartículas de referencia presentes en las muestras normales/reactivas; en el que la información de dos archivos de datos distintos se fusiona tras ajustar una posición relativa de las poblaciones de eventos celulares medidas según las micropartículas de referencia;
- e) definir en un espacio multidimensional generado por las medidas de luz dispersada y de emisiones fluorescentes mediante citometría de flujo, aquellas áreas ocupadas por los eventos que corresponden a células normales y aquellas áreas que corresponden a espacios vacíos en las muestras normales/reactivas y que puedan estar
- 30 ocupadas por células tumorales presentes en muestras neoplásicas;
- f) identificar secuencialmente en los archivos de datos fusionados como se describe en la etapa d), aquellos eventos que corresponden a células neoplásicas como distintos de los eventos que corresponden a células normales que coexisten en un espacio multidimensional generado por las medidas de luz dispersada y emisiones de fluorescencia mediante citometría de flujo; y
- 35 g) establecer las aberraciones fenotípicas más relevantes mostradas en las células neoplásicas en comparación sus homólogos normales, que permiten su identificación inequívoca, sensible y específica en el archivo de datos fusionado.
- 40
2. El método de la reivindicación 1, en el que las muestras comprenden sangre periférica.
3. El método de la reivindicación 1, en el que las muestras comprenden médula ósea.
- 45 4. El método de la reivindicación 1, en el que las muestras comprenden líquido cefalorraquídeo.
5. El método de la reivindicación 1, en el que las muestras comprenden ganglios linfáticos.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se tiñe más de una muestra normal seleccionada al azar.
- 50
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se tiñe más de una muestra normal, seleccionándose todas las muestras normales de un grupo de edad de individuos bien definido, o de cualquier otro grupo de individuos definido según su género y sus estados no neoplásicos subyacentes.
- 55
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las muestras neoplásicas contienen células tumorales hematopoyéticas de uno o más tipos distintos.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8, en el que las muestras neoplásicas contienen
- 60 células tumorales no hematopoyéticas de uno o más tipos distintos.
10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 9, en el que las muestras neoplásicas contienen células neoplásicas hematopoyéticas y células tumorales no hematopoyéticas.
- 65 11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 10, en el que las muestras neoplásicas se

obtienen en el primer diagnóstico, en la recaída y en cualquier periodo de tiempo posterior al diagnóstico.

12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 11, en el que las muestras neoplásicas pueden contener un número elevado o mínimo de células neoplásicas.

13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las muestras se tiñen directamente después de obtenerse.

14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las muestras se tiñen tras ser cultivadas *in vitro*.

15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los paneles de combinaciones múltiples de anticuerpos monoclonales utilizados para teñir las muestras neoplásicas y las muestras normales/reactivas son idénticos.

16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el panel de combinaciones múltiples de anticuerpos monoclonales utilizado para teñir las muestras neoplásicas, es más reducido que el panel de combinaciones de anticuerpos monoclonales utilizado para teñir las muestras normales/reactivas, pero el primer panel se encuentra incluido completamente en el último.

17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que para cada par de paneles de combinaciones de anticuerpos monoclonales, un clon exacto de cada anticuerpo monoclonal usado en cada combinación individual de anticuerpos monoclonales, y un fluorocromo al que está conjugado, son idénticos en los dos paneles de combinaciones de anticuerpos monoclonales.

18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una combinación de fluorocromos compatibles se selecciona de isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína peridina clorofila (PerCP), alofococianina, alexa flúor 488, alexa 647, pacific blue, alexa flúor 405, cianina 5 (Cy5), cianina 5.5 (Cy5.5) y conjugados de los mismos acoplados con PE, con APC o con PerCP (PE/Cy5, PE/Cy5.5, PE/Cy7, APC/Cy7 y PerCP/Cy5.5) o cualquier fluorocromo o conjugados de fluorocromo compatibles adicionales.

19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la información de la luz dispersada y la fluorescencia medidas de aquellos eventos teñidos con cada combinación de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos contenidos en un panel utilizado para teñir diferentes alícuotas repetidas de la misma muestra se almacenan inicialmente en archivos de datos separados.

20. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la información de la luz dispersada y la fluorescencia medidas de aquellos eventos teñidos con todas las distintas combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos contenidos en un panel utilizado para teñir diferentes alícuotas repetidas de la misma muestra se almacenan en un único archivo de datos.

21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la información de dos archivos de datos distintos se fusiona directamente sin ninguna corrección.

22. Un método según la reivindicación 1, en el que la población de micropartículas de referencia es uniforme.

23. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 22, en el que una población de micropartículas de referencia se compone de múltiples poblaciones de micropérlas de distinto tamaño, densidad, volumen, forma, cantidad de fluorescencia, características de adhesión u otras propiedades fisicoquímicas.

24. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 22 a 23, en el que una población de micropartículas se compone de partículas fluorescentes.

25. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 22 a 23, en el que una población de micropartículas se compone de micropartículas cuya superficie está cubierta con anticuerpos anti-inmunoglobulina.

26. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 22 a 23, en el que una población de micropartículas se compone de una mezcla de micropartículas fluorescentes cuya superficie está cubierta con anticuerpos anti-inmunoglobulina.

27. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 22 a 26, en el que las micropartículas se añaden en números conocidos.

28. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las diluciones en serie de los eventos a partir de un archivo de datos correspondiente a una muestra neoplásica teñida con un panel de combinaciones de anticuerpos monoclonales múltiples en un archivo de datos que contiene información sobre las medidas de la luz

dispersada y de fluorescencia de las células contenidas en una o más de las muestras normales/reactivas teñidas con un panel idéntico de anticuerpos monoclonales, se realiza en la etapa (d) del procedimiento descrito en la reivindicación 1, para evaluar la sensibilidad a la cual un número pequeño de células neoplásicas se podría detectar una vez diluido en células normales/reactivas a proporciones conocidas predefinidas.

- 5
29. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que se detectan patrones anormales de expresión de antígenos relacionados con activación celular y con una función celular.