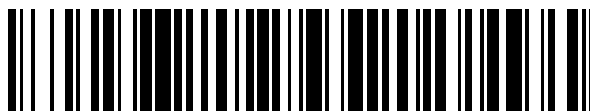


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 952**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010 E 14158924 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2743698**

54 Título: **Métodos, reactivos y kits para inmunofenotipado por citometría de flujo**

30 Prioridad:

03.06.2009 EP 09161870

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GD 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;
RAWSTRON, ANDREW CRAIG;
DE TUTE, RUTH MARY;
LHERMITTE, LUDOVIC BERNARD SIMON;
ASNAFI, VAHID;
MEJSTRÍKOVÁ, ESTER;
SZCZEPANSKI, TOMASZ;
MONTEIRO DA SILVA LUCIO, PAULO JORGE;
AYUSO, MARTA MARÍN y
PEDREIRA, CARLOS EDUARDO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 627 952 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 inmunofenotipado por citometría de flujo

5 La invención se relaciona con el campo de la citometría de flujo y más particularmente con un panel de reactivos de anticuerpo conjugado con compuestos fluorescentes. Encuentran su uso en la caracterización inmunofenotípica de células normales, reactivas, regeneradoras y neoplásicas en sangre periférica (PB), médula ósea (BM), derrame pleural, ascitis, fluido cerebroespinal (CSF), humor vítreo, fluido sinovial, lavado broncoalveolar, orina, bazo, hígado, nódulos linfáticos, y otras muestras de tejido. El inmunofenotipado por citometría de flujo de células normales, reactivas, regeneradoras y malignas (particularmente leucocitos) actualmente se usa para muchas aplicaciones en medicina, que incluyen

10 inmunología, hematología y oncología. Entre otras, dichas aplicaciones incluyen el monitoreo del sistema inmune; diagnóstico y clasificación de inmunodeficiencias primarias; inmunofenotipado de leucemias, linfomas y discrasias de células plasmáticas; monitoreo de frecuencias bajas de leucocitos malignos como medida de la efectividad del tratamiento; diagnóstico y monitoreo de trastornos clonales tales como hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) y mastocitosis; evaluación de la hematopoyesis o linfopoyesis en diferentes afecciones clínicas, por ejemplo, en individuos sanos, después de trasplante de células madre o terapia génica (por medio del uso de células precursoras hematopoyéticas como objetivo); y la evaluación de la composición y la calidad de los productos celulares que se usarán para fines terapéuticos.

20 El proceso de diagnóstico convencional en el inmunofenotipado por citometría de flujo típicamente se basa en el uso de paneles de anticuerpos. En la actualidad se recomiendan para aplicaciones específicas diferentes paneles de anticuerpos de superposición. Estos paneles se accionan ya sea por indicación médica (por ejemplo: detección de citopenias, caracterización de linfocitosis), por enfermedad (por ejemplo: diagnóstico de la leucemia aguda, diagnóstico de linfoma) o estado de la enfermedad (por ejemplo: clasificación diagnóstica de ALL vs. monitoreo de ALL para la evaluación de la efectividad del tratamiento). Ejemplos de paneles de anticuerpos recomendados están en la Red de Leucemia Europea (ELN) (1), los paneles del Consenso Internacional de Bethesda de 2006 (2) para diferentes subtipos de neoplasias malignas hematológicas, los paneles de EGIL para la asignación de linaje y subclasificación de las leucemias agudas (3), los paneles de la Red Europea de Mieloma (EMN) para el diagnóstico, clasificación y monitoreo de discrasias de células plasmáticas (4), los paneles de puntuación de ERIC (5)

30 y Matutes (6) para la subclasificación inmunofenotípica de leucemia linfocítica crónica y leucemia de células peludas vs. otros trastornos linfoproliferativos crónicos.

Estos paneles de anticuerpos recomendados son en su mayoría comparables entre los diferentes países y grupos de estudio, pero nunca totalmente idénticos. Es importante destacar que las distintas redes y grupos de estudio han proporcionado poca o ninguna información sobre cómo los anticuerpos se deben

35 combinar preferentemente en un panel de reactivos de anticuerpos conjugados con compuestos de fluorescencia específicos. Sólo se han propuesto listas simples de anticuerpos, incluso cuando los laboratorios de diagnóstico pueden teñir simultáneamente una alícuota de la muestra con 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más anticuerpos conjugados con diferentes colorantes fluorescentes que tienen emisiones de fluorescencia que se pueden medir por separado. Las variaciones entre centros de todo el mundo se

40 deben al uso de:

- Listas comparables pero no idénticas de anticuerpos y clones de anticuerpos;
- Los mismos anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos que muestran diferentes sensibilidades. Por ejemplo, un reactivo de anticuerpo podría proporcionar un resultado negativo si el anticuerpo se combina con un fluorocromo de baja sensibilidad, mientras que un resultado positivo se

45 podría obtener si un reactivo de anticuerpo que consiste en el mismo anticuerpo combinado con un fluorocromo diferente, más sensible, se usa para teñir las mismas células.

- Evaluación simultánea de diferentes combinaciones de reactivos de anticuerpo.
- Estrategias variables y frecuentemente subóptimas o inadecuadas para la identificación de la población(s) de células de interés, tales como la selección de CD45 en leucemias mieloblásticas agudas.

50 Como consecuencia, los paneles de anticuerpos aparentemente comparables no resultan en un diagnóstico comparable de muestras clínicas. De hecho, la reproducibilidad entre laboratorios de diagnóstico no es mayor que 70%. Desafortunadamente, los diagnósticos fallan debido a la distinción inapropiada entre células normales y malignas o la regeneración de la médula ósea se diagnostica erróneamente como recurrencia de la leucemia aguda.

55 En la patente de Estados Unidos núm. 5,047,321, Loken y Terstappen describen un procedimiento para el análisis multiparamétrico de componentes celulares en PB y BM. Con el procedimiento descrito, estos inventores podrían distinguir varios componentes celulares de PB y BM, contar el número de células dentro de cada componente, y proporcionar un análisis diferencial de cada uno de ellos basado en el uso combinado del colorante de ADN LDS-751 (excitón), el colorante de ARN tiazol naranja (TO, Molecular

Probes, Inc), un anticuerpo monoclonal anti-CD45 marcado fluorescentemente, dispersión frontal de la luz (FSC) y dispersión lateral de la luz (SSC). Este enfoque permite la identificación específica de las células rojas nucleadas, eritrocitos, reticulocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos, granulocitos neutrófilos, granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos y precursores de todas las células hematopoyéticas nucleadas. Sin embargo, el análisis multiparamétrico descrito no podría diferenciar específicamente entre las células normales, reactivas, regeneradoras y neoplásicas que coexisten en la misma muestra, ni este procedimiento podría caracterizar adicionalmente estos grupos de células. Un perfeccionamiento adicional de esta patente se describió después en la patente de los Estados Unidos núm. 6,287,791 de Terstappen y Chen, pero ellos no demostraron ninguna mejora en la caracterización de diferentes poblaciones de leucocitos.

Más recientemente, Orfao y otros describieron en la patente de Estados Unidos núm. 7,332,295 un procedimiento para el análisis diferencial de leucocitos multidimensional de PB, BM y otros fluidos corporales, que permiten específicamente la identificación de células dendríticas y sus subconjuntos adicionalmente a las células rojas nucleadas, linfocitos, monocitos, granulocitos neutrófilos, granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos y precursores hematopoyéticos de todas las células nucleadas. Además, en la patente de los Estados Unidos núm. 5,538,855, Orfao y otros describen un procedimiento que permite un análisis más detallado de los compartimentos linfoides a través de la identificación simultánea de hasta 12 subconjuntos diferentes de muestras de células T, B y NK en PB, BM y nódulos linfáticos. En la patente, Orfao y otros usaron una tinción combinada para los antígenos CD3, CD19, CD56 (y/o CD16), CD4 y CD8 en una única tinción de 3 colores, donde se usaron pares de anticuerpos monoclonales conjugados con el mismo fluorocromo. Sin embargo, a través de este enfoque ni podrían caracterizar adicionalmente los subconjuntos de células identificadas ni distinguir entre las células normales y neoplásicas; además, algunos subconjuntos relevantes de células linfoides y no linfoides (por ejemplo, las células T-TCR $\gamma\delta^+$) presente en un PB, BM u otros tejidos y fluidos corporales normales, no se podrían detectar específicamente.

Ninguno de los procedimientos mencionados admite directamente una caracterización más detallada de las células identificadas, que incluye la distinción entre las poblaciones de células normales, reactivas, regeneradoras, y neoplásicas/clonales. Tal caracterización y distinción requiere el uso de un mayor número de tinciones asociadas con emisiones de fluorescencia distinguibles y de instrumentos de citometría de flujo capaces de medir un mayor número de emisiones de fluorescencia diferentes.

Muchas otras publicaciones muestran que, basado en perfiles inmunofenotípicos específicos, las células normales se pueden distinguir a partir de sus homólogas neoplásicas, y que las capacidades de distinción (sensibilidad para distinguir células normales de clonales/malignas) aumentan con el número de reactivos de anticuerpo conjugados con fluorocromos usados para teñir la misma muestra. Algunos informes además muestran que las células normales y reactivas así como células de maduración durante la regeneración de BM, pueden mostrar perfiles inmunofenotípicos diferentes, pero estas células no se podrían distinguir claramente de las células malignas. Es importante destacar que, los paneles de combinaciones de anticuerpos que se han propuesto hasta ahora no pueden distinguir eficazmente entre las poblaciones de células normales, reactivas, regeneradoras y sus homólogas neoplásicas de una manera sistemática y, al mismo tiempo, permitir una clara distinción entre las diferentes categorías de diagnóstico de enfermedades a través de una caracterización inmunofenotípica prolongada de las células malignas.

Con la introducción de la nueva generación de citómetros de flujo multi-láser en los laboratorios de diagnóstico, el espacio potencial para la construcción de diferentes paneles, aun con la misma lista de anticuerpos, ha aumentado de manera exponencial debido a la posibilidad de usar un mayor número de diferentes compuestos fluorescentes y simultáneamente medir un mayor número de emisiones de fluorescencia en las células individuales. En la patente de Estados Unidos núm. 7,321,843, Orfao, Pedreira y Sobral da Costa proponen un nuevo enfoque basado en los procedimientos de cálculo matemático (por ejemplo, el principio del vecino más cercano), donde los archivos de datos en modo de lista de citometría de flujo que contenían información de cada célula individual medida sobre un número ilimitado de parámetros que se podrían generar, después de varias alícuotas de una muestra teñida con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales que se superponen parcialmente se midieron en un citómetro de flujo. La utilidad de este procedimiento se podría maximizar sólo con el aumento de las capacidades multicolor de los citómetros de flujo más recientes. Esto es porque estos procedimientos requieren el diseño de paneles eficientes de combinaciones de reactivos de anticuerpos monoclonales donde marcadores del esqueleto comunes se combinan con otros marcadores adicionales que varían para cada combinación de anticuerpos monoclonales en un panel. En paralelo, los mismos autores además describieron (patente de Estados Unidos núm. 7,507,548) un procedimiento de comparación de datos de citometría de flujo a partir de un caso contra un archivo de datos de referencia que permitiría la comparación directa de por ejemplo, células normales vs. neoplásicas. Sin embargo, en ambas patentes, los autores dejaron de proponer un amplio panel de anticuerpos que se pudiera aplicar total y sistemáticamente al diagnóstico, clasificación, estadificación y/o monitoreo de leucemia, linfoma y discrasias de células plasmáticas.

Braylan RC y otros, (Cytometry, Vol. 46, no. 1, pp.23-27, 2001) proporciona un inventario de marcadores que pueden usarse para evaluar neoplasias hematolinfoides. Se divulgan clasificaciones de marcadores para cuatro enfermedades diferentes. Sin embargo, Braylan et al. no divulga el uso del marcador β 2micro, y mucho menos una única composición reactiva que comprende la combinación de marcadores específicos de la presente invención.

El documento US 5,538,855 divulga un panel de cinco anticuerpos distintos conjugados con fluorocromo para el inmunofenotipado por citometría de flujo de linfocitos con un citómetro de flujo de tres colores. Entre los marcadores se encuentran CD56, CD3, CD4, CD8 y CD19, en donde los anticuerpos CD8/CD19 se conjugan a un primer fluorocromo, los anticuerpos CD3/CD56 se conjugan con un segundo fluorocromo y el anticuerpo CD4 con un tercer fluorocromo. El documento US5,538,855 no divulga anticuerpos contra CD45, CD138, CD38, β 2micro, Cylgk y Cylg λ .

Así, los protocolos existentes no enseñan sobre cómo combinar específicamente los anticuerpos monoclonales ampliamente recomendados en un panel; proponen diferentes paneles para la clasificación diagnóstica y monitoreo de la enfermedad mínima; se enfocan en grupos de enfermedades individuales, uniformes; muestran una eficacia limitada una vez que se han probado ampliamente; no proporcionan un modo de combinación directa de la información medida para varias alícuotas de una sola muestra; y/o han fracasado en distinguir sistemáticamente células normales/reactivas vs. clonales/neoplásicas basados en sus propiedades inmunofenotípicas, en enfermedades específicas, tales como trastornos linfoproliferativos T y NK crónicos (por ejemplo, en el diagnóstico diferencial de la leucemia linfocítica granular grande).

Los presentes inventores reconocieron estas dificultades, y salieron a diseñar paneles de anticuerpos bien definidos, mejorados, que eviten interpretaciones erróneas y mala interpretación de los resultados. Después de una cuidadosa selección de los marcadores pertinentes, el diseño de las combinaciones adecuadas de anticuerpos en tubos de múltiples colores, y la selección de fluorocromos adecuados (en base a la necesidad de brillo, compensación, estabilidad, etc.), se desarrolló un conjunto de reactivos de anticuerpos. Los estudios se complementaron con una extensa evaluación multicéntrica de los paneles de consenso con el fin de remodelar y lograr una eficiencia óptima.

Por consiguiente, la invención proporciona en una realización una composición reactiva para inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos que comprende al menos ocho anticuerpos conjugados con fluorocromo diferentes que comprende un conjunto de al menos tres anticuerpos de identificación para la identificación de una población de leucocitos de interés y al menos cuatro anticuerpos de caracterización para una caracterización adicional y/o la clasificación de dicha población de leucocitos. Una composición reactiva como se proporciona en la presente descripción comprende un panel de anticuerpos dirigidos contra la siguiente combinación de marcadores: (a) CD45, CD138, CD38, CD56, β 2micro, CD19, cylgk y cylg λ (composición reactiva de PCST).

En una realización preferida, la composición comprende anticuerpos monoclonales. El CD está para la designación del agregado y es una nomenclatura para la identificación de antígenos de superficie celular específicos, definidos por los anticuerpos monoclonales. Las abreviaturas usadas son como sigue: cylgk = cadena de IgG kappa citoplasmática; cylg λ = cadena de IgG lambda citoplasmática; β 2micro = β 2microglobulina; cyMPO = mieloperoxidasa citoplasmática. Los anticuerpos (monoclonales) contra los marcadores indicados pueden obtenerse comercialmente de varias compañías, que incluyen Becton/Dickinson (BD) Biosciences, Dako, Beckman Coulter, CYTOGNOS, Caltag, Pharmingen, Exbio, Sanquin, Invitrogen, y similares.

Los fluorocromos adecuados para conjugar los anticuerpos se conocen en la técnica. Como se entenderá, los fluorocromos usados dentro de una composición reactiva deben ser distinguibles por citometría de flujo. Los fluorocromos se seleccionan preferentemente por su brillo, superposición espectral limitada y necesidad limitada de compensación, estabilidad, etc. El siguiente panel de fluorocromos es de uso particular en una composición reactiva de acuerdo con la invención: (1) azul pacífico (PacB) u Horizon V450, (2) naranja pacífico (PacO) o AMCA, (3) isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa488, (4) ficoeritrina (PE), (5) proteína clorofila peridina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-TexasRed, (6) ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), (7) aloficocianina (APC) o Alexa647, y (8) aloficocianina/H7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680 o Alexa700. Después de varias rondas de pruebas, los presentes inventores observaron que se pueden obtener muy buenos resultados si se eligen los siguientes fluorocromos: azul pacífico u Horizon V450, naranja pacífico, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina/cianina 5.5 (PerCp-Cy5.5), PE-Cy7, aloficocianina (APC), y APC-H7.

La expresión "en donde el anticuerpo dentro de los pares se conjuga al mismo fluorocromo" pretende indicar que ambos anticuerpos del primer par están conjugados al fluorocromo A y que ambos anticuerpos del segundo par están conjugados al fluorocromo B. Así, dentro de cada par los fluorocromos son los mismos pero entre los diferentes pares los fluorocromos son distinguibles.

La composición reactiva se puede usar tal como, por ejemplo, para la detección de una enfermedad linfocítica. Ver la Figura 2 para una visión general esquemática de aplicaciones ilustrativas de las distintas

composiciones reactivas. La invención así, además se refiere a kits diagnósticos que comprenden una o más composiciones reactivas. Sin embargo, las composiciones además se usan favorablemente en conjunto con una o más composiciones reactivas adicionales, particularmente las composiciones reactivas diseñadas para la detección y clasificación adicional de la enfermedad. La expresión "en conjunto con" no se refiere a la combinación física o mezcla de las composiciones reactivas, sino a su aplicación en sus etapas de análisis por separado (consecutivo) y la combinación de los datos obtenidos así. Por ejemplo, un tubo de detección usado en conjunto con un tubo de caracterización implica dos etapas de análisis separadas en alícuotas separadas de la misma muestra biológica, cada una por medio del uso de una de las composiciones reactivas, seguido por el registro y evaluación de datos.

10 Por lo tanto, la invención además se refiere a un conjunto de al menos dos composiciones reactivas, dicho conjunto que comprende una composición reactiva como la descrita en la presente descripción anteriormente, y al menos una composición reactiva adicional que comprende anticuerpos conjugados con fluorocromo diferentes. Así, ambas composiciones reactivas comprenden un panel de anticuerpos diferentes, aunque algunos anticuerpos pueden estar presentes en ambas composiciones. Es muy conveniente si el panel de fluorocromos diferentes es prácticamente el mismo para cada una de las composiciones reactivas, y que hasta ocho fluorocromos diferentes se usan en total.

15 En una realización, un conjunto de al menos dos composiciones reactivas comprende una composición reactiva definida en la presente descripción anteriormente (es decir, reactivo de PCST), junto con al menos una composición reactiva adicional que comprende anticuerpos conjugados con fluorocromo diferentes, preferentemente dirigidos contra una de las siguientes combinaciones de marcadores:

- (i) CD20, CD45, CD23, CD10, CD79b, CD19, CD200 y CD43;
- (ii) CD20, CD45, CD31, LAIR1, CD11c, CD19, IgM y CD81
- (iii) CD20, CD45, CD103, CD95, CD22, CD19, CXCR5 y CD49d
- (iv) CD20, CD45, CD62L, CD39, HLADR, CD19, CD27 y CD31
- 25 (v) CD4, CD45, CD7, CD26, CD3, CD2, CD28 y CD8
- (vi) CD4, CD45, CD27, CCR7, CD3, CD45RO, CD45RA y CD8
- (vii) CD4, CD45, CD5, CD25, CD3, CD11c y CD8
- (viii) CD4, CD45, CD57, CD30, CD3, CD11c y CD8
- (ix) CD4, CD45, cyPerforin, cyGranzyme, CD3, CD16, CD94 y CD8
- 30 (x) CD4, CD45, CD279, CD3 y CD8
- (xi) CD2, CD45, CD7, CD26, CD3, CD56, CD5 y CD19
- (xii) CD16, CD45, CD57, CD25, CD3, CD56, CD11c y CD19
- (xiii) HLADR, CD45, cyPerforin, cyGranzyme, CD3, CD56, CD94 y CD19; o
- (xiv) CD45, CD138, CD38, CD28, CD27, CD19, CD117 y CD81

35 Conjuntos ilustrativos de composiciones reactivas incluyen al menos una composición reactiva según se expone en el tubo #3 de la Tabla 1 en la presente descripción más abajo, junto con al menos una composición reactiva según se expone en una cualquiera de las Tablas 2 -5.

40 Un aspecto adicional se refiere a un kit diagnóstico para inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos, en donde el kit comprende uno o más conjuntos de al menos dos composiciones reactivas descritas anteriormente. El kit puede comprender adicionalmente otros componentes útiles, tales como instrucciones para el uso, reactivo de preparación de la muestra, amortiguador, y/o muestras de control.

45 Las composiciones reactivas, conjuntos y kits diagnósticos proporcionados en la presente descripción encuentran su aplicación en distintos campos. Por ejemplo, los paneles propuestos se pueden aplicar en su totalidad o sólo en parte en dependencia de la naturaleza de la muestra, la indicación médica o el objetivo específico. El panel puede usar reactivos de anticuerpos monoclonales específicos de uno solo o varios fabricantes diferentes, en conjunto con diferentes técnicas de preparación de células para la tinción sólo de la superficie celular y/o la superficie celular más los marcadores intracelulares. De manera similar, las composiciones reactivas se pueden mejorar en un panel que incluye combinaciones que contienen reactivos de anticuerpos monoclonales conjugados con > 8 fluorocromos diferentes donde los mismos marcadores del esqueleto se mantienen y se combinan con marcadores adicionales o similares. Una composición de anticuerpo además puede actuar como un panel de base al cual se añaden nuevas combinaciones con diferentes objetivos, que incluyen el monitoreo del sistema inmune.

5 En una realización, se proporciona un kit diagnóstico para la identificación y caracterización de células linfoides maduras, que comprende la composición reactiva de PCST junto con al menos una composición reactiva para detectar trastornos linfoproliferativos crónicos de células B (B-CLPD) que comprende anticuerpos contra CD20, CD45, CD7, CD26, CD3, CD2, CD28 y CD8; CD4, CD45, CD27, CCR7, CD3, CD45RO, CD31, LAIR1, CD11c, CD19, IgM y CD81; CD20, CD45, CD103, CD95, CD22, CD19, CXCR5 y CD49d; o CD20, CD45, CD62L, CD39, HLADR, CD19, CD27 y CD31.

10 Por ejemplo, se proporciona un kit diagnóstico para la identificación y caracterización de células linfoides maduras, que comprende la composición reactiva de PCST junto con al menos una composición reactiva para detectar trastornos linfoproliferativos crónicos de células T (T-CLPD) que comprende anticuerpos contra CD4, CD45, CD7, CD26, CD3, CD2, CD28 y CD8; CD4, CD45, CD27, CCR7, CD3, CD45RO, CD45RA y CD8; CD4, CD45, CD5, CD25, CD3, CD11c y CD8; CD4, CD45, CD57, CD30, CD3, CD11c y CD8; CD4, CD45, cyPerforin, cyGranzyme, CD3, CD16, CD94 y CD8; o CD4, CD45, CD279, CD3 y CD8.

15 Otro kit diagnóstico ilustrativo para la identificación y caracterización de células linfoides maduras comprende la composición reactiva de PCST junto con al menos una composición reactiva para detectar trastornos linfoproliferativos crónicos de células NK (NK-CLPD) que comprende anticuerpos contra CD2, CD45, CD7, CD26, CD3, CD56, CD5 y CD19; CD16, CD45, CD57, CD25, CD3, CD56, CD11c y CD19; HLADR, CD45, cyPerforin, cyGranzyme, CD3, CD56, CD94 y CD19; CD45, CD138, CD38, CD56, β 2micro, CD19, cylgk y cylg λ ; o CD45, CD138, CD38, CD28, CD27, CD19, CD117 y CD81.

20 En otra realización, se proporciona un kit diagnóstico para la identificación y caracterización de células linfoides maduras, que comprende la composición reactiva de PCST junto con al menos una composición reactiva para detectar discrasias de células plasmáticas (PCD) que comprende anticuerpos contra CD45, CD138, CD38, CD56, β 2micro, CD19, cylgk y cylg λ ; o CD45, CD138, CD38, CD28, CD27, CD19, CD117 y CD81.

25 La invención se relaciona además con un método para el inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos, que comprende las etapas de proporcionar una muestra biológica que comprende leucocitos y contactar al menos una porción (alícuota) de la muestra con una composición reactiva proporcionada en la presente descripción. Se puede usar cualquier tipo de muestra (humana) conocida o que se sospecha que contiene leucocitos. Por ejemplo, la muestra es sangre periférica, médula ósea, muestra de tejido tal como nódulos linfáticos, adenoide, bazo, o hígado, u otro tipo de fluido corporal tal como fluido cerebroespinal, fluido vítreo, fluido sinovial, efusiones pleurales o ascitis. Preferentemente, el método comprende contactar una primera alícuota de dicha muestra con una primera composición reactiva de un conjunto de acuerdo con la invención y contactar al menos una segunda alícuota de dicha muestra con una composición reactiva adicional de dicho conjunto; analizar los leucocitos en dichas alícuotas en citómetro de flujo; y almacenar y evaluar los datos obtenidos. Típicamente, la etapa (c) comprende el uso del software para la integración de datos y el análisis multidimensional de los archivos de citometría de flujo. El software disponible comercialmente de CYTOGNOS SL (Salamanca, España) bajo el nombre comercial INFINICYT™ es muy adecuado para el uso en un procedimiento de la invención. El software INFINICYT™ puede combinar automáticamente la información inmunofenotípica de las poblaciones de células seleccionadas a partir de múltiples tubos de acuerdo con los llamados cálculos de vecinos más cercanos en los que las células individuales a partir de una alícuota de una muestra se comparan con las correspondientes células individuales a partir de otra alícuota de la misma muestra, de acuerdo con sus marcadores del esqueleto y el perfil de dispersión. El procedimiento INFINICYT puede transformar los paneles EuroFlow de 8 colores presentados en la presente descripción en inmunotinciones de 12, 16, o \geq 20 colores, dependiente del número de tubos por panel y el número de marcadores del esqueleto por tubo. Los paneles de anticuerpos y el software INFINICYT se puede usar en conjunto con todos los citómetros de flujo actualmente disponibles que permiten inmunotinciones de 8 colores, tales como FACSCanto™ II, FACSAria, LSRII, DAKO CyAn™, Gallio, etc.

Legenda de las figuras

Figura 1. Composición de tres categorías de los paneles de anticuerpo

50 Figura 2. Diagrama de proceso diagnóstico que muestran las aplicaciones potenciales de los paneles de anticuerpo EuroFlow.

Descripción detallada

1. Introducción

55 El presente estudio se realizó por el Consorcio EuroFlow (LSHB-CT-2006-018708) quien inició el proyecto "citometría de flujo para el diagnóstico rápido y sensible y el seguimiento de neoplasias malignas hematológicas", que incluye el diseño de protocolos de inmunofenotipado multicolor estandarizados para el diagnóstico, clasificación, y monitoreo de leucemias, linfomas y discrasias de células plasmáticas. Un componente innovador clave de estos protocolos son los paneles EuroFlow de combinaciones de anticuerpos (paneles EuroFlow). Esta invención EuroFlow se refiere entre otros a los paneles de

combinaciones de reactivos de anticuerpos (composiciones reactivas), que se pueden usar para definir las células normales, reactivas, regeneradoras y hematopoyéticas malignas de una manera estandarizada. Como tal, permiten un diagnóstico inmunofenotípico extenso, clasificación, estadificación y monitoreo de leucemias tanto crónicas como agudas, síndromes mielodisplásicos, trastornos mieloproliferativos, mastocitosis, hemoglobinuria paroxística nocturna, linfomas y discrasias de células plasmáticas. Por primera vez, los paneles propuestos no se basan en opiniones subjetivas de expertos, sino que se han probado de forma prospectiva y modificado para mejorar la respuesta a las indicaciones médicas más frecuentes de inmunofenotipado por citometría de flujo. A su vez, estos paneles están diseñados de una manera innovadora para aplicarse en conjunto tanto con el enfoque de análisis de datos convencional y nuevos procedimientos de análisis de datos interactivos y semiautomáticos en los que la información sobre las células individuales se combina para todos los parámetros derivados a partir de la medición de la tinción de una muestra con el panel de anticuerpo.

Para establecer estos paneles, se realizaron las siguientes etapas secuenciales:

1. Evaluación de todos los marcadores relevantes usados en el campo por su utilidad o valor añadido

- 15 -Marcadores propuestos por las redes europeas, tales como ELN, EMN, ERIC;
- Marcadores propuestos por el Consenso Internacional de Bethesda de 2006 en Estados Unidos;
- Nuevos marcadores de neoplasias malignas de células B maduras como los propuestos por Rawstron y otros.

20 2. Diseño y selección de combinaciones de marcadores (≥ 6), que pueden reconocer células normales vs. reactivas vs. regeneradoras vs. anormales/malignas dentro de un compartimento específico de células hematopoyéticas (linaje celular, vía de diferenciación, estadio de maduración, y/o subconjunto funcional).

3. Evaluación de los paneles de combinaciones de reactivos de anticuerpos propuestos en muestras primarias de sujetos sanos y pacientes.

25 4. Repetición de las pruebas y optimización de las combinaciones de reactivos de anticuerpos (elección de marcador, elección de clones de anticuerpos, y elección del fluorocromo) basado en los objetivos no comprometido y margen de mejora.

5. Evaluación de las versiones optimizadas de los paneles EuroFlow en gran serie de muestras de pacientes bien definidos y muestras de controles sanos.

30 En comparación con los conocimientos previos, este es el primer diseño de un panel integral (después de evaluado prospectivamente de forma multicéntrica), que permite tanto la discriminación entre células normales, reactivas, regeneradoras y clonales/neoplásicas y la clasificación, estadificación y monitoreo de los trastornos hematopoyéticos clonales/neoplásicos, que proporcionan una indicación clara sobre: 1) los marcadores necesarios para teñirlos en común para la identificación adecuada y reproducible de todas las poblaciones de células de interés en todas las alícuotas de una muestra, y 2) la forma en que deben combinarse con otros marcadores de caracterización adicionales en combinaciones específicas de reactivos de anticuerpos conjugados con fluorocromo. Adicionalmente, la información sobre los objetivos de cada combinación además se da como indicación sobre cuándo y cómo aplicarla. La invención se hizo sólo después de la prueba del panel de anticuerpo extensa y varios ciclos de rediseño.

40 Los paneles EuroFlow de reactivos están compuestos de subconjuntos de uno o múltiples combinaciones (llamados tubos) de anticuerpos conjugados con ocho o más compuestos fluorescentes, cada una de dichas combinaciones de reactivos tienen diferentes objetivos. Los paneles EuroFlow consisten en tres categorías diferentes: paneles de anticuerpos Categoría 1 Categoría 2 y Categoría 3 (Figura 1).

2. Categorías de paneles de anticuerpo

Los paneles EuroFlow de combinaciones de anticuerpos persiguen los siguientes propósitos:

- 45 Los paneles de anticuerpo de la Categoría 1 están dirigidos a la identificación y caracterización de diferentes subconjuntos de células linfoides maduras, que incluyen células normales, reactivas, regeneradoras y neoplásicas B, T, NK y células plasmáticas, particularmente en muestras donde se sospeche un trastorno linfocitoide clonal y/o neoplásico debido a por ejemplo, linfocitosis, aumento de los nódulos linfáticos, esplenomegalia, componente monoclonal en suero, síntomas neurológicos inexplicables, etc. Los paneles de anticuerpo de la Categoría 2 están dirigidos a la identificación y caracterización de células normales, reactivas, regeneradoras y linfocitos T y/o B neoplásicos inmaduros (o maduración temprana), particularmente en muestras que se sospecha que contienen precursores linfocitos neoplásicos. Los paneles de anticuerpo de la Categoría 3 están dirigidos a la identificación y caracterización de células normales, reactivas, regeneradoras e inmaduras neoplásicas, mieloides maduras y en maduración, particularmente en muestras que se sospecha que contienen células mieloides neoplásicas o células neoplásicas que expresan marcadores de asociación mielocitoide.

Dentro de cada una de dichas tres categorías, algunas de las combinaciones de reactivos de anticuerpos están dirigidas a usarse en una etapa de detección de un solo tubo con objetivos más amplios, mientras que otros se aplican muy probablemente en etapas de clasificación de múltiples tubos cuando las poblaciones objetivo más específicas ya se han identificado en la etapa de detección.

5 2.1 Paneles de anticuerpo Categoría 1

Los paneles de anticuerpo de la Categoría 1 se componen de tres tubos de detección que están dirigidos a la identificación y caracterización inicial de los subconjuntos específicos de células linfoides maduras presentes en muestras que contienen recuento de células normal o alto (por ejemplo, sangre periférica normal) y recuento de células bajo (por ejemplo, humor vítreo), respectivamente, y cuatro conjuntos diferentes de combinaciones de anticuerpos de múltiples tubos dirigidos a una caracterización adicional de las células B-, T-, NK- y las células plasmáticas. Los tubos de detección de la Categoría 1 se pueden usar para detectar la presencia de células clonales y neoplásicas T, B- o NK- y células plasmáticas en muestras con recuentos relativamente alto y bajo de células, respectivamente. Ejemplos típicos de muestras de recuentos de células bajos son las aspiradas con aguja fina (FNA), fluido cerebroespinal (CSF), y humor vítreo.

El tubo de detección mencionado anteriormente ahora se denomina tubo de detección de células plasmáticas (PCST). A su vez, los otros cuatro conjuntos de tubos se dedican, entre otros usos, a caracterizar adicionalmente las células clonales o neoplásicas B-, T-, NK- y las células plasmáticas en pacientes con diferentes trastornos linfoproliferativos crónicos de células B-, T- y NKs (abreviados como BCLPD, TCLPD y NKCLPD, respectivamente) y discrasias de células plasmáticas (abreviado como PCD), respectivamente.

2.2 Tipos de marcadores usados en los paneles EuroFlow

En cada tubo de los paneles EuroFlow, dos tipos de reactivos de anticuerpos se combinan: 1) reactivos que se dirigen principalmente a la identificación de las poblaciones celulares precisas de interés presentes en la muestra (marcadores del esqueleto), que además proporcionan información adicional sobre las características fenotípicas de dichas poblaciones de células, y; 2) reactivos dedicados principalmente a la caracterización/clasificación adicional de dichas poblaciones de células, así como otros grupos de células en la muestra (marcadores de caracterización).

Típicamente, los marcadores del esqueleto se repitieron en cada tubo de los siguientes conjuntos de tubos: AML/MDS/MPD, BCP-ALL, T-ALL, B-CLPD, T-CLPD, NK-CLPD, PCD). Adicionalmente, los marcadores del esqueleto del conjunto de tubos B-CLPD además son comunes a los tubos de detección de LST y SST, los marcadores del esqueleto del conjunto de tubos PCD son comunes al PCST, y los marcadores del esqueleto del conjunto de tubos BCP-ALL y el T-ALL además son comunes al ALOT; finalmente, dos de los marcadores del esqueleto en el panel AML (es decir.: CD34 y CD45) además son comunes al tubo ALOT.

A su vez, los marcadores de caracterización se combinan de una manera integral en cada tubo, de modo que permitirían distinguir las células normales, reactivas, regeneradoras vs clonales/neoplásicas, aun cuando estén presentes en números bajos y en el caso de las células neoplásicas que permitirían un diagnóstico adicional, subclasificación, estadificación y monitoreo de leucemias agudas y crónicas, linfomas y discrasias de células plasmáticas. Para este propósito en los paneles de múltiples tubos, cada tubo está dirigido a un objetivo específico relacionado a la completa caracterización y monitoreo de una entidad de enfermedad si se combina con la información del correspondiente tubo de detección (por ejemplo, para el diagnóstico, la estadificación y el monitoreo de CLL, el tubo #4 del panel de múltiples tubos de B-CLPD en conjunto con el LST será suficiente).

45 2.3 Herramientas del software INFINICYT para aplicación óptima de los paneles EuroFlow

Los paneles de anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden usar en conjunto con las herramientas del software INFINICYT que están disponibles comercialmente. El software se basa en los procedimientos descritos recientemente para la generación de archivos con un número ilimitado de parámetros a través de la fusión de los archivos de datos y el cálculo de la información derivada de la medición de marcadores en una alícuota de la muestra a las células individuales medidas en otras alícuotas de la misma muestra, por medio del uso de diferentes combinaciones de reactivos de anticuerpos que sólo tienen superposición parcial (US 7,321,843), así como para las comparaciones entre diferentes muestras o diferentes grupos de muestras (US 7,507,548).

3. Composición de los paneles de anticuerpos de la Categoría 1 para células linfoides maduras

55 En las combinaciones de múltiples tubos de reactivos de anticuerpo de los paneles de anticuerpo Categoría 1 para células linfoides maduras los marcadores del esqueleto comunes seleccionados varían entre los cuatro paneles diferentes y consisten de (anticuerpo CD más compuesto de fluorocromo número): 1) CD20-1, CD45-2 y CD19-6 para B-CLPD; 2) CD4-1, CD45-2, CD3-5 y CD8-8 para T-CLPD; 3)

ES 2 627 952 T3

CD45-2, CD3-5, CD56-6 y CD19-8 para NK-CLPD, y; 4) CD45-1, CD138-2, CD38-3 y CD19-6 para PCD. Adicionalmente, los marcadores del esqueleto usados en el tubo B-CLPD además se usan en los tubos de detección de LST y SST, y los marcadores del esqueleto de los tubos de PCD además se usan en la PCST.

5 Los marcadores del esqueleto en cada una de estas combinaciones de reactivos de anticuerpos de múltiples tubos se dirigen a proporcionar la delimitación de los grupos de células de interés y la identificación específica de las células neoplásicas en el diagnóstico y seguimiento de muestras que contienen suficientes cantidades de células tumorales. Adicionalmente, para cada una de las cuatro combinaciones de múltiples tubos, los marcadores del esqueleto se combinan con un número variable de marcadores de caracterización adicionales que contribuyen adicionalmente a la distinción entre células normales, reactivas, regeneradoras y neoplásicas/clonales B-, T, NK- y células plasmáticas, respectivamente, aun cuando éstas están presentes en una cantidad mínima (por ejemplo, monitoreo de la enfermedad residual mínima y estadificación de la enfermedad), así como para la distinción entre células clonales/neoplásicas de diferentes categorías de enfermedad.

15 3.1. El tubo de detección linfoide (LST), el tubo de muestra pequeña (SST), y el tubo de detección de células plasmáticas (PCST)

20 La composición reactiva de LST de EuroFlow se diseñó y aprobó para la evaluación de una serie de afecciones clínicas sospechosas, tales como linfocitosis, aumento de los nódulos linfáticos, esplenomegalia, componentes del suero monoclonales, síntomas neurológicos inexplicables, citopenias inexplicables, etc. (Figura 2). La composición de un tubo LST ilustrativo se proporciona en la Tabla 1. Este tubo detecta poblaciones de linfocitos maduros aberrantes del linaje B, T y NK. Sin embargo, esta tubo de 8 colores no permite el diagnóstico preciso y la clasificación de las poblaciones de linfocitos aberrantes detectados. Este típicamente necesita la caracterización adicional con tubos B-CLPD, T-CLPD, NK-CLPD y/o PCD (véase Secciones 3.2, 3.3 y 3.4).

25 La composición reactiva de SST de EuroFlow es una versión modificada de LST de EuroFlow, especialmente diseñada para la evaluación de las pequeñas muestras y muestras con (muy) bajos recuentos de células, tales como las aspiradas con aguja fina (FNA), fluido cerebroespinal (CSF), humor vítreo, etc. Para este objetivo especial, el tubo permite el reconocimiento inequívoco de los leucocitos normales presentes en estas muestras, por ejemplo, células B, T, NK y monocitos así como cualquier población celular aberrante coexistente. La composición de un reactivo SST ilustrativo se proporciona en la Tabla 1.

30 La composición reactiva PCST de EuroFlow está especialmente diseñada para la detección de células plasmáticas con el fin de detectar aberraciones o clonalidad. En el caso de las células plasmáticas aberrantes o clonales, la caracterización fenotípica complementaria se logra a través del panel de anticuerpo PCD de 2 tubos.

35 En cualquiera de las Tablas de la presente solicitud, el fluorocromo número 1 corresponde a azul pacífico (PacB) u Horizon V450, el número 2 a naranja pacífico (PacO) o AMCA, el número 3 a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa488, el número 4 a ficoeritrina (PE), el número 5 a proteína clorofila peridina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-Texas Red, el número 6 a ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), el número 7 a alofocianina (APC) o Alexa647, y el número 8 a alofocianina/H7 (APC-H7), APC-Cy, Alexa680 o Alexa700. Una combinación preferida es azul pacífico (PacB), naranja pacífico (PacO), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), alofocianina (APC), y alofocianina/H7 (APC-H7).

45 TABLA 1. Combinaciones de detección de un solo tubo de EuroFlow para células linfoides maduras normales y malignas/aberrantes

Fluorocromo	1	2	3	4	5	6	7	8
Tubo#								
1								
(LST)	CD20 ^{BB} y CD4	CD45 ^{BB}	Igλ y CD8	Igκ CD56	y CD5	CD19 ^{BB} y TCRγδ	CD3	CD38
2								
(SST)	CD20 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD8 y Igλ	CD56	y CD4	CD19 ^{BB}	CD3 y	CD38

ES 2 627 952 T3

Fluorocromo	1	2	3	4	5	6	7	8
Tubo#								
				Igκ			CD14	
3								
(PCST)	CD45 ^{BB}	CD138 ^{BB}	CD38 ^{BB}	CD56	β2micro	CD19 ^{BB}	CyIgκ	CyIgλ

BB =Estos marcadores actúan como marcadores del esqueleto cuando los resultados de LST o SST se combinan con los resultados obtenidos con la combinación de clasificación de EuroFlow de múltiples tubos para B-CLPD (véase la Tabla 2) o cuando los resultados de PCST se combinan con la combinación de clasificación de EuroFlow de 2 tubos para PCD (véase la Tabla 5); LST = tubo de detección linfoide; SST = tubo de muestra pequeña; PCST= tubo de detección de células plasmáticas.

3.2. El panel de anticuerpo de múltiples tubos para el trastorno linfoproliferativo crónico de las células Bs (B-CLPD)

5 El B-CLPD está diseñado para clasificar las neoplasias malignas de células B maduras de acuerdo con las entidades de la OMS basado en los datos de citometría de flujo solamente (véase la Tabla 2). La información obtenida por medio del uso de LST de forma simultánea o secuencial se tiene que integrar en el panel B-CLPB (por ejemplo, a través del software INFINICYT). El panel B-CLPD está diseñado para trabajar en los casos en los que la población de células B malignas se puede purificar a > 90% por medio del uso de los marcadores del esqueleto CD20, CD19, y CD45, independientemente del material celular analizado.

10 El panel está diseñado para trabajar de forma modular, es decir, no es necesario teñir todo el panel si la probabilidad de pre-prueba para una enfermedad maligna de células B en particular es alta. En esos casos el panel permitirá diagnosticar una entidad en particular por medio del uso de un número reducido de tubos. Por ejemplo, el tubo #1 de LST más tubo # 5 son suficientes para diagnosticar CLL con un alto valor predictivo positivo (PPV).

15 TABLA 2. Combinaciones de clasificación de EuroFlow de múltiples tubos para el trastorno linfoproliferativo crónico de las células Bs (B-CLPD)

	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
Tubo#									
4	CD20 ^{BB} y CD4	CD45 ^{BB}	Igλ y CD8	Igκ y CD56	CD5	CD19 ^{BB} y TCRγδ	CD3	CD38	LST: Detección de (casi) todas las neoplasias malignas de células B maduras
5	CD20 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD23	CD10	CD79b	CD19 ^{BB}	CD200	CD43	Identificación, de todos los casos de CLL
6	CD20 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD31	LAIR1	CD11c	CD19 ^{BB}	IgM	CD81	Identificación de todos los casos de HCL; caracterización de células B-, T-, NK-benignas
7	CD20 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD103	CD95	CD22	CD19 ^{BB}	CXCR5	CD49d	Identificación de DLBCL, FL, MZL, LPL
8	CD20 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD62L	CD39	HLADR	CD19 ^{BB}	CD27	CD31	Identificación de DLBCL, FL, MZL, LPL

ES 2 627 952 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
Tubo#									
BB = Marcador del esqueleto; Tubo 4 es idéntico al LST (véase Tabla 1). Los tubos descritos pueden además aplicarse exitosamente para la estadificación y monitoreo de la enfermedad.									

3.3. El panel de anticuerpo de múltiples tubos para los trastornos linfoproliferativos crónicos de células T (T-CLPD)

- 5 El T-CLPD de EuroFlow está dirigido al diagnóstico y clasificación de neoplasias malignas de células T maduras. Además para este panel, la información obtenida con LST de forma simultánea y secuencial se integra preferentemente con los tubos de T-CLPD (por ejemplo, a través de la armonización con el software INFINICYT). El panel está diseñado para trabajar en los casos en los que la población de células T malignas se puede purificar a > 90% por medio del uso de los marcadores del esqueleto CD3, CD4, CD8, y CD45, independientemente del material celular analizado. La combinación de tubos LST y T-CLPD
- 10 puede detectar neoplasias malignas de células T tanto de los linajes TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$.

TABLA 3. Combinaciones de clasificación de EuroFlow de múltiples tubos para trastornos linfoproliferativos crónicos de las células T (T-CLPD)

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
9	CD4 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD7	CD26	CD3 ^{BB}	CD2	CD28	CD8 ^{BB}	Caracterización fenotípica; Identificación del síndrome de Sezary
10	CD4 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD27	CCR7	CD3 ^{BB}	CD45RO	CD45RA	CD8 ^{BB}	Caracterización fenotípica; Evaluación de la etapa de maduración
11	CD4 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD5	CD25	CD3 ^{BB}	HLADR	cyTCL1	CD8 ^{BB}	Caracterización fenotípica; Identificación de T-PLL
12	CD4 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD57	CD30	CD3 ^{BB}		CD11c	CD8 ^{BB}	Caracterización fenotípica; Fenotipo citotóxico e identificación del linfoma anaplásico
13	CD4 ^{BB}	CD45 ^{BB}	cyPerforin	cyGranzyme	CD3 ^{BB}	CD16	CD94	CD8 ^{BB}	Caracterización fenotípica; Evaluación de fenotipos citotóxicos

ES 2 627 952 T3

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
									asociados;
									Identificación de T-LGL
14	CD4 ^{BB}	CD45 ^{BB}		CD279	CD3 ^{BB}			CD8 ^{BB}	Identificación de linfomas derivados de células T auxiliaadoras foliculares (linfomas angloinmunoblásticos de células T)

BB = Marcador del esqueleto; los tubos pueden además aplicarse exitosamente para la estadificación y monitoreo de la enfermedad.

3.4. El panel de anticuerpo de múltiples tubos para los trastornos linfoproliferativos crónicos de células NK (NK-CLPD)

5 El tubo NK-CLPD de EuroFlow está dirigido a la distinción entre células NK aberrantes y normales/reactivas. El panel NK-CLPD usa cuatro marcadores del esqueleto: CD45-2, CD3-5, CD56-6 y CD19-8. (NK-CLPD)

TABLA 4. Combinaciones de clasificación de EuroFlow de múltiples tubos para trastornos linfoproliferativos crónicos de células NK (NK-CLPD)

Tubo#	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo; MRD
15	CD2	CD45 ^{BB}	CD7	CD26	CD3 ^{BB}	CD56 ^{BB}	CD5	CD19 ^{BB}	Detección del fenotipo aberrante de célula NK
16	CD16	CD45 ^{BB}	CD57	CD25	CD3 ^{BB}	CD56 ^{BB}	CD11c	CD19 ^{BB}	Detección del fenotipo aberrante de célula NK
17	HLADR	CD45 ^{BB}	cyPerforin	cyGranzyme	CD3 ^{BB}	CD56 ^{BB}	CD94	CD19 ^{BB}	Detección del fenotipo aberrante de célula NK
									Evaluación de fenotipo efector citotóxico

BB = Marcador del esqueleto; los tubos pueden además aplicarse exitosamente para la estadificación y monitoreo de la enfermedad.

10 3.5. El panel de anticuerpo de múltiples tubos para discrasias de células plasmáticas (PCD)

15 El panel EuroFlow PCD comprende dos tubos con cuatro marcadores del esqueleto: CD45-1, CD138-2, CD38-3 y CD19-6 para PCD. (Tabla 5); tubo #18 es idéntico al PCST (tubo #3) en la Tabla 1. El panel PCD está dirigido a la identificación y enumeración de células plasmáticas así como a la distinción entre las células plasmáticas policlonales normales tales como en la plasmocitosis reactiva vs. células plasmáticas monoclonales aberrantes tales como en gammapatías monoclonales de importancia incierta

(MGUS), mieloma múltiple latente y sintomático (MM), leucemias de células plasmáticas (PCL), amiloidosis y plasmocitoma extramedular, y el diagnóstico diferencial entre estas discrasias de células plasmáticas. En combinación con los paneles EuroFlow LST y B-CLPD, este panel de anticuerpos de múltiples tubos contribuirá además al diagnóstico de otras discrasias de células plasmáticas tales como macroglobulinemia de Waldenström y linfoma linfoplasmácitico (LPL).

Tabla 5 Combinaciones de clasificación EuroFlow de múltiples tubos para discrasias de células plasmáticas (PCD)

Tubo#	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo;
18	CD45 ^{BB}	CD138 ^{BB}	CD38 ^{BB}	CD56	β2micro	CD19 ^{BB}	cyIgK	cyIgλ	PCST: Detección de células plasmáticas aberrantes y clonales
19	CD45 ^{BB}	CD138 ^{BB}	CD38 ^{BB}	CD28	CD27	CD19 ^{BB}	CD117	CD81	Caracterización fenotípica complementaria y evaluación de marcadores con impacto potencial en el pronóstico

BB = Marcador del esqueleto. Los tubos descritos además se pueden aplicar con éxito para la estadificación y el monitoreo de la enfermedad; Tubo #18 es idéntico al PCST (Tubo #3 en la Tabla 1).

REFERENCIAS

10 1.- Consensual European Immunophenotyping panels for leukemia. www.leukemia-net.org/content/home/.

2.- Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S14-22.

15 3.- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9:1783-6

4.- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE; European Myeloma Network. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2008;93:431-8.

20 5.- Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Colomer D, Moreno C, Geuna M, Evans PA, Natkunam Y, Coutre SE, Avery ED, Rassenti LZ, Kipps TJ, Caligaris-Cappio F, Kneba M, Byrd JC, Hallek MJ, Montserrat E, Hillmen P. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2007;21:956-64.

25 6.- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994;8:1640-5.

30

Reivindicaciones

1. Una composición reactiva para inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos que comprende al menos ocho anticuerpos conjugados con fluorocromo diferentes que comprende un conjunto de al menos tres anticuerpos de identificación para la identificación de una población de leucocitos de interés y al menos cuatro anticuerpos de caracterización para una caracterización adicional y/o la clasificación de dicha población de leucocitos, en donde los anticuerpos están dirigidos contra la siguiente combinación de marcadores:
- 5 CD45, CD138, CD38, CD56, β 2micro, CD19, Cylgk y Cylg λ .
2. Un conjunto de al menos dos composiciones reactivas, dicho conjunto que comprende una composición reactiva de acuerdo con la reivindicación 1 y al menos una composición reactiva adicional que comprende anticuerpos conjugados con fluorocromo diferentes dirigidos contra una de las siguientes combinaciones de marcadores:
- 10 (i) CD20, CD45, CD23, CD10, CD79b, CD19, CD200 y CD43
- (ii) CD20, CD45, CD31, LAIR1, CD11c, CD19, IgM y CD81
- 15 (iii) CD20, CD45, CD103, CD95, CD22, CD19, CXCR5 y CD49d
- (iv) CD20, CD45, CD62L, CD39, HLADR, CD19, CD27 y CD31
- (v) CD4, CD45, CD7, CD26, CD3, CD2, CD28 y CD8
- (vi) CD4, CD45, CD27, CCR7, CD3, CD45RO, CD45RA y CD8
- (vii) CD4, CD45, CD5, CD25, CD3, HLADR, cyTCL1 y CD8
- 20 (viii) CD4, CD45, CD57, CD30, CD3, CD11c y CD8
- (ix) CD4, CD45, cyPerforin, cyGranzyme, CD3, CD16, CD94 y CD8
- (x) CD4, CD45, CD279, CD3 y CD8
- (xi) CD2, CD45, CD7, CD26, CD3, CD56, CD5 y CD19
- (xii) CD16, CD45, CD57, CD25, CD3, CD56, CD11c y CD19
- 25 (xiii) HLADR, CD45, cyPerforin, cyGranzyme, CD3, CD56, CD94 y CD19; o
- (xiv) CD45, CD138, CD38, CD28, CD27, CD19, CD117 y CD81.
3. Composición reactiva o conjunto de composiciones reactivas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde cada composición reactiva comprende anticuerpos conjugados con azul pacífico (PacB) u Horizon V450, naranja pacífico (PacO) o AMCA, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa488, ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-TexasRed, ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), alofocianina (APC) o Alexa647, y alofocianina/H7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680 o Alexa700.
- 30 4. Conjunto de composiciones reactivas de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende al menos una composición reactiva como se describe en el Tubo#3 de la Tabla 1 junto con al menos una composición reactiva como se describe en cualquiera de las Tablas 2 -5.
- 35 5. Un kit diagnóstico para el inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos que comprenden un conjunto de al menos dos composiciones reactivas de acuerdo con las reivindicaciones 2-4, opcionalmente junto con instrucciones para usar, tampón, y/o muestras de control.
6. Kit diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 5 para la identificación y caracterización de células linfoides maduras, que comprende un conjunto de composiciones reactivas mencionadas en la
- 40 reivindicación 2 en el inciso (i) a (v); (vi) a (x) ; (xi) a (xiii); y/o (xiv).
7. Un método para el inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos, que comprende las etapas de
- (a) proporcionar una muestra biológica que comprende leucocitos;
- 45 (b) contactar una primera alícuota de dicha muestra con una primera composición reactiva de un conjunto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 y contactar al menos una segunda alícuota de dicha muestra con una composición reactiva adicional de dicho conjunto;
- (c) analizar los leucocitos en dichas alícuotas en un citómetro de flujo; y

(d) almacenar y evaluar los datos obtenidos.

8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha muestra es sangre periférica, médula ósea, muestra de tejido tal como, nódulos linfáticos, adenoide, bazo, o hígado, u otro tipo de fluido corporal tal como fluido cerebroespinal, fluido vítreo, fluido sinovial, efusiones pleurales o ascitis.

5

Figura 1

Paneles EuroFlow de combinaciones de anticuerpos

Categoría 1 Panel de linfoides maduras	Categoría 2 Panel de linfoides inmaduras	Categoría 3 Panel mielóide
Combinaciones de detección de un solo tubo - LST - SST - PCST	Combinaciones de detección de un solo tubo - ALOT	Combinaciones de detección de un solo tubo - ALOT
Combinaciones de clasificación de múltiples tubos - B-CLPD - T-CLPD - NK-CLPD - PCD	Combinaciones de clasificación de múltiples tubos - BCP-ALL - T-ALL	Combinaciones de clasificación de múltiples tubos - AML/MDS/MPD además adecuada para: - Mastocitos - PNH - ICUS

Figura 2

