(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 724 633**

(51) Int. CI.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010 E 17165543 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3206031**

(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:
12.09.2019

(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;
RAWSTRON, ANDREW CRAIG;
DE TUTE, RUTH MARY;
LHERMITTE, LUDOVIC BERNARD SIMON;
ASNAFI, VAHID;
MEJSTRÍKOVÁ, ESTER;
SZCZEPANSKI, TOMASZ;
MONTEIRO DA SILVA LUCIO, PAULO JORGE;
MARTIN AYUSO, MARTA y
PEDREIRA, CARLOS EDUARDO

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

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 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.

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) 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 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 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 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.

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.

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-TCRγδ+) 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.

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 las siguientes combinaciones de marcadores: (a) cyCD3, CD45, cyMPO, cyCD79a, CD34, CD19, CD7 CD3 (composición reactiva de ALOT).

Braylan et al. (Cytometry, Vol. 46, n. 1, pp.23-27, 2001) se relaciona con reactivos para el fenotipado de citometría de flujo de linfocitos. Se enseña que un conjunto de diez marcadores (CD10, CD19, CD13, CD33, CD34, CD45, CD7, CD14, CD3 y HLA-DR) que es esencial para evaluar la leucemia aguda. Se pueden añadir marcadores adicionales. Sin embargo, Braylan et al. falla en divulgar una composición de reactivo única que comprenda anticuerpos contra la combinación de marcadores específicos de la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, 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: cyIgκ = cadena de IgG kappa citoplasmática; cyIgλ = cadena de IgG lambda citoplasmática; β2micro =$\beta_2$microglobulina; 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 peridinina/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 peridinina/cianina 5.5 (PerCp-Cy5.5), PE-Cy7, aloficocianina (APC), y APC-H7.

La composición reactiva se puede usar tal como, por ejemplo, para la detección de una enfermedad linfoide. 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.

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.

En una realización, un conjunto de al menos dos composiciones reactivas que comprenden una primera composición reactiva como se define en la presente descripción anteriormente (es decir, reactivo de ALOT), y al menos una composición reactiva adicional que comprende anticuerpos conjugados con fluorocromo diferentes, dirigidos contra una de las siguientes combinaciones de marcadores:

(i) CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34, CD19, CD10 y CD38

(ii) IgK, CD45, cyIgμ, CD33, CD34, CD19, IgM, CD117 y Igλ, en donde los anticuerpos contra IgM y CD117 están conjugados al mismo fluorocromo

(iii) CD9, CD45, terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT), CD13, CD34, CD19, CD22 y CD24

(iv) CD21, CD45, CD15, CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123 y CD81, en donde los anticuerpos contra CD15 y CDw65 están conjugados al mismo fluorocromo

(v) cyCD3, CD45, TdT, CD99, CD5, CD10, CD1a y CD3

(vi) cyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7 y CD3

(vii) cyCD3, CD45, TCRγδ, TCRαβ, CD33, CD56, cyTCRβ y CD3

(viii) cyCD3, CD45, CD44, HLADR, CD45RA, CD123 y CD3

(ix) HLADR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b y CD10

(x) HLADR, CD45, CD35, CD64, CD34, CD117, receptor inmune expresado por la célula mieloide 2 (IREM2) y CD14

(xi) HLADR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33 y CD71

(xii) HLADR, CD45, CD15, sulfato de condroitina proteoglicano (NG2), CD34, CD117, CD7 y CD38

(xiii) HLADR, CD45, CD42a, CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123 y CD4, en donde los anticuerpos contra CD42a y CD61 están conjugados al mismo fluorocromo

(xiv) HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b y CD9

(xv) o

HLADR, CD45, TdT, CD56, CD34, CD117, CD22 y CD19.

Conjuntos ilustrativos de composiciones reactivas incluyen al menos la composición reactiva según se expone en el tubo #20 de la Tabla 2 en la presente descripción más abajo, junto con al menos una composición reactiva según se expone en una cualquiera de las Tablas 3 -5. También se proporciona un conjunto de composiciones de reactivos que comprenden al menos la composición de reactivos según se indica en el tubo # 20 de la Tabla 2, la composición de reactivos según se indica en el tubo # 1 de la Tabla 1, y las composiciones de reactivos tal como se describe en los tubos # 29, 30, 31 y 32 de la Tabla 5.

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.

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.

También se proporciona un kit de diagnóstico para la identificación y caracterización de células linfoides inmaduras, que comprende la composición del reactivo ALOT junto con al menos una composición del reactivo para detectar la ALL precursora de células B (BCP-ALL) que comprende anticuerpos contra CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34, CD19, CD10 y CD38; Igκ, CD45, cyIgμ, CD33, CD34, CD19, IgM, CD117 y Igλ, en donde los anticuerpos contra IgM y CD117 están conjugados al mismo fluorocromo; CD9, CD45, TdT, CD13, CD34, CD19, CD22 y CD24; o CD21, CD45, CD15, CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123 y CD81, en donde los anticuerpos contra CD15 y CDw65 están conjugados al mismo fluorocromo.

En un aspecto adicional, un kit de diagnóstico para la identificación y caracterización de células linfoides inmaduras comprende la composición del reactivo ALOT junto con al menos una composición del reactivo para detectar la ALL (T-ALL) precursora de células T que comprende anticuerpos contra cyCD3, CD45, TdT, CD99, CD10, CD1a y CD3; cyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7 y CD3; cyCD3, CD45, TCRγδ, TCRαβ, CD33, CD56, TCR βF1 y CD3; o cyCD3, CD45, CD44, HLADR, CD45RA, CD123 y CD3.

En un aspecto todavía adicional, se proporciona un kit de diagnóstico para la identificación y caracterización de células mieloides, que comprende la composición del reactivo ALOT junto con al menos una composición del reactivo para detectar leucemia mieloide aguda (LMA), síndrome mielodisplásico (MDS)/ trastorno mieloproliferativo crónico (MPD), que comprende anticuerpos contra HLADR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b y CD10; HLADR, CD45, CD35,

CD64, CD34, CD117, IREM2 y CD14; HLADR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33 y CD71; HLADR, CD45, CD15, NG2, CD34, CD117, CD7 y CD38; HLADR, CD45, CD42a, CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123 y CD4, en donde los anticuerpos contra CD42a y CD61 están conjugados al mismo fluorocromo; HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b y CD9; HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b y CD9; o HLADR, CD45, TdT, CD56, CD34, CD117, CD22 y CD19.

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 ≥ 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.

Leyenda de las figuras

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

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

Descripción detallada

1. Introducción

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

-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.

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.

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.

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.

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:

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 linfoide 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 linfoides T y/o B neoplásicas inmaduras (o maduración temprana), particularmente en muestras que se sospecha que contienen precursores linfoides 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 mieloide.

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.

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.

Los tubos de detección mencionados anteriormente ahora se denominan como tubo de detección linfoide para muestras de recuento celular alto (abreviado como LST), tubo de muestra pequeño (SST) para muestras de recuento celular bajo y un tubo de detección de células plasmáticas (PCST) separado. 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 Paneles de anticuerpos de categoría 2

Los paneles de anticuerpos de la Categoría 2 consisten en un tubo de detección dedicado a la identificación y caracterización iniciales de los precursores linfoides inmaduros frente a los no linfoides, y dos conjuntos de tubos para una caracterización más detallada de los precursores de células B y células T. Entre otras aplicaciones, el tubo de detección puede usarse para la clasificación de las leucemias agudas en leucemias linfoides versus no linfoides versus no diferenciadas versus leucemias agudas bifenotípicas o bilinajes. Este tubo también podría usarse para la discriminación entre los precursores de células B normales/regenerantes y neoplásicas/malignas en la médula ósea, la sangre periférica y otros tejidos y los precursores de células T en el timo, respectivamente. En consecuencia, este tubo de detección se denomina ahora tubo de orientación de leucemia aguda (abreviado ALOT). Los otros dos conjuntos de tubos se pueden usar, entre otras aplicaciones, para la caracterización de células blásticas linfoides que muestran compromiso de células B y células T en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (BCP-ALL) precursora de células B (BCP-ALL) y T-ALL así como en pacientes con leucemia aguda que muestran un fenotipo indiferenciado o bifenotípico/bilinaje.

2.3 Paneles de anticuerpos de categoría 3

Finalmente, los paneles de anticuerpos de la Categoría 3 están compuestos por un tubo de detección que tiene como objetivo discriminar entre células precursoras linfoides y no linfoides y que es idéntico al tubo de detección descrito anteriormente en la Categoría 2 (tubo ALOT), y un conjunto adicional de tubos que apuntan en la caracterización de células no linfoides maduras de los primeros precursores hematopoyéticos a células mieloides maduras, incluidas las diferentes etapas de maduración de las células comprometidas con los linajes de células eritroides, megacariocíticas, monocíticas, neutrófilas, eosinófilas, basófilas, mastocitos y dendríticas, así como los precursores hematopoyéticos y células estromales más inmaduros y no comprometidos en caso de que estén presentes en la muestra (por ejemplo, en BM). Entre otros usos, este conjunto de tubos se puede aplicar para la caracterización de enfermedades neoplásicas/clonales y otros trastornos en los que las células de interés (por ejemplo, células clonales/neoplásicas, alteradas/aberrantes) muestran una diferenciación mieloide como en pacientes con leucemia mieloide aguda (AML), síndrome mielodisplásico (MDS), trastorno mieloproliferativo crónico (MPD), hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), mastocitosis, citopenia idiopática de importancia indeterminada (ICUS) y/o leucemia aguda con marcadores mieloides asociados cuando se produce en leucemias agudas bifenotípicas y de bilinaje. Este grupo de tubos se abrevia a partir de ahora como AML/MDS/MPD.

2.4 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) o para información asociada a la enfermedad específica (por ejemplo, el tubo # 24 en el panel de tubos múltiples BCP-ALL que se muestra en la Tabla 3 está dedicado específicamente a distinguir entre los precursores de células B normales/reactivos y los regeneradores malignos y el control de la enfermedad residual mínima en BCP-ALL).

2.5 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

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) 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.

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.

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

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.

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 peridinina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-Texas Red, el número 6 a ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), el número 7 a aloficocianina (APC) o Alexa647, y el número 8 a aloficocianina/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 peridinina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), aloficocianina (APC), y aloficocianina/H7 (APC-H7).

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

Fluorocromo / Tubo#	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
(LST)	CD20^{BB} y CD4	CD45^{BB}	Igλ y CD8	Igκ y CD56	CD5	CD19^{BB} y TCRγδ	CD3	CD38
2								
(SST)	CD20^{BB}	CD45^{BB}	CD8 y Igλ	CD56 y Igκ	CD4	CD19^{BB}	CD3 y CD14	CD38
3								
(PCST)	CD45^{BB}	CD138^{BB}.	CD38^{BB}	CD56	β2micro	CD19^{BB}	CyIgκ	CyIgλ

Fluorocromo / Tubo#	1	2	3	4	5	6	7	8
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 o cuando los resultados de PCST se combinan con la combinación de clasificación de EuroFlow de 2 tubos para PCD; LST = tubo de detección linfoide; SST = tubo de muestra pequeña; PCST= tubo de detección de células plasmáticas.								

4. Composición del panel de Categoría 2 para células linfoides inmaduras

4.1. El tubo de orientación de leucemia aguda (ALOT)

El tubo EuroFlow ALOT se diseñó para evaluar la naturaleza de las poblaciones de células blásticas inmaduras en pacientes con leucemia aguda (B, T versus leucemias agudas con fenotipo no diferenciado o no linfoides o mixta) y la consiguiente orientación hacia los paneles de anticuerpos complementarios más apropiados: BCP-ALL, T-ALL y/o AML/MDS/MPD. La composición del tubo ALOT se proporciona en la Tabla 2; los marcadores CD45-2, CD34-5 y CD19-6 actúan como marcadores del esqueleto cuando la información del ALOT se combina con el panel BCP-ALL (por ejemplo, mediante el uso del software INFINICYT) y los marcadores cyCD3-1, CD45-2 y CD3-8 actúan también como marcadores del esqueleto comunes cuando la información del ALOT se combina con el panel T-ALL; además, CD45-2 y CD34-5 también son marcadores del esqueleto comunes al panel de múltiples tubos AML/MDS/MPD.

Tabla 2. Combinación EuroFlow de un solo tubo para la asignación de linaje de células blásticas en leucemias agudas

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8
20 (ALOT)	cyCD3^{BB}	CD45^{BB}	cyMPO	cyCD79a	CD34^{BB}	CD19^{BB}	CD7	CD3^{BB}
BB = Estos marcadores actúan como marcadores del Esqueleto cuando los resultados se combinan con los resultados obtenidos con las combinaciones de clasificación EuroFlow de múltiples tubos para BCP-ALL o T-ALL (véase la Tabla 3 y la Tabla 4, respectivamente);								

El ALOT no es adecuado para la exclusión de una neoplasia maligna hematológica, porque la combinación de anticuerpos ALOT no es suficiente para ese propósito. Sin embargo, cuando el ALOT se combina con el LST y 4 tubos del protocolo de AML/MDS (tubo # 29, 30, 31 y 32), prácticamente todos los tipos de neoplasia maligna hematológica se pueden detectar (no clasificar) o excluir (Figura 2).

4.2. El panel de anticuerpos de múltiples tubos para la leucemia linfoblástica aguda precursora de células B (BCP-ALL)

El tubo EuroFlow BCP-ALL tiene como objetivo el reconocimiento y la clasificación de todas las clasificaciones clásicamente definidas BCP-ALL (pro-B-ALL, común-ALL, pre-B-ALL) o clasificaciones alternativas BCP-ALL, incluidas las clasificaciones inmunofenotípicas asociadas con aberraciones moleculares bien definidas, tal como los genes de fusión específicos. La información obtenida con el conjunto de tubos BCP-ALL debe combinarse con ALOT, basándose en los marcadores del esqueleto CD45-2, CD34-5 y CD19-6 y utilizando el software de análisis de datos adecuado (por ejemplo, a través del software INFINICYT) (Tabla 3) .

Tabla 3. Combinaciones de clasificación EuroFlow de múltiples tubos para el precursor de células B ALL (BCP-ALL)

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
21	CD20	CD45^{BB}	CD58	CD66c	CD34^{BB}	CD19^{BB}	CD10	CD38	Diagnóstico y clasificación de BCP-ALL; Detección de marcadores LAP

Tubo #	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
22	Igκ	CD45^{BB}	CyIgμ	CD33	CD34^{BB}	CD19^{BB}	IgM y CD117	Igλ	Diagnóstico y clasificación de BCP-ALL; Detección de fenotipos asociados a aberraciones moleculares.
23	CD9	CD45^{BB}	TdT	CD13	CD34^{BB}	CD19^{BB}	CD22	CD24	Diagnóstico y clasificación de BCP-ALL; Detección de fenotipos asociados a aberraciones moleculares; Detección de marcadores LAP
24	CD21	CD45^{BB}	CD15 y CDw65	NG2	CD34^{BB}	CD19^{BB}	CD123	CD81	Subclasificación de BCP-ALL; Detección de marcadores LAP
BB = Marcadores del esqueleto. Los tubos también se pueden aplicar con éxito para la clasificación y el control de la enfermedad.									

4.3. El panel de anticuerpos de múltiples tubos para la leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL)

El panel EuroFlow T-ALL consta de cuatro tubos y utiliza cyCD3-1, CD45-2 y CD3-8 como marcadores del esqueleto (véase la Tabla 4) en común con ALOT. El panel T-ALL apunta al reconocimiento y clasificación de todos los T-ALL definidos clásicamente (T-ALL inmaduro, T-ALL timocítico común, T-ALL maduro) o clasificación T-ALL alternativa, por ejemplo. basado en la expresión de la proteína TCR (cyTCRβ, TCRαβ, TCRγδ) o basado en la asociación con aberraciones moleculares bien definidas.

TABLA 4. Combinaciones de clasificación EuroFlow multitubo para T-ALL

Tubo#	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
25	cyCD3^{BB}	CD45^{BB}	TdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	CD3^{BB}	Diagnóstico de T-ALL; Identificación de marcadores LAP
26	cyCD3^{BB}	CD45^{BB}	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	CD3^{BB}	Diagnóstico de T-ALL, clasificación de T-ALL y determinación de la etapa de maduración de la detención; Identificación de marcadores LAP
27	cyCD3^{BB}	CD45^{BB}	TCRγδ	TCRαβ	CD33	CD56	Cy TCRβ	CD3^{BB}	Diagnóstico de T-ALL y determinar la etapa de maduración de la detención; Identificación de marcadores LAP
28	cyCD3^{BB}	CD45^{BB}	CD44	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	CD3^{BB}	Subclasificación de T-ALL
BB = marcadores del esqueleto. Los tubos también pueden aplicarse con éxito para la clasificación y el control de la enfermedad.									

5. Composición del panel Categoría 3 para células mieloides.

El panel EuroFlow AML/MDS/MPD consta de dos combinaciones de marcadores complementarios (tubos 29-32 y tubos 32-35; véase la Tabla 5), todos ellos con HLA-DR-1, CD45-2, CD34-5 y CD117-6 como marcadores del esqueleto

(Tabla 5). El primer conjunto de tubos (tubos 29-32) está diseñado para usarse preferiblemente en combinación con EuroFlow ALOT para apuntar a la detección y clasificación (asignación de linaje y maduración) de tumores malignos mieloides, tales como en AML y MDS, con una foco principal en el linaje neutrofílico inmaduro (tubo 30), linaje monocítico (tubo 31) y linaje eritroide (tubo 32). Estos cuatro tubos también contribuyen a la detección de APL (tubo 32), PNH (tubos 29 y 30) y otros fenotipos mieloides aberrantes.

El segundo conjunto de tubos (tubos 33-35) proporciona información adicional sobre los linajes dendríticos megacariocíticos, basófilos, plasmacitoides (tubo 33), así como información relevante para el diagnóstico de mastocitosis en asociación (o no) con AML/MDS (tubo 34). El tubo 35 caracteriza además la AML/MDS, y se enfoca particularmente en la expresión aberrante de los marcadores asociados a los linfoides y la maduración anormal de los linfoides.

TABLA 5. Combinaciones de clasificación EuroFlow de múltiples tubos para AML/MDS/MPD

Tubo#	1	2	3	4	5	6	7	8	Objetivo
29	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	CD16	CD13	CD34^{BB}	CD117^{BB}	CD11b	CD10	Diagnóstico de AML
30	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	CD35	CD64	CD34^{BB}	CD117^{BB}	IREM2	CD14	El diagnóstico y la subclasificación de la AML y la PNH se centraron especialmente en el linaje neutrofílico
31	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	CD36	CD105	CD34^{BB}	CD117^{BB}	CD33	CD71	El diagnóstico y la subclasificación de la AML se centran especialmente en el linaje monocítico
32	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	CD15	NG2	CD34^{BB}	CD117^{BB}	CD7	CD38	El diagnóstico y la subclasificación de la AML y la APL se centraron especialmente en el linaje eritroide
33	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	CD42a plus CD61	CD203c	CD34^{BB}	CD117^{BB}	CD123	CD4	El diagnóstico y la subclasificación de la AML se centraron especialmente en los linajes dendríticos megacariocíticos, basófilos y plasmocitoides.
34	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	CD41	CD25	CD34^{BB}	CD117^{BB}	CD42b	CD9	Caracterización de AML/MDS
35	HLADR^{BB}	CD45^{BB}	TdT	CD56	CD34^{BB}	CD117^{BB}	CD22	CD19	Caracterización de AML/MDS
BB = Marcadores del esqueleto; Este conjunto de combinaciones de anticuerpos de múltiples tubos no solo es útil para la detección de AML, MDS y MPD, sino también para la mastocitosis, PNH, ICUS. Los tubos también pueden aplicarse con éxito para la clasificación y el control de la enfermedad.									

REFERENCIAS

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.

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.

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.

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.

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:

cyCD3, CD45, cyMPO, cyCD79a, CD34, CD19, CD7 y CD3.

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:

(i) CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34, CD19, CD10 y CD38

(ii) Igκ, CD45, cyIgμ, CD33, CD34, CD19, IgM, CD117 y Igλ, en donde los anticuerpos contra IgM y CD117 están conjugados al mismo fluorocromo

(iii) CD9, CD45, TdT, CD13, CD34, CD19, CD22 y CD24

(iv) CD21, CD45, CD15, CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123 y CD81, en donde los anticuerpos contra CD15 y CDw65 están conjugados al mismo fluorocromo

(v) cyCD3, CD45, TdT, CD99, CD5, CD10, CD1a y CD3

(vi) cyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7 y CD3

(vii) cyCD3, CD45, TCRγδ, TCRαβ, CD33, CD56, cyTCRβ y CD3

(viii) cyCD3, CD45, CD44, CD13, HLADR, CD45RA, CD123 y CD3

(ix) HLADR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b y CD10

(x) HLADR, CD45, CD35, CD64, CD34, CD117, IREM2 y CD14

(xi) HLADR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33 y CD71

(xii) HLADR, CD45, CD15, NG2, CD34, CD117, CD7 y CD38

(xiii) HLADR, CD45, CD42a, CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123 y CD4, en donde los anticuerpos contra CD42a y CD61 están conjugados al mismo fluorocromo

(xiv) HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b y CD9; o

(xv) HLADR, CD45, TdT, CD56, CD34, CD117, CD22 y CD19.

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 peridinina/cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP o PE-TexasRed, ficoeritrina/cianina7 (PE-Cy7), aloficocianina (APC) o Alexa647, y aloficocianina/H7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680 o Alexa700.

4. Conjunto de composiciones reactivas de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende al menos la composición reactiva como se describe en el Tubo#20 de la Tabla 2 junto con al menos una composición reactiva como se describe en cualquiera de las Tablas 3-5.

5. Conjunto de composiciones de reactivos de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende al menos la composición de reactivo según se indica en el tubo # 20 de la Tabla 2, la composición de reactivo según se indica en el tubo # 1 de la Tabla 1, y las composiciones de reactivo según se indica en los tubos # 29, 30, 31 y 32 de la Tabla 5.

6. 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 2-5, opcionalmente junto con instrucciones para usar, tampón, y/o muestras de control.

7. Kit diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 6 para identificación y caracterización de células mieloides, que comprende un conjunto de composiciones reactivas mencionadas en la reivindicación 2 en el inciso (ix) a (xv).

8. Un método para el inmunofenotipado por citometría de flujo de leucocitos, que comprende las etapas de

(a) proporcionar una muestra biológica que comprende leucocitos;

(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 5 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.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, 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.

Figura 1

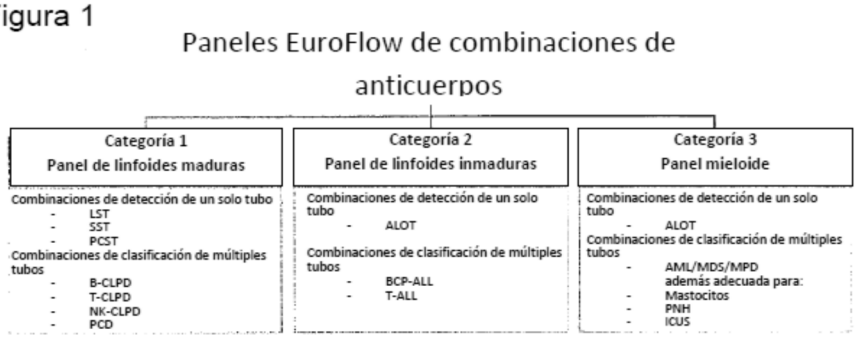
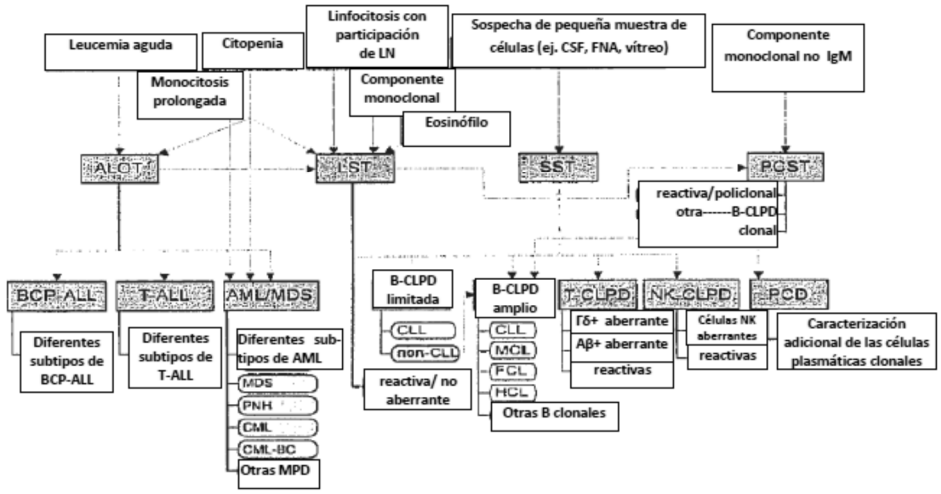
Figura 2