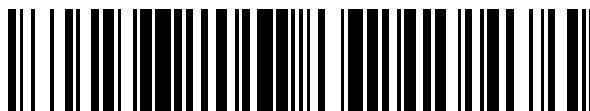


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 633**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013** **E 13733084 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 2861987**

54 Título: **Métodos, reactivos y kits para detectar enfermedad residual mínima**

30 Prioridad:

14.06.2012 US 201261659524 P

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

18.07.2016

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DONGEN, JACOBUS JOHANNES MARIA;
ORFAO DE MATOS CORREIA E VALE, JOSÉ
ALBERTO;
FLORES MONTERO, JUAN ALEJANDRO;
ALMEIDA PARRA, JULIA MARIA;
VAN DER VELDEN, VINCENT HENRICUS
JOHANNES;
BÖTTCHER, SEBASTIAN;
LANGERAK, ANTHONIE WILLEM;
MEJSTRÍKOVÁ, ESTER;
SZCZEPANSKI, TOMASZ;
RITGEN, MATTHIAS y
MONTEIRO DA SILVA LUCIO, PAULO JORGE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 577 633 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

Métodos, reactivos y kits para detectar enfermedad residual mínima

5 La invención se relaciona con el campo del diagnóstico de cáncer, más específicamente a medios y método para el control de desarrollo de enfermedad durante y después de tratamiento o para la detección de enfermedad diseminada mínima. El tratamiento citostático o citotóxico induce la remisión en la mayoría de los pacientes con neoplasias linfoides. Sin embargo muchos de estos pacientes recaen. Aparentemente, los actuales protocolos de tratamiento citostáticos o
10 citotóxicos no son capaces de matar todas las células malignas en estos pacientes con recaída, aunque alcanzaron la llamada remisión completa según criterios citomorfológicos. Debido el límite de detección de las técnicas citomorfológicas no es inferior a células malignas 1-5%, es obvio que dichas técnicas sólo pueden proporcionar información superficial acerca de la efectividad del tratamiento, hasta 10^{10} células de tumor todavía potencialmente restante en el cuerpo.

15 Las técnicas con mayor sensibilidad para detectar “enfermedad residual mínima” o enfermedad mínima (MRD) son necesarias para obtener una mejor visión en la reducción de la masa tumoral durante el tratamiento de inducción y erradicación adicional de las células malignas durante tratamiento de mantenimiento de un tejido o más de un tejido. La aplicación de citometría de flujo para detección de MRD se basa tradicionalmente en la discriminación entre las células malignas y leucocitos normales a través de características fenotípicas asociadas a enfermedad maligna, tales como
20 expresión aberrante, sobreexpresión y expresión de linaje cruzado de antígenos.

La citometría de flujo de 4 colores y de 6 colores actual alcanza una sensibilidad razonable de 10^{-3} (10^{-4}) en la mayoría de los pacientes con neoplasia hematológica. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la detección de bajas
25 frecuencias de células malignas en sangre, médula ósea y otros fluidos corporales tales como el líquido cefalorraquídeo durante y después de terapia y después de trasplante de células madre hematopoyéticas puede verse obstaculizado por altas frecuencias de células en regeneración normales. La extensión y el patrón de regeneración se diferencia por el protocolo de tratamiento, por fase de tratamiento, por tiempo de muestreo, y parece ser dependiente de la intensidad del tratamiento anterior: cuanto más intensivo el tratamiento, más prominente la regeneración de células hematopoyéticas.

30 Lógicamente, tanto los antecedentes de células de regeneración y los cambios inmunofenotípicos inducidos por fármacos reducen la sensibilidad y especificidad de los métodos para MRD de citometría de flujo de 4 colores y 6- colores existentes. Esto ha llevado principalmente a métodos en los que se utilizan ya sea múltiples combinaciones de marcadores para evaluar MRD en un paciente o, alternativamente utilizar una o unas pocas combinaciones de marcadores específicos para cada paciente. Reconocer la necesidad de mejorar los métodos de diagnóstico para MRD,
35 los presentes inventores se propusieron identificar marcadores adicionales que se podrían utilizar para obtener un ensayo más sensible y fiable para detección de MRD, particularmente con base en un método totalmente integrado, en el que la información de múltiples marcadores se combina a través de análisis multivariante. Adicionalmente, este nuevo método no se limita a pacientes individuales, sino que es aplicable a todos los pacientes de una categoría de enfermedad específica, tal como leucemia linfoblástica aguda de precursor de células B (BCP-ALL), leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) y mieloma múltiple (MM).

Después de una cuidadosa selección de los marcadores pertinentes, el diseño de combinaciones adecuadas de anticuerpos en tubos de múltiples colores, y la selección de fluorocromos adecuados (con base en la necesidad de
45 brillo, compensación, estabilidad, etc.), se desarrolló un conjunto de reactivos de anticuerpo. Los estudios se complementan con una evaluación multicéntrica extensa de los paneles de consenso con el fin de remodelar y lograr una eficiencia óptima. Los inventores diseñaron tinciones de ≥ 8 colores novedosas con combinaciones cuidadosamente seleccionados y probadas a fondo de anticuerpos, que pueden alcanzar sensibilidades de 10^{-4} a 10^{-5} con base en el diseño- pruebas-rediseño-repetición de pruebas-rediseño (etc.), se han desarrollado combinaciones específicas de anticuerpos conjugados con fluorocromo por categoría de enfermedad, tales como BCP-ALL, LLC-B y MM. Una o dos
50 combinaciones ≥ 8 colores por paciente permitirán la monitorización de MRD cuidadosa con sensibilidades de por lo menos 10^{-4} . Las combinaciones de anticuerpos de 10 colores y 12 colores proporcionadas pueden incluso discriminar mejor entre células normales y sus homólogos malignos, permitiendo de este modo la detección de MRD con sensibilidades a 10^{-5} .

55 Aquí presentamos combinaciones de anticuerpos de 8 colores 10 colores y 12 colores novedosas para la detección de MRD en una muestra, por ejemplo, sangre o médula ósea, aislada de pacientes con:

- leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras (BCP-ALL)
- 60 - leucemia linfocítica crónica de células B(LLC-B) o
- mieloma múltiple (MM) y trastornos de células de plasma relacionadas (PCD).

65 Estos inmunoteñidos de múltiples colores se pueden realizar de acuerdo con los denominados protocolos Euroflow como se describe por Van Dongen et al. Leukemia 2012; 26: 1908-1075 y por Kalina et al. Leukemia 2012; 26: 1986-2010.

De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona composiciones de reactivos únicos para detección por citometría de flujo de MRD, que comprende una combinación de por lo menos ocho anticuerpos conjugados con fluorocromo distintos. En particular, las composiciones de reactivos son de utilidad para detectar MRD en pacientes con BCP-ALL, B-CLL o MM/PCD. En una realización preferida, la composición comprende anticuerpos monoclonales contra un antígeno CD dado. CD significa designación de grupo (por sus siglas en inglés) y es una sigla para la identificación de antígenos de superficie celular específicos o antígenos intracelulares definidos por los anticuerpos monoclonales. Se pueden obtener comercialmente anticuerpos (monoclonales) contra los marcadores indicados de varias compañías, que incluyen Becton/ Dickinson (BD) Biosciences, Dako, Beckman Coulter, CYTOGNOS, Caltag, Pharmingen, Exbio, Sanquin, Invitrogen, y similares.

Detección de MRD por citometría de flujo en BCP-ALL

En una realización, la invención proporciona una composición de reactivo para detección por citometría de flujo de células de BCP-ALL en un sujeto humano, que comprende un panel de por lo menos ocho anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos. El panel de BCPALL comprende anticuerpos contra los cuatro "marcadores de núcleo" CD10, CD19, CD20, CD34 y CD45. Preferiblemente, el panel adicionalmente comprende uno o más anticuerpos seleccionados del grupo de anticuerpos contra CD38, CD81, Cylgm, y desoxinucleotidil transferasa (NuTdT). Se obtienen resultados muy buenos si el panel adicionalmente comprende uno o más conjuntos de anticuerpos seleccionados de (a) grupo de anticuerpos contra CD66c y CD123; (b) grupo de anticuerpos contra CD304 y CD73; y (c) grupo de anticuerpos contra Smlgk y Smlgl, en donde los anticuerpos dentro de cada conjunto se conjugan al mismo fluorocromo. En un aspecto específico, el panel de BCP-ALL comprende anticuerpos contra CD10, CD19, CD20, CD34, CD45, uno o más anticuerpos seleccionados del grupo de anticuerpos contra CD38, CD81, Cylgm, NuTdT, y dos o más conjuntos de anticuerpos seleccionados de (a) grupo de anticuerpos contra CD66c y CD123; (b) grupo de anticuerpos contra CD304 y CD73; y (c) grupo de anticuerpos contra Smlgk y Smlgl, en donde los anticuerpos dentro de cada conjunto se conjugan al mismo fluorocromo.

Por ejemplo, una composición de reactivo comprende anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos dirigidos contra una de las siguientes combinaciones de marcadores:

(i) CD20, CD45, CD81, CD66c, CD123, CD34, CD19, CD10 y CD38, en donde los anticuerpos contra CD66c y CD123 se conjugan al mismo fluorocromo;

(ii) CD20, CD45, CD81, CD304, CD73, CD34, CD19, CD10 y CD38, en donde los anticuerpos contra CD304 y CD73 se conjugan al mismo fluorocromo;

(iii) CD20, CD45, NuTdT, Smlgk, Smlgl, Cylgm, CD19, CD34 y CD10,

en donde los anticuerpos contra Smlgk y Smlgl se conjugan al mismo fluorocromo. Véase por ejemplo el Panel 1A para MRD de BCP-ALL de 8 colores.

Como otro ejemplo, comprende anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos dirigidos contra los marcadores CD20, CD45, CD81, NuTdT, CD34, CD19, CD10 y CD38, y uno o más conjuntos de anticuerpos seleccionados de (a) grupo de anticuerpos contra CD66c y CD123; (b) grupo de anticuerpos contra CD304 y CD73; y (c) grupo de anticuerpos contra Smlgk y Smlgl, en donde los anticuerpos dentro de cada conjunto se conjugan al mismo fluorocromo. Véase por ejemplo el tubo de 10 colores en el Panel 1B que comprende anticuerpos contra los marcadores CD20, CD45, CD81, NuTdT, CD66c, CD123, CD304, CD73, CD34, CD19, CD10 y CD38.

En un aspecto específico adicional, la composición comprende una combinación de anticuerpos conjugados a fluorocromo dirigidos contra los marcadores CD20, CD45, CD81, NuTdT, CD66c, CD123, CD304, CD73, Smlgk, Smlgl, Cylgm, CD34, CD19, CD10 y CD38, en donde los anticuerpos contra cada uno de los conjuntos CD66c/CD123, CD304/CD73 y Smlgk/ Smlgl se conjugan al mismo fluorocromo. Véase por ejemplo el tubo de 12 colores en el panel 1C.

Los fluorocromos adecuados para la conjugación de anticuerpos para uso en la presente invención contra los marcadores citados son conocidos en la técnica. Como se entenderá, los fluorocromos utilizados en una composición de reactivos deben ser distinguibles entre sí por citometría de flujo. Los fluorocromos preferiblemente seleccionados para brillo, limitan el solapamiento espectral y la necesidad limitada de compensación, estabilidad, etc (véase: Kalina et al. Leukemia 2012: 26: 1986-2010).

El siguiente panel de fluorocromos es de particular uso en una composición de reactivo para BCP-ALL de acuerdo con la invención: (1) azul pacífico (PacB), violeta brillante 421 (BV421) o Horizon V450, (2) naranja pacífico (PacO), Horizon V500 (HV500), BV510, naranja Khrome (KO) o OC515, (3) isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa488, (4) ficoeritrina (PE), (5) proteína de clorofila peridinina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-TexasRed, (6) ficoeritrina/cianina (PE-Cy7), (7) alofocianina (APC) o Alexa647, y (8) alofocianina/hilita 7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680, APC-A750, APC-C750 o Alexa700. Después de múltiples rondas de prueba, los presentes inventores

observaron que se pueden obtener muy buenos resultados si se escogen los siguientes fluorocromos: Azul pacífico, violeta brillante 421 o Horizon V450, PacO o Horizon V500, FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, y APC-H7 o APC-A750 o APC-C750. En un aspecto específico, la invención proporciona una composición de reactivo mostrado en la

5

Tabla 1. Composiciones de reactivos de ejemplo para detección de MRD en BCP-ALL.

Panel 1A. Composición de marcador de paneles con MRD de BCP-ALL de 8 colores de la invención											
Tubo	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy 5.5	PECy7	APC	APCC750			
1	CD20	CD45	CD81	CD66c y CD123	CD34	CD 19	CD 10	CD38			
2	CD20	CD45	CD81	CD304 y CD73	CD34	CD19	CD 10	CD38			
2	CD20	CD45	NuTdT	Sml κ y Sml λ	CyIgu	CD 19	CD34	CD10			
Panel 1B. Composición de marcador de paneles con MRD de BCP-ALL de 10 colores de la invención											
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10		
CD20	CD45	CD81	NuTdT	CD66c y CD 123	CD304 y CD73	CD34	CD 19	CD10	CD38		
Panel 1C. Composición de marcador de paneles con MRD de BCP-ALL de 12 colores de la invención											
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
CD20	CD45	CD81	NuTdT	CD66c y CD 123	CD304 y CD73	Smlgk y Smlgλ	CyIgm	CD34	CD 19	CD 10	CD38

Detección de MRD por citometría de flujo en B-CLL

10

También se describe una composición de reactivo para detección por citometría de flujo de leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) en un sujeto humano, que comprende un panel de por lo menos ocho anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos, el panel comprende por lo menos anticuerpos contra los siete "marcadores de núcleo" CD5, CD27, CD79b, CD3, CD200, CD81 y CD19. Se encontró que se puede utilizar el CD22 y/o receptor de orfan 1 similar a tirosina quinasa receptora (ROR1) como valiosos marcadores adicionales. Se obtuvieron muy buenos resultados en

15

Las combinaciones de marcadores preferidos para detectar B-CLL son como sigue:

20

- (a) CD27, CD3, CD79b, CD5, CD22, CD19, CD200 y CD81
- (b) CD5, CD3, CD79b, ROR1, CD27, CD19, CD200 y CD81
- (c) CD27, CD3, CD79b, ROR1, CD5, CD22, CD19, CD20, CD200 y CD81
- (d) CD27, CD3, CD79b, ROR1, CD5, CD22, CD19, CD20, CD200, CD43, CD81 y CD38.

25

El siguiente panel de fluorocromos es de particular uso en una composición de reactivo de CLL : (1) azul pacífico (PacB), violeta brillante 421 (BV421) o Horizon V450, (2) naranja pacífico (PacO), Horizon V500 (HV500), BV510, naranja Khrome (KO) o OC515, (3) isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa488, (4) ficoeritrina (PE), (5) proteína de clorofila peridina/ cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-TexasRed, (6) ficoeritrina/cianina 7 (PE-Cy7), (7) alofocianina (APC) o Alexa647, y (8) alofocianina/hilita 7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680, APC-A750, APC-C750 o Alexa700. Después de múltiples rondas de prueba, los presentes inventores observaron que se pueden obtener muy

30

En un aspecto específico, la composición de reactivo se muestra en la Tabla 2.

35

Tabla 2. Composiciones de reactivos de ejemplo para detección de MRD en B-CLL

Panel 2A. Composición de panel con MRD de CLL de 8 colores											
BV421	BV510	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCC750				
CD27	CD3	CD79b	CD5	CD22	CD27	CD 19	CD200	CD81	CD81		
CD5	CD3	CD79b	ROR1			CD 19	CD200				
Panel 2B. Composición de tubo con MRD de CLL de 10 colores											
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10		
CD27	CD3	CD79b	ROR1	CD5	CD22	CD 19	CD20	CD200	CD81		
Panel 2C. Composición de tubo con MRD de CLL de 12 colores											
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12

CD27	CD3	CD79b	ROR1	CD5	CD22	CD19	CD20	CD200	CD43	CD81	CD38
------	-----	-------	------	-----	------	------	------	-------	------	------	------

Detección de MRD por citometría de flujo en mieloma múltiple/enfermedad celular en plasma (MM/PCD)

5 Un aspecto aún adicional se relaciona con una composición de reactivo para detectar células de MM o PCD. El panel comprende anticuerpos contra los cuatro "marcadores de núcleo" CD 138, CD38, CD56 y CD19, complementados con por lo menos cuatro marcadores adicionales seleccionados del grupo que consiste de CD27, CD117, CD81, CD229, CD45, Cylgk y Cylgλ. El CD45 es un quinto marcador preferido, preferiblemente en combinación con CD27, CD117 y CD81 o CD229, Cylgk y Cylgλ.

10 Se proporciona una composición de reactivo con anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos contra cualquiera de uno de los siguientes paneles de marcadores:

- 15 (n) CD45 CD138CD38 CD56 CD27 CD19 CD117CD81
 (o) CD45 CD138CD38 CD56 CD229CD19 Cylgk Cylgλ
 (p) CD138 CD27 CD38 CD56 CD45 CD19 CD117CD81
 (q) CD138 CD27 CD38 CD56 CD229CD19 Cylgk Cylgλ
 (r) CD138 CD27 CD38 CD56 CD45 CD19 Cylgk Cylgλ

20 Por ejemplo, se proporciona una composición de reactivo para detección por citometría de flujo de MM o PCD en un sujeto humano, que comprende un panel de por lo menos ocho anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos, el panel comprende por lo menos anticuerpos contra marcadores de núcleo CD138, CD38, CD56 y CD19, complementados con por lo menos cuatro marcadores adicionales seleccionados del grupo que consiste de CD27, CD117, CD81, CD229, CD45, Cylgk y Cylgλ. Preferiblemente, el CD45 es el quinto marcador, más preferiblemente en combinación con los marcadores CD27, CD117 y CD81, o en combinación con los marcadores CD229, Cylgk y Cylgλ. Las composiciones de reactivos preferidas comprenden anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos dirigidos contra una de las siguientes combinaciones de marcadores:

- 25 (iv) CD45, CD138, CD38, CD56, CD27, CD19, CD117 y CD81
 (v) CD45, CD138, CD38, CD56, CD229, CD19, Cylgk y Cylgλ
 30 (vi) CD138, CD27, CD38, CD56, CD45, CD19,CD117 y CD81
 (vii) CD138, CD27, CD38, CD56, CD229, CD19, Cylgk y Cylgλ
 (viii) CD138, CD27, CD38, CD56, CD45, CD19, Cylgk y Cylgλ

35 Véase por ejemplo el Panel 3A para MRD de PCD de 8 colores.

Se obtuvieron muy buenos resultados utilizando anticuerpos conjugados a fluorocromo dirigidos contra los marcadores CD138, CD27, CD38, CD56, CD45, CD19, CD117, CD81 y uno o ambos conjuntos de anticuerpos seleccionados de (a) grupo de anticuerpos contra CD229 y CD28; y (b) grupo de anticuerpos contra Cylgk y Cylgλ. Véase por ejemplo el tubo de 10 colores en el Panel 3B y el tubo de 12 colores en el Panel 3C.

40 El siguiente panel de fluorocromos es de particular uso en una composición de reactivo de MM/PCD: (1) azul pacífico (PacB), violeta brillante 421 (BV421) o Horizon V450, (2) naranja pacífico (PacO), Horizon V500 (HV500), BV510, naranja Khrome (KO) o OC515, (3) isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa488, (4) ficoeritrina (PE), (5) proteína de clorofila peridinina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-TexasRed, (6) ficoeritrina/cianina 7 (PE-Cy7), (7) alofococianina (APC) o Alexa647, y (8) alofococianina/hilita 7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680, APC-A750, APC-C750 o Alexa700. Después de múltiples rondas de prueba, los presentes inventores observaron que se pueden obtener muy buenos resultados si se escogen los siguientes fluorocromos: Azul pacífico, violeta brillante 421 o Horizon V450, PacO o Horizon V500, FITC, PE, PerCPCy5.5, PE-Cy7, APC, y APC-H7 o APC-A750 o APC-C750.

50 Tabla 3. Composiciones de reactivos de ejemplo para detección de MRD en MM/PCD

Panel 3A. Composición de panel con MRD de PCD										
Tube	PacB o BV421 o HV450	HV500 o PacO	FITC	PE	PerCPCy5. 5	PECy7	APC	APCH7 o APCA750 o APCC750		
1	CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81		
2	CD45	CD138	CD38	CD56	CD229	CD19	Cylgk	Cylgλ		
3	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81		
4	CD138	CD27	CD38	CD56	CD229	CD19	Cylgk	Cylgλ		
5	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	Cylgk	Cylgλ		

Panel 3B. Composición panel con MRD de PCD de 10-colores										
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	

CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD 19	CD117		CD81	CD229	CD28	
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD 19	CD117		CD81	Cylgk	Cylgλ	
10	Panel 3C. Composición de tubo con MRD PCD de 12 colores										
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
CD 138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD 19	CD117	CD81	CD229	CD28	Cylgk	Cylgλ

5 Un aspecto adicional de la invención se relaciona con un kit de diagnóstico para detectar MRD, en particular BCP-ALL MRD, CLL MRD o MM/PCD MRD que comprende una o más de las composiciones de reactivos descritas anteriormente, opcionalmente junto con instrucciones para uso, regulador, y/o muestras de control (véase: Kalina et al. Leukemia 2012: 26: 1986-2010). En una realización, se proporciona un kit de BCP-ALL que comprende una o más composiciones de reactivos de la Tabla 1. También se proporcionan un kit de CLL que comprende una o más composiciones de reactivos de la Tabla 2, un kit de PCD que comprende una o más composiciones de reactivos de la Tabla 3.

10 La invención también se relaciona con un método para detección por citometría de flujo de MRD, que comprende las etapas de proporcionar una muestra biológica de un sujeto humano y poner en contacto por lo menos una porción (alícuota) de la muestra con una composición de reactivo proporcionada aquí. Se puede utilizar directamente cualquier tipo de muestra conocida o que se sospecha contiene los leucocitos, o después de lisis de los glóbulos rojos no nucleados, o después de centrifugación de densidad, o después de células procedimientos de clasificación. Por ejemplo, la muestra es sangre periférica, médula ósea, muestra de tejido, tales como los ganglios linfáticos, adenoides, bazo o hígado, u otro tipo de fluido corporal tal como líquido cefalorraquídeo, líquido vítreo, líquido sinovial, derrame pleural o ascitis. Se prefiere la sangre periférica o médula ósea.

20 Se proporciona un método de citometría de flujo multi-color para detectar enfermedad residual mínima (MRD) en una muestra biológica que comprende células, preferiblemente células de linaje B (Precusores de células B, linfocitos B, y células de plasma), que comprende las etapas de:

- (i) teñir la muestra con una composición de reactivo de acuerdo con la invención,
- 25 (ii) someter la muestra a citometría de flujo;
- (iii) activar sobre células para expresión de los marcadores seleccionados detectados por los anticuerpos presentes en la composición de reactivo;
- 30 (iv) distinguir entre células normales y malignas, con base en el perfil de expresión de los marcadores múltiples.

Preferiblemente, el análisis en la etapa (iv) involucra análisis multivariante, preferiblemente análisis de componente principal (PCA), en donde cada marcador ha agregado valor en el proceso de distinción a través del análisis de componente principal. Ventajosamente, se utiliza vista APS que utiliza separación de población automatizada, por ejemplo, empleando el software Infinicyt, o el análisis de escalamiento multidimensional (MDS).

40 El PCA es un procedimiento matemático que utiliza una transformación ortogonal para convertir un conjunto de observaciones de las variables posiblemente correlacionadas en un conjunto de valores de las variables no correlacionadas llamadas componentes principales. El número de componentes principales es menor que o igual al número de variables originales. Esta transformación se define de tal manera que el primer componente principal tiene tan alta una varianza como sea posible (es decir, representa tanta variabilidad en los datos como sea posible), y cada componente subsiguiente a su vez tiene la varianza más alta posible bajo restricción de que sea ortogonal a (correlacionada con) los componentes anteriores. Se garantiza que los componentes principales sean independientes sólo si el conjunto de datos se distribuye normalmente en forma conjunta. El PCA es sensible a la escala relativa de las variables originales. Dependiendo del campo de aplicación, que también se llama la transformada de Karhunen-Loève discreta (KLT), la transformada de Hotelling o descomposición ortogonal adecuada (POD). Como alternativa al PCA, se pueden utilizar SMD o cualquier otro tipo de análisis multivariante bien establecido (véase: Pedreira et al. Trends Biotechnol 2013).

50 En una realización, se proporciona un método de citometría de flujo multi-color para detectar enfermedad residual mínima (MRD) en una muestra biológica que comprende linfocitos, en donde MRD es BCP-ALL, que comprende las etapas de:

- 55 (i) teñir la muestra con una composición de reactivo para BCP-ALL de acuerdo con la invención, preferiblemente una composición seleccionada de uno cualquiera de los paneles 1A, 1B o 1C,;
- (ii) someter la muestra a citometría de flujo; (iii) activación sobre células B maduras y células de BCP para expresión de los marcadores detectados por los anticuerpos presentes en la composición de reactivo; (iv) distinción entre células de

BCP normales y malignas, con base en la aplicación de múltiples marcadores, cada uno tiene valor agregado en el proceso de distinción a través del análisis de componente principal. Véanse ejemplos en el Ejemplo 1 y Figuras 1 y 2 para un ejemplo de análisis que permite detección de MRD en pacientes con BCP-ALL.

5 También se proporciona un método de citometría de flujo multi-color para detectar enfermedad residual mínima (MRD) en una muestra biológica que comprende linfocitos, en donde la MRD es CLL, que comprende las etapas de:

10 (i) teñir la muestra con una composición de reactivo de CLL de acuerdo con la invención, preferiblemente una composición seleccionada de uno cualquiera de los paneles 2A, 2B o 2C;

15 (ii) someter la muestra a citometría de flujo; (iii) activación de linfocitos B para expresión de marcadores detectados por los anticuerpos presentes en la composición de reactivo; (iv) distinción entre células B normales y malignas, con base en la aplicación de múltiples marcadores, cada uno tiene valor agregado en el proceso de distinción a través del análisis de componente principal.

Véase ejemplos en el Ejemplo 2 y Figuras 3 y 4 para un ejemplo de análisis que permite detección de MRD en pacientes con CLL.

20 También se proporciona un método de citometría de flujo multi-color para detectar enfermedad residual mínima (MRD) en una muestra biológica que comprende linfocitos, en donde MRD es MM/PCD, que comprende las etapas de:

(i) teñir la muestra con una composición de reactivo de MM/PCD de acuerdo con la invención, preferiblemente una composición seleccionada de uno cualquiera de los paneles 3A, 3B o 3C;

25 (ii) someter la muestra a citometría de flujo;

(iii) activación de células de plasma para expresión de los marcadores detectados por los anticuerpos presentes en la composición de reactivo;

30 (iv) distinción entre células de plasma normales y malignas, con base en la aplicación de múltiples marcadores, cada uno tiene valor agregado en el proceso de distinción a través del análisis de componente principal.

Véanse ejemplos en el Ejemplo 3 y Figuras 5 y 6 para un ejemplo de análisis que permite detección de MRD en pacientes con MM/PCD.

35 Leyenda de las figuras

40 Figura 1. Ejemplo típico de cómo utilizar los marcadores de identificación de CD19 y CD45 en combinación con SSC (Panel A a C) para la distinción entre células BCP y otras células nucleadas en una muestra de médula ósea de un paciente con BCP-ALL durante terapia. En cada gráfica, los eventos de color gris claro corresponden a células no B en la muestra, mientras que los eventos de color gris oscuro son células B maduras y los eventos negros células BCP. En la representación de análisis multivariante (APS1) del componente principal 1 vs componente principal 2 (Grupo D), ambas células B maduras y células BCP están claramente separadas de todos los demás eventos con base en todos los parámetros informativos (por ejemplo, CD19, CD45, SSC).

45 Figura 2.- Ejemplo que ilustra cómo utilizar marcadores de caracterización inmunofenotípicos CD10, CD20, CD34, CD66c/CD123 y CD38 en combinación con SSC para la distinción entre células BCP-ALL y células B residuales normales en una muestra de médula ósea de un paciente con BCP-ALL durante la terapia (Paneles A a D). Solamente se exhiben células B de médula ósea, después de activada/seleccionada como se describe en la Figura 1. En cada gráfica, los puntos negros corresponden a células de BCP-ALL en la muestra, mientras que los puntos grises son células B normales. En comparación con las células B normales, las células de BCP-ALL muestran sobreexpresión de CD81 (Panel D), CD 10 (paneles A y D), y CD66c/CD123 (Panel C). En la representación de APS1 (componente principal 1 frente al componente principal 2) basada en todos los marcadores de inmunofenotipo y características de dispersión evaluados (Grupo E), las células B residuales normales (grises) están claramente discriminados de las células de BCP-ALL (negro).

50 Figura 3.- Ejemplo que ilustra cómo utilizar los marcadores de identificación CD19 y CD3 en combinación con SSC (paneles A a C) para distinción entre células B maduras y otras células nucleadas en una muestra de sangre periférica de un paciente con CLL. En cada gráfica, los eventos grises corresponden a células no-B en la muestra, mientras que los eventos negros son células B de sangre periférica completa. En la representación de análisis multivariante (APS1) del componente principal 1 vs componente principal 2 (Grupo D), las células B están claramente separadas del resto de eventos con base en todos los parámetros informativos (por ejemplo, CD19, CD3, SSC).

60 Figura 4.- Ejemplo que ilustra cómo utilizar marcadores de caracterización inmunofenotípicos CD27, CD5, CD22, CD200 y CD79b (paneles A a C) para la distinción entre células de LLC y células B maduras normales en una muestra de sangre periférica de un paciente con CLL. Solo se muestran las células B de sangre periférica, después de

activadas/seleccionadas como se describe en la Figura 3. En cada gráfica, los puntos negros corresponden a células de CLL en la muestra, mientras que los puntos grises son células B de sangre periférica normales. En comparación con las células B normales, las células de CLL muestran subexpresión de CD22 (Panel B) y CD79b (Panel C), junto con sobreexpresión de CD200 (Panel B) y CD5 (paneles A y C). En la representación de APS1 (componente principal 1 vs componente principal 2) con base en todos los marcadores del inmunofenotipo y características de dispersión evaluados (Grupo D), las células de CLL están claramente discriminadas de las células B normales, mientras que este grado de discriminación no se puede lograr basado en marcadores individuales.

Figura 5.- Ejemplo que ilustra cómo utilizar los marcadores de identificación CD38 y CD138 en combinación con SSC (Panel A a C) para la distinción entre células de plasma y otras células nucleadas en una muestra de médula ósea de un paciente con MM después de terapia. En cada gráfica, los puntos grises corresponden a células de no plasma en la muestra, mientras que los puntos negros son células de plasma de médula ósea total. En la representación de análisis multivariante (APS1) del componente principal 1 vs componente principal 2 (Panel D), las células de plasma (puntos negros) están claramente separadas de todos los demás eventos (puntos grises) con base en todos los parámetros informativos (por ejemplo, CD138, CD38, SSC).

Figura 6.- Ejemplo que ilustra de cómo utilizar marcadores de caracterización inmunofenotípicos CD81, CD19, CD45, CD56, CD27, CD117 y CD38, en combinación con SSC (paneles A a D) para la distinción entre células de plasma de mieloma/enfermedad maligna y células de plasma residuales normales en una muestra de médula ósea de un paciente con MM después de terapia. Solo se muestran las células de plasma de médula ósea, después de activadas/seleccionadas como se describe en la Figura 5. En cada gráfica, los puntos negros corresponden a células de plasma de mieloma/clonales en la muestra, mientras que los puntos grises son células de plasma de médula ósea residuales normales. En comparación con las células de plasma normales, las células de plasma de mieloma/clonales muestran subexpresión de CD81, CD19, CD45, CD27 y CD38 junto con una mayor SSC y la sobreexpresión de CD56 y CD117. En la representación de APS1 (componente principal 1 vs componente principal 2) (Grupo E) con base en todos los marcadores del inmunofenotipo y características de dispersión de las células de plasma normales residuales evaluadas (puntos grises) están claramente discriminadas de las células de plasma de mieloma/malignas (puntos negros), mientras que este grado de discriminación no se puede lograr sobre con base en marcadores individuales.

Sección experimental

El poder del método Euroflow descrito aquí se basa en la combinación de conjuntos de marcadores y el uso de análisis multivariante, para identificación de células normales (por ejemplo, células B normales precursoras, linfocitos B normales y células de plasma normales) y distinción entre células normales/reactivas versus células clonales/malignas. Para este propósito, se utiliza un potente análisis multivariante de la contribución de marcadores individuales para la inclusión y exclusión de cada marcador en el panel de acuerdo con su contribución sobre todos los otros marcadores en la combinación. Dicha estrategia se utilizó para evaluar las combinaciones seleccionadas de la mayoría de los marcadores discriminantes en múltiples rondas secuenciales de ensayos experimentales. Debido a esto las combinaciones de anticuerpos propuestas finales se hicieron muy fuertes cuando se utilizaron en combinación con el análisis de componente principal, específicamente con la herramienta de separación de población automatizada (APS) del software Infinicyt, de tal manera que el valor agregado (independiente) de cada marcador se utiliza en una única etapa de análisis.

Por la presente, presentamos el resumen de los resultados de los extensos estudios experimentales para la detección de MRD en sangre y médula ósea de pacientes con BCP-ALL (Ejemplo 1), CLL (Ejemplo 2) y Mieloma Múltiple (Ejemplo 3).

En los siguientes ejemplos, se proporcionan listas de marcadores junto con la aberración fenotípica más frecuente de estos marcadores en el caso de BCP-ALL, CLL, y MM/PCD. Sin embargo, hay que señalar que el poder de discriminación real entre células normales y malignas se basa en combinaciones de marcadores en el espacio n-dimensional correspondiente, como es claramente visible en el análisis de componente principal en las figuras de los Ejemplos 1 a 3. De hecho, pequeñas diferencias de varios marcadores se agregan a una mayor diferencia en el análisis de componente principal. Por lo tanto, la presente invención no se trata de estudios de marcadores individuales para detección de MRD, sino acerca de conjuntos de marcadores cuidadosamente seleccionados, que permiten una excelente discriminación entre células normales y sus homólogos malignos, tales como células de BCP normales frente a blastos de BCP-ALL, linfocitos B normales frente a células de B-CLL y células de plasma normales frente a células de plasma de MM/PCD.

Ejemplo 1. Paneles de anticuerpos y método de diagnóstico para detección de MRD en pacientes con BCP/ALL

Marcadores para identificación de células B totales y precursores de células B en la médula ósea

Lista de marcadores de identificación relevantes: CD19, CD45

Cómo usarlos: La pre-activación que utiliza el marcador CD19 es esencial para la identificación de una población de células B puras. Para centrarse en precursores de células B normales (BCP), se pueden utilizar negatividad o

positividad débil a CD45 para discriminar BCP de células B maduras positivas a CD45. En el caso de terapias dirigidas con CD19, el CD19 podría ser sustituido por CD22. Estos marcadores se pueden utilizar también en combinación con dispersión lateral de luz (SSC) o dispersión de luz frontal (FSC) o ambos FSC y SSC para identificar células B en sangre periférica o médula ósea o de otros tipos de muestras (por ejemplo, médula ósea, biopsia de tejido, líquido cefalorraquídeo). Es de destacar que otros marcadores, como CD10, CD20, CD38 y CD34, que se utilizan para discriminar las células de BCP-ALL de las células BCP normales (ver a continuación), también pueden contribuir a la activación de la población de células BCP totales (por ejemplo CD34+, CD10+, CD20-para atenuar, CD38+).

Marcadores para distinguir células precursoras de células B normales versus malignas

Lista de marcadores y aberración fenotípica más frecuente:

CD38: subexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. Normales

CD10: sobre o subexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas

CD45: subexpresado (usualmente negativo) en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. normales

CD20: sub o sobreexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. Normales

CD81: sobre o subexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. normales

CD66c: sobreexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. normales (particularmente BCR-ABL positivo ALL; generalmente negativo en TEL-AML1-positivo o MLL-AF4-positivo ALL)

CD123: sobreexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. normales (particularmente en ALL hiperdiploide)

CD304: sobreexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. Normales

CD73: sobreexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. Normales

CD34: sub o sobreexpresado en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. Normales

SSC: aumento o reducción de intensidad en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. normales.

FSC: aumento o reducción de intensidad en células precursoras de célula B de BCP-ALL/malignas vs. normales.

Ejemplo 2. Paneles de anticuerpo y método de diagnóstico para detección de MRD en pacientes con CLL.

Marcadores para identificación de células B totales en sangre periférica y médula ósea:

Lista de marcadores de identificación: CD19, CD3 (marcador de exclusión)

Cómo utilizarlos: La pre-activación utilizando este marcador es esencial para la identificación de una población de células B puras, y la eliminación de dobletes de células B/células T. Estos marcadores se pueden utilizar también en combinación con dispersión lateral de luz (SSC) o dispersión de luz frontal (FSC) o ambas FSC y SSC para identificar las células B en sangre periférica o médula ósea u otros tipos de muestras (por ejemplo, biopsia de tejido, líquido cefalorraquídeo). Para una activación más refinada con un mejor enriquecimiento de células de CLL, se pueden utilizar CD5 y CD27.

Marcadores para distinguir las células B normales de las células de CLL:

Lista de marcadores fenotípicos y aberración más frecuente:

CD27: positivo sobre células de CLL y una pequeña fracción de células B normales

CD5: positivo sobre células de CLL y una pequeña fracción de células B normales

CD79b: subexpresado sobre células de CLL en comparación con linfocitos B maduros y de transición normales

CD22: subexpresado sobre células de CLL en comparación con linfocitos B maduros y de transición normales

CD20: subexpresado sobre células de CLL en comparación con linfocitos B maduros y de transición normales

CD200: sobreexpresado sobre células de CLL en comparación con linfocitos B maduros y de transición normales

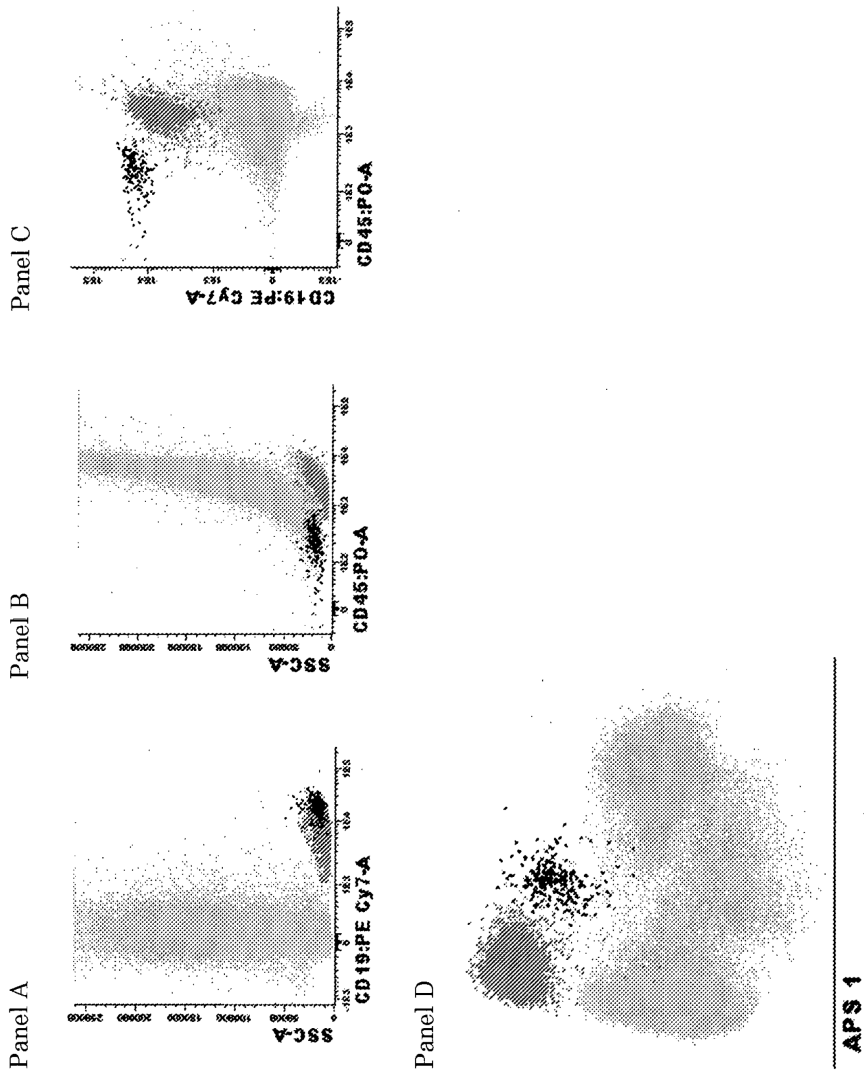
- ROR1: sobreexpresado sobre células de CLL en comparación con linfocitos B maduros y de transición normales
- 5 CD43: sobreexpresado sobre células de CLL en comparación con linfocitos B maduros y de transición normales
- CD81: subexpresado sobre células de CLL en comparación con precursores de célula B y ambos linfocitos B maduros y de transición
- 10 CD38: subexpresado sobre células de CLL en comparación con precursores de célula B
- Ejemplo 3. Paneles de anticuerpo y método de diagnóstico para detección de MRD en pacientes con MM/PCD
- Marcadores para identificación de células de plasma totales en médula ósea:
- 15 Lista de marcadores de identificación: CD38, CD 138 y CD229
- Cómo utilizarlos: Cualquier combinación de los tres marcadores en cualquier trabajo de posición con fluorocromos; también es posible utilizar cualquier combinación de dos de los tres marcadores o en un subconjunto de casos (no todos) incluso solo uno de los tres marcadores. Las combinaciones preferidas tienen el siguiente orden: 1) CD138/CD38/CD229; 2) CD138/CD38, 3) CD138/CD229; 4) CD38/CD229; 5) CD138; 6) CD38; 7) CD229. Tenga en cuenta que cualquiera de estos marcadores se puede utilizar individualmente y en combinación en combinación también con dispersión lateral de luz (SSC) o dispersión de luz frontal (FSC) o ambas FSC y SSC para identificar las células de plasma de la médula ósea u otros tipos de muestras (por ejemplo, sangre periférica, biopsia de tejido, fluido espinal).
- 20
- 25 Marcadores para distinguir células de plasma normales vs clonales/malignas:
- Lista de marcadores y aberración fenotípica más frecuente:
- 30 CD38: subexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- CD27: subexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- CD45: subexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- 35 CD 19: subexpresado (usualmente negativo) en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- CD81: subexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- 40 CD56: sobreexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- CD28: sobreexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- 45 CD 117: sobreexpresado en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales
- Cylgk y Cylglambda: expresión a una cualquiera de las otras cadenas ligeras Ig en células de plasma malignas mientras que se muestra una distribución balanceada (la relación de Cylgk/Cylglambda en células de plasma normales usualmente varía entre relaciones 3 y 0.5).
- 50 SSC: aumento o reducción de intensidad en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales.
- FSC: aumento o reducción de intensidad en células de plasma malignas en comparación con células de plasma normales.
- 55

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición de reactivo para detección por citometría de flujo de precursor de célula B ALL (BCP-ALL) en un sujeto humano, que comprende un panel de por lo menos ocho anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos, el panel comprende por lo menos anticuerpos contra los marcadores de núcleo CD10, CD19, CD20, CD34 y CD45, y en donde el panel adicionalmente comprende uno o más anticuerpos seleccionados del grupo de anticuerpos contra CD38, CD81, Cylgu, y desoxinucleotidil transferasa (NuTdT), y en donde el panel adicionalmente comprende uno o más conjuntos de anticuerpos seleccionados de
- 10 (a) conjunto de anticuerpos contra CD66c y CD123;
- (b) conjunto de anticuerpos contra CD304 y CD73; y
- 15 (c) conjunto de anticuerpos contra Smlgk y Smlgl.
- en donde los anticuerpos dentro de cada conjunto se conjugan al mismo fluorocromo y en donde entre diferentes conjuntos los fluorocromos son distinguibles.
- 20 2. Composición de reactivo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el panel comprende dos o más conjuntos de anticuerpos seleccionados de
- (a) conjunto de anticuerpos contra CD66c y CD123;
- 25 (b) conjunto de anticuerpos contra CD304 y CD73; y
- (c) conjunto de anticuerpos contra Smlgk y Smlgl.
- 30 3. Composición de reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos dirigidos contra una de las siguientes combinaciones de marcadores:
- (i) CD20, CD45, CD81, CD66c, CD123, CD34, CD19, CD10 y CD38,
- en donde los anticuerpos contra CD66c y CD123 se conjugan al mismo fluorocromo;
- 35 (ii) CD20, CD45, CD81, CD304, CD73, CD34, CD19, CD10 y CD38,
- en donde los anticuerpos contra CD304 y CD73 se conjugan al mismo fluorocromo;
- 40 (iii) CD20, CD45, NuTdT, Smlgk, Smlgl, Cylgu, CD19, CD34 y CD10,
- en donde los anticuerpos contra Smlgk y Smlgl se conjugan al mismo fluorocromo.
- 45 4. Composición de reactivo de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos dirigidos contra los marcadores CD20, CD45, CD81, NuTdT, CD66c, CD123, CD304, CD73, CD34, CD19, CD10 y CD38, y uno o más conjuntos de anticuerpos seleccionados de
- (a) conjunto de anticuerpos contra CD66c y CD123;
- 50 (b) conjunto de anticuerpos contra CD304 y CD73; y
- (c) conjunto de anticuerpos contra Smlgk y Smlgl,
- en donde los anticuerpos dentro de cada conjunto se conjugan al mismo fluorocromo.
- 55 5. Composición de reactivo de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende anticuerpos conjugados a fluorocromo distintos dirigidos contra los marcadores CD20, CD45, CD81, NuTdT, CD66c, CD123, CD304, CD73, Smlgk, Smlgl, Cylgu, CD34, CD19, CD10 y CD38, en donde los anticuerpos contra cada uno de los conjuntos CD66c/CD123, CD304/CD73 y Smlgk/ Smlgl se conjugan al mismo fluorocromo.
- 60 6. Un kit de diagnóstico para detección por citometría de flujo de enfermedad residual mínima (MRD), que comprende por lo menos una composición de reactivos de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, opcionalmente junto con instrucciones para uso, regulador, y/o muestras de control.
- 65 7. Un método de citometría de flujo multi-color para detectar enfermedad residual mínima (MRD) en una muestra biológica que comprende células, preferiblemente linfocitos, que comprenden las etapas de:

- (i) teñir la muestra con una composición de reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
 - (ii) someter la muestra a citometría de flujo;
 - 5 (iii) activar sobre células para expresión de los marcadores seleccionados detectados por los anticuerpos presentes en la composición de reactivo; y
 - (iv) distinguir entre células normales y malignas, con base en el perfil de expresión de los marcadores múltiples.
- 10 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la etapa (iv) involucra análisis multivariante, preferiblemente análisis de componente principal (PCA).

Figura 1



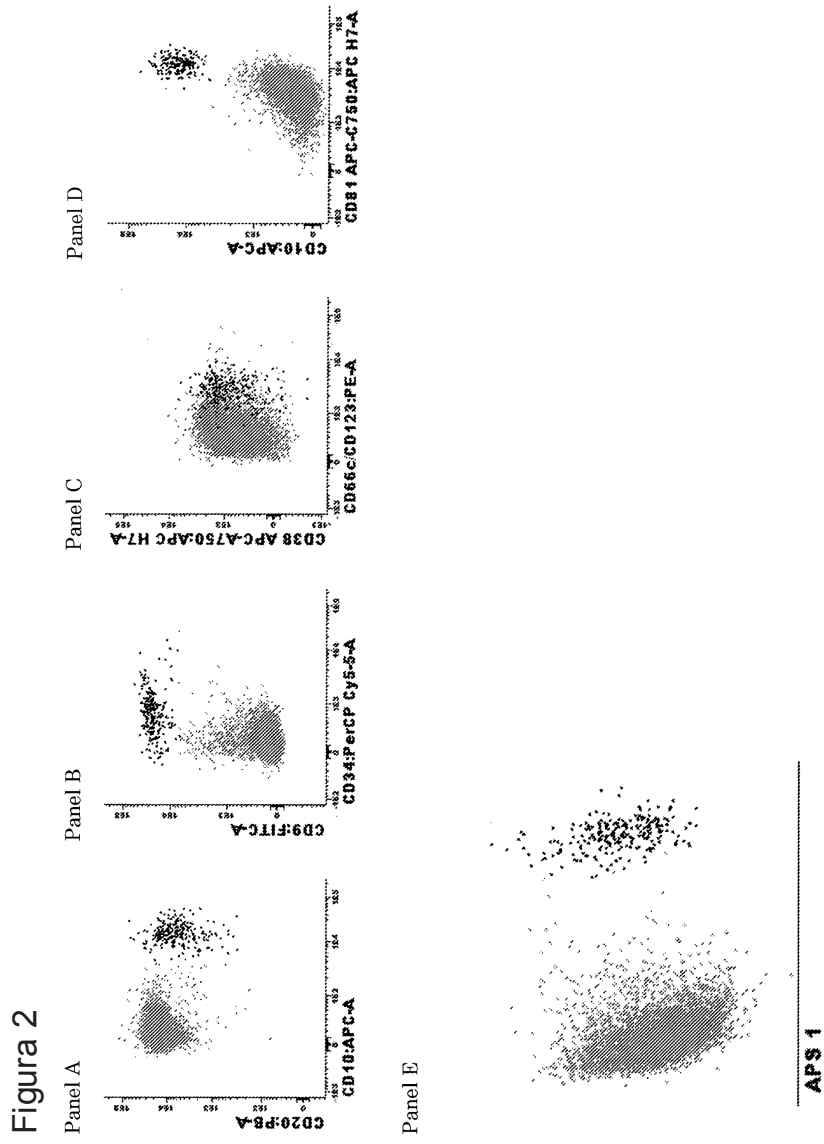
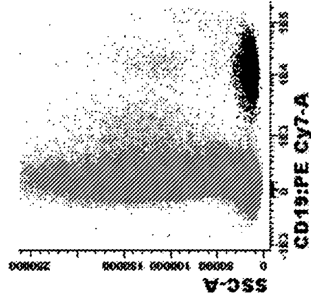
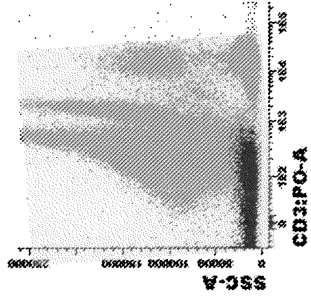


Figura 3

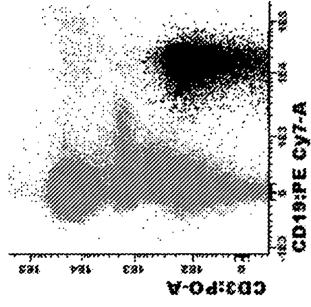
Panel A



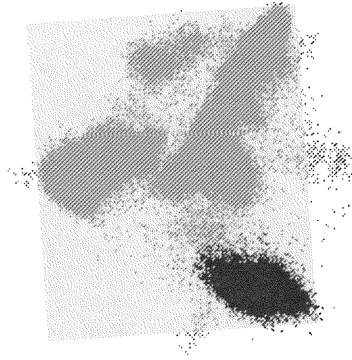
Panel B



Panel C



Panel D



APS 1

Figura 4

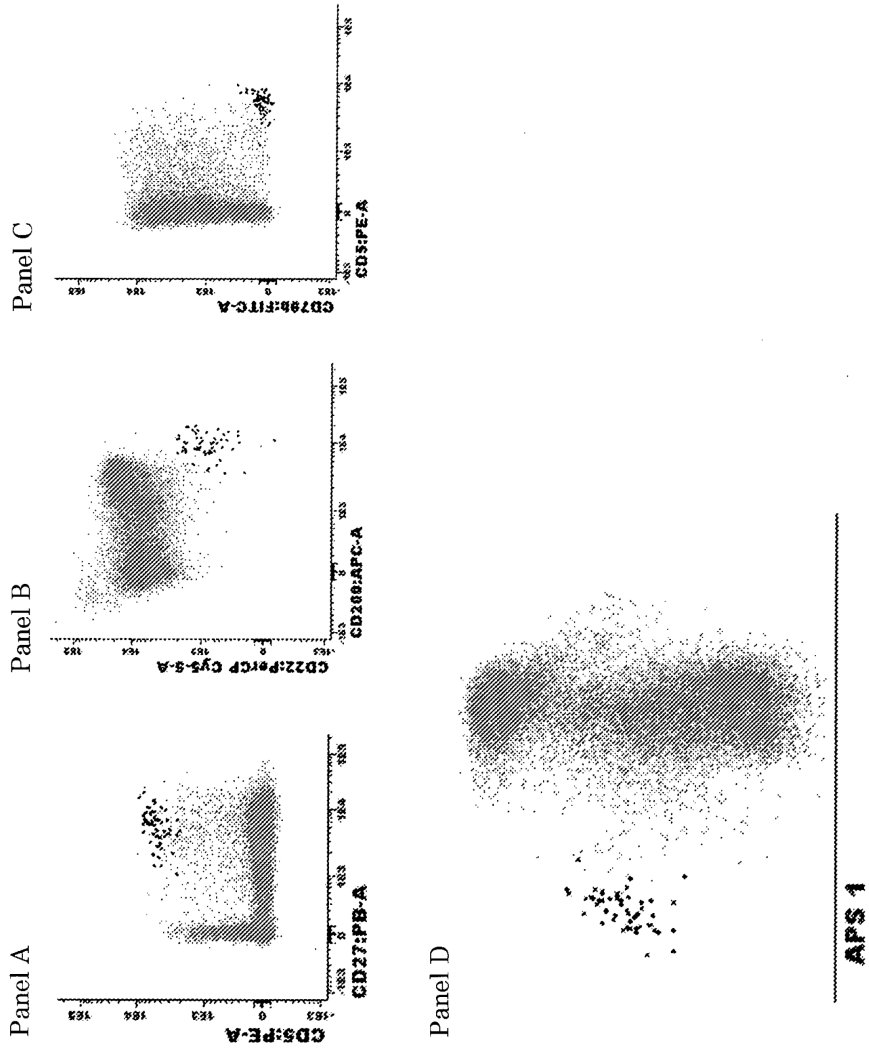


Figura 5

