

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 581**

51 Int. Cl.:

B03C 1/01 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
B03C 1/28 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2012 PCT/US2012/047747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13013222**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2012 E 12740854 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 2734307**

54 Título: **Ensayo para capturar y detectar células de mieloma múltiple circulantes de la sangre**

30 Prioridad:

21.07.2011 US 201161510170 P

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

18.12.2020

73 Titular/es:

**MENARINI SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)
Via G. di Vittorio, 21 B/3
40013 Castel Maggiore (BO), IT**

72 Inventor/es:

**GROSS, STEVEN;
CONNELLY, MARK CARLE;
RAO, GALLA CHANDRA;
MATA, MARIELENA y
MORANO, CARRIE**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 799 581 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

Ensayo para capturar y detectar células de mieloma múltiple circulantes de la sangre

5 **Solicitudes relacionadas**

Esta presentación no provisional reivindica la prioridad a una solicitud de patente provisional, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 61/510.170, presentada el 21 de julio de 2011.

10 **Antecedentes de la invención**

15 El mieloma múltiple (también conocido como mieloma o mieloma de células plasmáticas) es un cáncer hematológico progresivo de las células plasmáticas. La afección se caracteriza por un número excesivo de células plasmáticas en la médula ósea y la sobreproducción de inmunoglobulina monoclonal intacta o cadenas ligeras monoclonales libres.

20 Clínicamente, la enfermedad se diagnostica, clasifica y trata en base a una variedad de parámetros que incluyen la masa de células tumorales de mieloma en base a la cantidad de proteína monoclonal (o mieloma) (proteína M) en el suero y/u orina, junto con las concentraciones de hemoglobina y calcio en suero, el número de lesiones óseas líticas basadas en un estudio esquelético y la presencia o ausencia de insuficiencia renal. Los enfoques adicionales para caracterizar la afección incluyen la detección de más del diez por ciento (10%) de células plasmáticas en un examen de médula ósea, la presencia de plasmacitomas de tejidos blandos y la detección de la cadena ligera de inmunoglobulina sérica kappa y lambda libre. El examen de la médula ósea se realiza usando técnicas estándar de histología e inmunohistoquímica. Puede realizarse una citogenética adicional de muestras de 25 médula ósea para determinar el pronóstico. La vigilancia de seguimiento consiste de evaluaciones químicas y de médula ósea, si está clínicamente indicado debido a su naturaleza invasiva.

30 Actualmente, el análisis de citometría de flujo de la médula ósea se está evaluando como una herramienta para la caracterización de la enfermedad y para distinguir entre los trastornos de células plasmáticas neoplásicas de las células plasmáticas normales, y para detectar una enfermedad residual mínima. No obstante, este enfoque continúa dependiendo de un procedimiento invasivo. Hay una necesidad significativa de desarrollar técnicas menos invasivas para detectar, monitorizar y caracterizar la enfermedad a lo largo de su historia y la presencia de estas células en la sangre puede brindar esa oportunidad.

35 Además, se necesita desarrollar herramientas más sensibles para una evaluación más precisa del riesgo y la monitorización de la progresión de la enfermedad en etapas más tempranas de la enfermedad, incluyendo la gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS) y el mieloma múltiple latente. Algunos datos de investigación sugieren que las células plasmáticas circulantes pueden detectarse en etapas tempranas de la enfermedad y pueden correlacionarse con el pronóstico, lo que respalda el uso de una metodología estandarizada para capturar, enumerar y caracterizar estas células en las etapas tempranas de la enfermedad. 40

45 El consenso general dentro de la bibliografía (Report of the European Myeloma Network on Multiparametric Flow Cytometry in Multiple Myeloma and Related Disorders. Andy C. Rawstron et al. Haematologica, 2008; 93 (3)) para la identificación de células plasmáticas anormales, particularmente por citometría de flujo, ha incluido varios biomarcadores clave que consisten principalmente de CD138, CD38 y CD45. Los biomarcadores adicionales como CD19 y CD56 también han demostrado utilidad en el diagnóstico.

50 La presente invención investiga las células de mieloma circulantes para evaluar si estos biomarcadores particulares, ya sea solos o en combinación con uno o más biomarcadores adicionales o con FISH, pueden usarse tanto para la captura como para la detección de células plasmáticas circulantes anormales, incluyendo la detección de enfermedad residual mínima. El FISH puede usarse para detectar numerosas anomalías citogenéticas que se han descrito en el mieloma múltiple. Se ha demostrado que las translocaciones en el locus IGH, t(4;14) y las deleciones en el locus p53, del(17p) tienen un valor de pronóstico para la supervivencia libre de eventos y general en el mieloma múltiple. (Genetic Abnormalities and Survival in Multiple Myeloma: The Experience of the InterGroupe Francophone du Myelome. Herve Avet-Loiseau et al. Blood, 2007; 109: 3489-3495). Estas sondas y varios otros marcadores de mieloma múltiple están disponibles en el catálogo de Poseidon y podrían adaptarse para usarlas con la plataforma CellTracks®. 55

60 Comercialmente hay kits de selección inmunomagnética que usan partículas magnéticas CD138. Stem Cell Technologies tiene un kit de selección positiva CD138 humana EasySep® que puede seleccionar células positivas CD138 de células de médula ósea y mononucleares sangre periférica (PBMC) y Miltenyi Biotech tiene las microperlas CD138 para la selección de células positivas CD138 de médula ósea, PBMC y sangre completa. El análisis de las muestras recogidas se realiza típicamente usando citometría de flujo. La WO 99/41613 A1 se refiere a métodos para el aislamiento rápido y eficiente de células cancerosas circulantes. 65

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para capturar, aislar y analizar células de mieloma múltiple circulantes en una muestra de sangre obtenida de un sujeto de prueba que comprende: (a) poner en contacto dicha muestra con partículas magnéticas coloidales que se conjugan con un primer ligando, que es anti-CD138 y un segundo ligando, que es anti CD-38; (b) someter la muestra del paso (a) a un campo magnético para producir una fracción separada de células de mieloma múltiple circulantes unidas a partículas magnéticas; (c) tratar la muestra del paso (b) con un primer marcador adicional; y (d) analizar las células de mieloma múltiple circulantes.

La invención también proporciona un método para determinar si un paciente es un candidato probable para intervención terapéutica para enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales que comprende: (a) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra, en donde el procesamiento comprende el método de la invención; y (b) determinar por recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor que el número de CMMC presentes en una muestra de intervalo normal.

La invención también proporciona un método para determinar si un paciente que está siendo sometido a intervención terapéutica está reduciendo el número de CMMC, o para determinar si un paciente que tenía una enfermedad de células plasmáticas anormales y ha sido tratado con éxito para dicha enfermedad, permanece en remisión; el método comprendiendo: (a) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra en un primer punto temporal, en donde el procesamiento comprende el método de la invención; (b) determinar por recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor o igual que el número de CMMC presentes en una muestra de intervalo normal; (c) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra en un segundo punto temporal, en donde el procesamiento comprende el método de la invención; y (d) determinar por recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra, es igual o mayor o igual que el número de CMMC presentes en una muestra de intervalo normal; (e) comparar los números en los pasos (b) y (d).

La invención también proporciona un reactivo para capturar células de mieloma múltiple circulantes que comprenden partículas magnéticas coloidales y por lo menos dos ligandos, en donde los por lo menos dos ligandos comprenden anti-CD-138 y anti-CD-38.

En la presente se divulga un método para la captura y detección de células plasmáticas circulantes (CPC) y células plasmáticas anormales o células de mieloma múltiple ("CMMC") que incluye la detección de enfermedad residual mínima de sangre periférica. En la presente se divulga un medio no invasivo de detectar cantidades muy bajas de CMMC en volúmenes milimétricos de muestra de sangre para detectar, monitorizar y caracterizar la enfermedad a lo largo de su historia, así como también proporciona las herramientas más sensibles para una evaluación más precisa del riesgo y la monitorización para la progresión de la enfermedad en las etapas tempranas de la enfermedad incluyendo la detección de células plasmáticas circulantes en las primeras etapas de la enfermedad, incluyendo la gammapatía monoclonal de importancia indeterminada (MGUS) y el mieloma múltiple latente. La captura y caracterización de estas células plasmáticas circulantes de sangre periférica puede proporcionar nuevos biomarcadores para la gestión de pacientes con mieloma múltiple.

La sangre se recoge en tubos CellSave que contienen un conservante que permite el transporte y el almacenamiento de la sangre a la vez que minimiza la degradación celular. Las células se capturan usando partículas magnéticas coloidales conjugadas con Syndecan-1 o CD138, un marcador de la superficie celular presente en las células plasmáticas. Una vez capturadas, las células se marcan con los marcadores celulares adicionales CD38-PE (Ficoeritrina), CD19 y CD45-APC (aloficocianina) y CD56-FITC (isotiocianato de fluoresceína) para diferenciar las células de mieloma múltiple de los leucocitos contaminantes de fondo (glóbulos blancos). Los reactivos ferrofluidos y de marcadores celulares forman parte de un nuevo kit de servicio CellSearch® CMMC. El kit consta de 7 componentes, de los cuales 4 son idénticos a los reactivos encontrados en el kit Cellsearch® Epithelial Cell. Estos 4 reactivos comunes son el reactivo de mejora de captura, el reactivo Perm, colorante de ácidos nucleicos y CellFix. Los 3 nuevos reactivos consisten del ferrofluido CD138, un reactivo de tinción que consiste de CD38-PE, CD19 y CD45-APC y un reactivo de tinción de marcadores separado que consiste de CD56-FITC.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la reactividad de los anticuerpos de CD 138 con ciertas líneas celulares.

La Figura 2 ilustra la reactividad de los anticuerpos de CD 38 con ciertas líneas celulares.

La Figura 3 ilustra la reactividad de diferentes pruebas de anticuerpos de CD19 APC en PBMC.

La Figura 4 ilustra la tinción de CD 19 APC a varias diluciones.

La Figura 5 ilustra la tinción de anticuerpos de CD 56 en PBMC.

La Figura 6 ilustra la tinción de CD 56 en varias líneas celulares.

La Figura 7 ilustra la tinción sin CD56.

5 La Figura 8 ilustra la tinción de CD 56 FITC de una línea celular a una dilución.

La Figura 9 ilustra la tinción de CD 56 FITC de una línea celular a una dilución.

10 La Figura 10 ilustra la tinción de CD 56 FITC de una línea celular a una dilución.

La Figura 11 ilustra imágenes representativas de células MM 1S.

La Figura 12 ilustra imágenes representativas de células H929.

15 La Figura 13 ilustra imágenes representativas de los glóbulos blancos sobrantes.

La Figura 14 ilustra imágenes de una muestra de paciente.

20 La Figura 15 ilustra imágenes de una muestra de paciente.

La Figura 16 ilustra imágenes de una muestra de paciente.

La Figura 17 ilustra imágenes de una muestra de paciente.

25 La Figura 18 ilustra imágenes de donantes normales.

Descripción detallada

30 La invención incluye un método para capturar, aislar y analizar células de mieloma múltiple circulantes en una muestra de sangre obtenida de un sujeto de prueba que comprende

(a) poner en contacto dicha muestra con partículas magnéticas coloidales que se conjugan con un primer ligando, que es anti-CD138, y un segundo ligando, que es anti-CD38;

35 (b) someter la muestra del paso (a) a un campo magnético para producir una fracción separada de células de mieloma múltiple circulantes unidas a partículas magnéticas

(c) tratar la muestra del paso (b) con un primer marcador adicional; y

40 (e) analizar las células de mieloma múltiple circulantes.

45 Como se usa en la presente, el término "muestra" se refiere a una cantidad de sangre, preferiblemente expresada como una medición volumétrica. El volumen preferido de una muestra de sangre es de aproximadamente 2 ml a 10 ml, más preferiblemente 3-7,5 ml, lo más preferible de 4 ml. El término "partículas magnéticas coloidales" se refiere a partículas que son metálicas u organometálicas. Ejemplos de tales partículas se divulgan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.597.531; 5.698.271; 5.698.271; 6.365.662, particularmente por su descripción de tales partículas magnéticas coloidales. Pueden recubrirse opcionalmente con un polímero, preferiblemente un polímero de origen biológico tal como albúmina de suero bovino y caseína.

50 El término "ligando" se refiere a proteínas que se unen a marcadores asociados a células de CMMC. Las proteínas preferidas son los anticuerpos. Los ligandos son anti CD 138 y anti-CD 38. Tales ligandos pueden conjugarse con partículas magnéticas coloidales por métodos que son sustancialmente similares a los métodos divulgados en la 6.365.662. En el paso (a) de la invención pueden usarse dos o más ligandos.

55 El término "campo magnético" puede ser producido por cualquiera de varios métodos, particularmente por dos separadores magnéticos sustancialmente como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7.901.950. El término "marcador adicional" significa una proteína asociada a la célula que es específica para CMMC o excluye CMMC. Tales proteínas incluyen, pero no están limitadas a, anticuerpos seleccionados del grupo que consiste de anti CD19 y anti CD45, anti CD 56, anti lambda, anti kappa, anti CD 200, anti Ki67. Tales anticuerpos pueden marcarse con indicadores como ficoeritrina, isotiocianato de fluoresceína y alofococianina, y es preferible que estén marcados con uno o más marcadores. El marcador adicional puede incluir colorantes de ácido nucleico como DAPI. El marcador adicional preferido se selecciona del grupo que consiste de anti CD19 y anti CD45. En el paso (c) de la invención pueden usarse dos o más marcadores adicionales y se prefiere que se usen por lo menos dos marcadores adicionales, más preferiblemente, tres marcadores adicionales, lo más preferible cuatro marcadores adicionales.

65

El término "analizar" significa evaluar la muestra capturada magnéticamente para determinar uno o más de los siguientes: si la muestra contiene CMMC. Dicha identificación puede realizarse visual o electrónicamente para determinar el grado de fluorescencia de una muestra capturada magnéticamente. Tales métodos de análisis se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 7.011.794. En particular, las muestras capturadas magnéticamente que son positivas para CD38 y negativas para CD19 y CD45 se identifican como CMMC.

La invención incluye un método para determinar si un paciente es un candidato probable para intervención terapéutica para enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales que comprende

(a) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra, en donde el procesamiento comprende el método de la invención; y

(b) determinar mediante recuento si el número de células CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor que o igual al intervalo normal.

Como se usa en la presente, el término muestra tiene el significado mencionado anteriormente y el intervalo preferido. El término "procesamiento" significa tratar una muestra de sangre del paciente mediante los métodos descritos en la presente para aislar e identificar CMMC.

El término "intervención terapéutica" significa buscar u obtener cualquier intervención médica para tratar enfermedades asociadas con niveles plasmáticos anormales. Tales enfermedades incluyen, entre otras, mieloma múltiple, MGUS y mieloma múltiple latente. Dicha intervención terapéutica incluye, pero no está limitada a, visitar a un médico, obtener tratamiento terapéutico como radiación, y tratamiento con fármacos que tratan cualquiera de las enfermedades asociadas con niveles plasmáticos anormales, y monitorizar el efecto de dichos tratamientos terapéuticos. Por ejemplo, si un paciente está siendo tratado con un fármaco, los niveles de CMMC del paciente pueden evaluarse durante el curso del tratamiento para determinar si el fármaco está funcionando. Tales medicamentos incluyen, pero no están limitados a, dexametasona, ciclofosfamida, vincristina, bortezomib, melfalan, zometa, aloxi, lenalidomida, doxirubicina, y similares.

El término "intervalo normal" significa el número de células CMMC presentes en una población de muestra que no tiene enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales. Preferiblemente, el intervalo normal es inferior a 7 CMMC en una muestra de sangre de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 10 ml. Preferiblemente, el intervalo normal es inferior a 7 CMMC en una muestra de sangre de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 7,5 ml. El término "mayor que el intervalo normal" es un número de CMMC que excede el intervalo normal. Cuanto mayor sea este número, más probable es que el paciente tenga una de las enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales. Si un paciente tiene entre 8 y 20 CMMC en una muestra de sangre, dicho paciente tiene una probabilidad más alta de tener una de las enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales. Si un paciente tiene entre 21 y 49 CMMC el paciente tiene un nivel elevado y es más probable que tenga una de las enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales, sin un paciente tiene entre 50 y decenas de miles de CMMC ese paciente tiene un nivel altamente elevado e incluso más probabilidad de tener una de tales enfermedades.

Además, la invención incluye un método para determinar si un paciente que se está sometiendo a intervención terapéutica está reduciendo el número de CMMC, o para determinar si un paciente que tenía una enfermedad de células plasmáticas anormales y ha sido tratado con éxito para dicha enfermedad, sigue en remisión; el método comprendiendo

(a) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra en un primer punto en el tiempo, en donde el procesamiento comprende el método de la invención;

(b) determinar mediante recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor o igual que el intervalo normal;

(c) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra en un segundo punto en el tiempo, en donde el procesamiento comprende el método de la invención;

(d) determinar mediante recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor que o igual al intervalo normal; y

(e) comparar los números en los pasos (b) y (d).

Todos los términos definidos anteriormente tienen su mismo significado e intervalo preferido.

Además, la invención incluye un reactivo para capturar células de mieloma múltiple circulantes que comprenden partículas magnéticas coloidales y por lo menos dos ligandos, en donde los por lo menos dos ligandos

comprenden anti-CD138 y anti-CD38.

Todos los términos definidos anteriormente tienen su mismo significado e intervalos preferidos.

5 Las células circulantes de mieloma múltiple (CMMC), una forma de células plasmáticas anormales, capturadas de la sangre, se han capturado y analizado usando los sistemas CellTracks® AutoPrep® y CellTracks Analyzer II®. En este procedimiento, se usa una combinación de reactivo de captura (ferrofluido) y biomarcadores fluorescentes (como el anticuerpo anti-CD38-Ficoeritrina (PE)) y colorantes (como el colorante de ácidos nucleicos DAPI) para identificar células plasmáticas anormales y distinguirlas de leucocitos y desechos contaminantes. CD138 o Syndecan-1 es un marcador de la superficie celular que se encuentra en las células plasmáticas maduras y en las neoplasias malignas de las células plasmáticas, como el mieloma múltiple pero no en otros leucocitos normales de la sangre periférica. Por esta razón, el anti-CD138 se acopló a nanopartículas magnéticas ferrofluidas, que se usan para seleccionar magnéticamente las células plasmáticas circulantes a partir de una muestra de sangre periférica. Para detectar las células plasmáticas anormales de los leucocitos contaminantes se usan varios biomarcadores de leucocitos. El anti-CD38 se conjuga con ficoeritrina (PE) y se usa como marcador positivo para la detección de células plasmáticas. Sin embargo, como CD38 también se encuentra en algunos tipos de leucocitos (células T y B activadas), el ensayo también usa anti-CD45 conjugado con alofocianina (APC) y anti-CD19 conjugado con alofocianina (APC) como marcador negativo. El CD45 es un marcador de pan-leucocitos que se encuentra en los leucocitos de la sangre periférica y CD19 es un marcador específico de células B. Las células de mieloma son células B funcionalmente diferenciadas que no expresan ni CD45 ni CD19. Un marcador final en este ensayo es anti-CD56 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El CD56 puede encontrarse en algunos subconjuntos de leucocitos periféricos como las células NK, pero también se expresa en el 75% de las células de mieloma y a menudo se asocia con un peor pronóstico del paciente. Por lo tanto, aunque CD56 no es ni un marcador positivo ni negativo para el mieloma múltiple, durante la terapia farmacológica del paciente sus niveles de expresión en las células pueden controlarse.

El ensayo se desarrolló inicialmente usando líneas celulares como RPMI 8226, H929 y MM.1S para evaluar diferentes anticuerpos contra los marcadores que se determinó que estaban presentes en las células de mieloma múltiple que incluyen CD138, CD38 y CD56. Como estas líneas celulares eran negativas para CD45 y CD19, se usaron PBMC en su lugar para evaluar esos anticuerpos.

Las células enriquecidas y teñidas se transfirieron a un cartucho CellTracks® y MagNest® para montaje magnético. El cartucho se escaneó usando CellTracks Analyzer II®. Las imágenes individuales de las células se presentaron al operador para su revisión, y se puntuaron como CMMC, en base a la fluorescencia y la morfología celular. En un sistema de espigas modelo, el ensayo recuperó consistentemente ~60% de las células de la línea celular de mieloma múltiple H929 añadidas a 4,0 ml de sangre de donantes sanos. El ensayo fue lineal en el intervalo probado de 0 a 2000 células H929 con espigas (r2 0.98, pendiente 0.50, intercepción 10). El ensayo se validó usando sangre de donantes sanos compatibles con la edad (n = 22) y pacientes con mieloma múltiple (n = 66) y MGUS (n = 7). En 4,0 ml de sangre de donantes normales, se detectaron 0 CPC en 12/22 (55%) y se detectaron números bajos (1-6 CPC) en 10/22 (45%) de las muestras. Curiosamente, se encontró un CPC positivo para CD56 en un donante normal. Las CMMC en pacientes con mieloma múltiple varió de 0 a 17.000 /4,0ml de sangre. Se detectaron una o más CMMC en el 91% de los pacientes, ≥5 en el 68%, ≥10 en el 58% y ≥100 en el 35%. La expresión de CD56 fue muy variable en la población de pacientes. La CMMC en pacientes con MGUS varió entre 0-112 /4,0ml de sangre. Se detectaron una o más CMMC en 6/7 de los pacientes, >5 en 4/6, >10 en 2/6 y >100 en 1/6.

Para caracterizar adicionalmente la CMMC y diferenciar CPC del CMMC, se desarrolló un ensayo de hibridación fluorescente in situ interfase (FISH) para usarlo con el sistema de captura y detección descrito anteriormente. Se usó una sonda FISH de cuatro colores para detectar simultáneamente mutaciones de alto riesgo. Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

50 Ejemplos

Abreviaturas

55 PE-Ficoeritrina
FITC-isotiocianato de fluoresceína
APC-Alofocianina
PBMC-células mononucleares de sangre periférica

60 Fuentes de anticuerpos

CD138:

65 Gen-Probe Diaclone SAS
1 Bd A Fleming, BP 1985

F-25020 Besancon Cedex, Francia
 CD38 y CD19
 R&D Systems
 614 McKinley Place NE
 Minneapolis, MN 55413

5

Ejemplo 1 Objetivos de captura

La Figura 1 muestra que de los anticuerpos anti-CD138 probados para la reactividad con las líneas celulares RPMI 8226, H929 y MM.1S, el anticuerpo con mejor rendimiento fue el clon B-A38. Las líneas celulares se marcaron primero con los diferentes anticuerpos, que eran todos anticuerpos antihumanos de ratón, luego se marcaron posteriormente con un conjugado PE anti-ratón y se analizaron por citometría de flujo. El clon B-A38 proporcionó la tinción fluorescente más alta en todas las líneas celulares de mieloma múltiple.

Ejemplo 2 Objetivos de detección

La Figura 2 muestra que de los anticuerpos anti-CD38 probados para la reactividad con las líneas celulares RPMI 8226, H929 y MM.1S, el anticuerpo con mejor rendimiento fue el clon 240742. Las líneas celulares se probaron inicialmente usando un conjugado anti-CD38-FITC directo pero más tarde se descubrió que el conjugado FITC no era lo suficientemente adecuado para la detección en la plataforma CellTracks®. Posteriormente se preparó y probó un conjugado de PE de este anticuerpo y se descubrió que era adecuado para la detección.

Ejemplo 3 Determinación de la dilución

Anti CD19 y anti-CD45, ambos como conjugados de APC, se eligieron como marcadores de detección negativos ya que la ausencia de ambos es indicativa de células plasmáticas anormales. El anti-CD45APC ya es un componente del reactivo de tinción CellSearch® CTC, por lo que no fue necesaria una optimización adicional. Y como ninguna de las líneas celulares de mieloma bajo evaluación expresó CD19, se usaron PBMC para evaluar los diferentes clones anti-CD19APC. Los resultados de las pruebas anti-CD19 en PBMC pueden verse en la Figura 3. La tinción se realizó de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante en PBMC recogido de tubos EDTA y CellSave. Se eligió el clon SJ25C1 como el conjugado de mejor rendimiento. El conjugado se probó luego a varias diluciones en los mismos volúmenes de reacción usados en AutoPrep®, Figura 4. Se eligió una dilución de 1:5 como la dilución final para la tinción.

Ejemplo 4 Tinción de CD56 y PBMC

Se eligió anti-CD56 como reactivo marcador FITC, ya que se expresa en el 75% de los casos de mieloma con expresión anormal. Las pruebas se realizaron en líneas celulares (Figura 6) y PBMC (Figura 5) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se eligió NCAM 16.2 como el conjugado de mejor rendimiento.

40

Ejemplo Diluciones de 5 CD 56 FITC

El conjugado anti-CD56 FITC NCAM 16.2 se probó a varias diluciones con células H929 en AutoPrep®, ver Figura 7-10.. Ninguna dilución clara probada fue mejor en la línea celular. Se eligió una dilución de 1:4 como la dilución final para la tinción hasta que pudieron probarse las muestras de pacientes para ayudar a determinar la concentración óptima.

45

Ejemplo 6 Imágenes

Luego se construyó un kit prototipo CMMC que consistía en ferrofluido anti-CD138, reactivo de tinción consistente de PE anti-CD38, APC anti-CD45 y APC anti-CD19, y un reactivo marcador FITC anti-CD56. Los componentes restantes del kit fueron el reactivo de mejora de captura (PN 7037), el reactivo de permeabilización (PN 7038), el colorante de ácidos nucleicos (PN 7041) y CellFix (PN 7042). La primera ronda de pruebas usó ferrofluido anti-CD138 a diferentes concentraciones. La concentración final de PE anti-CD38 se ajustó a 1 µg/ml (concentración de reactivo de tinción de 5,7 µg/ml) en base a los datos de flujo anteriores. La concentración final de APC anti-CD45 fue de aproximadamente 2 µg/ml (concentración de reactivo de tinción de 13 µg/ml, lo mismo que en el Kit CellSearch® CTC) y el conjugado de APC anti-CD19 original se diluyó 1:5 en el reactivo de tinción. Se usó FITC anti-CD56 a una concentración de 1:4 en el vial de reactivo de marcador. Las células H929 se añadieron a 7,5 ml de sangre CellSave y se procesaron en AutoPrep® a concentraciones de ferrofluido de 135, 185, 220 y 270 µg/ml. Luego, las muestras se analizaron en CellTracks Analyzer II® y la recuperación de las células H929 alcanzó una meseta del 55-60% a aproximadamente 220 µg/ml.

55

Por lo tanto, se decidió que la concentración final de ferrofluido en el kit sería de 220 µg/ml por 7,5 ml de muestra de sangre, que es similar a las concentraciones usadas en muchos otros kits CellSearch®.

65

Las imágenes de CellTracks® de las células H929 y MM.1S recuperadas pueden verse en las Figuras 11 y 12 respectivamente. Tener en cuenta la mayor tinción de CD56 de las células H929 en comparación con las células MM.1S. En la Figura 13 pueden verse los glóbulos blancos sobrantes (CD38 +/CD45+).

5 Ejemplo 7 Muestras de pacientes

Se analizaron un total de 66 muestras de pacientes con mieloma múltiple para CMMC. Estas muestras se obtuvieron de Conversant y originalmente se analizaron 7,5 ml de sangre usando el kit de servicio CellTracks® CMMC, pero como se hizo evidente que muchas muestras tenían un alto número de CMMC, se tomó la decisión de reducir el volumen de sangre probado a 4 ml. Las muestras se procesaron en CellTracks® AutoPrep® y luego escaneadas en CellTracks Analyzer II®. La Figura 10 es una tabla de datos generados a partir de las muestras de sangre del paciente. Las CMMC en pacientes con mieloma múltiple variaron de 0 a 17.000 /4,0ml de sangre. Se detectaron una o más CMMC en el 91% de los pacientes, ≥5 en el 68%, ≥10 en el 58% y ≥100 en el 35%. La expresión de CD56 fue muy variable en la población de pacientes. Las CMMC en pacientes con MGUS variaron entre 0-112 /4,0ml de sangre. Se detectaron una o más CMMC en 6/7 de los pacientes, >5 en 4/6, >10 en 2/6 y >100 en 1/6. Las Figuras 14-17 muestra algunas imágenes representativas de CellTracks® de muestras de pacientes.

Leyenda de Tabla 1

20 Etapa: una clasificación diagnóstica de la extensión y características de las células de mieloma que comprenden las Etapas I, II y III. La cantidad de células cancerosas progresa de relativamente pocas a moderadas a relativamente muchas a medida que avanza la Etapa. Los síntomas adicionales como la proteína M, la anemia y el calcio sérico también aumentan a medida que avanza la Etapa.
 Estado del tratamiento: refleja el estado de la enfermedad y el enfoque del tratamiento. Tipo de tratamiento: terapia con fármacos o radioterapia.
 25 Volumen: Volumen de sangre periférica procesada en el sistema CellSearch®.
 Eventos totales: número total de imágenes del navegador CellTracks® presentadas al usuario para una clasificación manual de células de mieloma múltiple.
 30 Células MM totales (CD38+, CD19/45-): número total de imágenes de los eventos totales que el usuario ha determinado que cumplen los criterios de una célula de mieloma múltiple (MM). Estas células son CD38 positivas y CD19/45 negativas.
 CD38+, CD19/45-, CD56+: el número de células de mieloma múltiple que fueron positivas para CD56.
 CD38+, CD19/45-, CD56-: el número de células de mieloma múltiple que fueron negativas para CD56.
 35 Eventos no asignados: los eventos totales menos las células MM totales, que fueron eventos que el usuario clasificó como células de mieloma múltiple. Los eventos no asignados son una combinación de glóbulos blancos, ruido de la ordenador u otros residuos no clasificados como células MM.

40

45

50

55

60

65

Tabla 1: Tabla de Muestras de Pacientes con Mieloma Múltiple CMMC

Muestra	Género/edad	Estado del tratamiento	Tipo de tratamiento	Etapas	Volumen (mLs)	Eventos totales	Células MM totales CD38+, CD45/19-	CD38+, CD45/19- CD56+	CD38+, CD45/19- CD56-	Eventos no asignados
1	M/78	Activo	Revlimid, Decadron	II	7.5	5491	1	1	0	5490
2	M/66	Activo	Velcade, Doxil, Decadron	III	7.5	2118	4	3	1	2114
3	F/78	Refractario	Post Velcade, Doxil, Dexametasona, Revlimid	III	7.5	3179	16	15	1	3163
4	M/61	Activo	Revlimid, Doxil	III	7.5	33090	20681	19399	1282	12409
5	M/54	Pre	N/A	I	7.5	4387	6	0	6	4381
6	F/62	Activo	Dexametasona, Doxil, Velcade	II	7.5	6500	1931	1515	416	4569
7	F/63	Post	NA		4	20383	16814			3569
8	M/56	Activo	Decadron	II	7.5	21091	17779	0	17779	3312
9	M/57	Activo	Radiación		4	42388	16447	0	16447	25941
10	F/67	Activo	Velcade	I	7.5	3879	11	10	1	3868
11	M/48	Activo	Velcade, Decadron, Doxil	III	7.5	8664	2	1	1	8662
12	F/53	Activo	Velcade	II	7.5	1102	3	2	1	1099
13	F/77	Activo	Velcade, Dexametasona	I	4	5104	23	8	15	5081
14	M/79	Activo	Revalmid, Dexametasona	III	4	2893	0	0	0	2893
15	F/68	Activo	Cytosan	III	4	960	3	0	3	957
16	F/40	Activo	Velcade	II	4	6937	5092	2213	2879	1845
17	F/41	Post	NA		4	760	0			760
18	M/76	Activo	Velcade	II	4	1818	6	4	2	1812
19	M/53	Activo	Dexametasona	I	4	6966	3	0	3	6963
20	F/76	Activo	Velcade	III	4	1630	26	4	22	1604

(continuación)

Muestra	Género/edad	Estado del tratamiento	Tipo de tratamiento	Etapas	Volumen (mLs)	Eventos totales	Células MM totales CD38+, CD45/19-	CD38+, CD45/19- CD56+	CD38+, CD45/19- CD56-	Eventos no asignados
21	F/79	Recurrente	NA	III	4	12834	5428	2451	2977	7406
22	F/80	Post	In entre		4	9472	4	1	3	9468
23	F/80	Pre	NA		4	2408	145			2263
24	F/80	Pre	NA		4	1197	249			948
25	M/79	Activo	Velcade	II	4	6792	788	68	720	6004
26	M/79	Activo	Aloxi, Doxil, Vincristin		4	17128	103	18	85	17025
27	M/73	Post	NA		4	552	48	34	14	504
28	M/74	Post	NA		4	584	22	5	17	562
29	M/74	Post	NA		4	5293	13			5280
30	M/59	Activo	Velcade, Doxil		4	2302	3	1	2	2299
31	F/60	Post	NA		4	1237	148	110	38	1089
32	F/60	Post	NA		4	4436	89	81	8	4347
33	F/61	Entre	NA		4	1804	27			1778
34	F/61	Pre	NA		4	3941	99	27	72	3842
35	F/61	Activo	Velcade		4	2126	14			2112
36	F/61	Activo	Bortezomib		4	1289	7			1282
37	M/69	Activo	Revlimid		4	934	38	26	12	896
38	F/69	Activo	Cytosan		4	890	12	0	12	878
39	F/72	Activo	Doxil, Velcade		4	669	0	0	0	669
40	F/59	Activo	Doxil, Velcade		4	4921	335	100	235	4586
41	F/59	Activo	Doxil, Velcade		4	3098	221	37	184	2877
42	F/60	Activo	Velcade		4	272	0	0	0	272
43	F/60	Activo	Bortezomib		4	277	1			276
44	F/61	Activo	Doxil, Velcade		4	2511	253	171	82	2258

(continuación)

Muestra	Género/edad	Estado del tratamiento	Tipo de tratamiento	Etapas	Volumen (mLs)	Eventos totales	Células MM totales CD38+, CD45/19-	CD38+, CD45/19- CD56+	CD38+, CD45/19- CD56-	Eventos no asignados
45	F/61	Activo	Doxil, Velcade		4	933	215	46	169	718
46	F/61	Pre	NA		4	2264	95			2169
47	M/70	Activo	Doxil, Melphalan		4	1300	0	0	0	1300
48	M/75	Activo	Velcade		4	4658	2	0	2	4656
49	M/63	Post	NA		4	14448	1	0	1	14447
50	M/76	Post	Zometa		4	25095	2	1	1	25093
51	F/68	Post	Zometa		4	5099	5	0	5	5094
52	M/71	Activo	Aloxi, Doxil, Vincristin		4	18684	49	9	40	18635
53	F/45	Activo	Decadron y Revlimid		4	3285	0	0	0	3285
54	M/78	Post	NA		4	2182	16	0	16	2166
55	F/62	Activo	Velcade		4	1481	15	11	4	1466
56	F/63	Pre	NA		4	5681	581			5100
57	F/63	Pre	NA		4	1530	389			1141
58	M/75	Pre	NA		4	14232	199	4	195	14033
59	F/63	Post	NA		4	9610	1	0	1	9609
60	M/79	Activo	Radiación		4	4121	4121	0	4121	0
61	M/62	Post	NA		4	1494	8			1486
62	F/59	Activo	Bortezomib		4	1956	398			1558
63	M/50	Activo	Lenalidomida		4	1276	7			1269
64	M/62	Activo	Doxirubicin		4	9470	1842			7628
65	M/60	Post	NA		4	1055	2	0	2	1053
66	M/53	Activo	Bortezomib		4	813	376	131	244	437

Ejemplo 8 Sujetos normales

También se probaron veintidós normales de la misma edad. Estas muestras también se obtuvieron de Conversant y se analizaron 4 ml de sangre con el kit de servicio CellTracks® CMMC. Las muestras se procesaron en CellTracks® AutoPrep® y luego se escanearon en CellTracks Analyzer II®. La Tabla 2 es una tabla de datos generados a partir de las muestras de sangre de 4 ml. En 4,0 ml de sangre de donantes normales, se detectaron 0 CPC en 12/22 (55%) y se detectaron números bajos (1-6 CPC) en 10/22 (45%) de las muestras. Curiosamente, se encontró un CPC positivo para CD56 en un donante normal. Ver la Figura 18. El número medio de eventos totales del navegador fue de aproximadamente 1500.

Para caracterizar adicionalmente CMMC y diferenciar CPC de CMMC, se desarrolló un ensayo de hibridación fluorescente in situ entre fases (FISH) para usarlo con el sistema de captura y detección descrito anteriormente. Se usó una sonda FISH de cuatro colores para detectar simultáneamente mutaciones de alto riesgo, incluyendo dos translocaciones recurrentes del locus IgH (t(4;14) (p16; q32) y t(14;16) (q32; q23)), así como la delección del locus TP53 (Δ 17p13). El ensayo FISH se verificó en las líneas celulares H929, MM1 y U266, que mostraban mutaciones en t(4;14), t(14;16) y Δ 17p13, respectivamente. El ensayo FISH se probó en 9 muestras de pacientes de CMMC y 8 muestras proporcionaron resultados evaluables. Dos muestras mostraron fusiones t(4;14), 3 pacientes mostraron patrones de señal de FISH aberrantes que indican aneuploidía del cromosoma 4 o 14 y los pacientes restantes mostraron patrones de FISH normales.

Tabla 2: Tabla de CMMC de donantes de sangre normales de la misma edad de 4 ml

Muestra	Género/edad	Volumen (mLs)	Eventos totales	CD38+, CD45/19-CD56+	CD38+, CD45/19-CD56-	Eventos no asignados
1	F/43	4	3281	0	1	2538
2	M/71	4	1939	0	0	759
3	F/54	4	3584	0	1	2794
4	F/61	4	399	0	0	102
5	F/70	4	645	0	0	114
6	F/60	4	526	0	0	273
7	F/49	4	273	0	0	80
8	F/55	4	2502	1	2	1559
9	M/47	4	811	0	1	209
10	F/55	4	1512	0	2	940
11	M/42	4	1032	0	0	485
12	F/54	4	576	0	0	287
13	M/44	4	6211	0	1	4742
14	F/55	4	1891	0	0	1182
15	M/43	4	1233	0	0	745
16	M/50	4	816	0	0	524
17	F/50	4	661	0	1	362
18	F/55	4	668	0	1	367
19	M/60	4	1621	0	0	696
20	F/58	4	414	0	0	249
21	F/60	4	2221	0	1	2220
22	M/51	4	762	0	6	756

Ejemplo 9 Captura utilizando Anti-CD 38 y Anti CD 138 Muestras de pacientes

Anti CD138, el marcador de la superficie celular conjugado con partículas magnéticas coloidales usadas

para capturar células de mieloma en la presente invención puede desprenderse de la superficie celular del mieloma con el tiempo. CD38, un marcador de superficie también presente en las células de mieloma, no se desprende de la superficie celular. Se desarrolló una nanopartícula magnética que se unió tanto a anti-CD138 como a anti-CD38 y se probó con muestras de pacientes y donantes normales para su capacidad de capturar células de mieloma. Se usaron anti-CD38 y anti CD 138, ambos conjugados con ficoeritrina (PE), y ambos reconociendo un epítipo diferente al anti CD38 y anti-CD 138 usados en la elaboración de la nanopartícula magnética, para la detección junto con anti-CD45 y anti-CD19 conjugado con alofococianina (APC).

Se probaron un total de 22 muestras de pacientes con mieloma múltiple para CMMC usando el reactivo de captura alternativo. Estas muestras se obtuvieron de Conversant y se procesaron 4 ml en CellTracks® AutoPrep® y luego se escanearon en CellTracks Analyzer II®. La Tabla 3 es una tabla generada a partir de las muestras de pacientes. La CMMC en pacientes con mieloma múltiple varió de 0-2244/4,0 ml de sangre. Se detectaron una o más CMMC en el 82% de los pacientes, ≥ 5 en el 64%, ≥ 10 en el 59% y ≥ 100 en el 23%.

Tabla 3: de CMMC de pacientes con mieloma múltiple

Muestra	Eventos totales	Células CD38+, CD 138+CD19/45	Eventos no asignados
1	19065	73	18328
2	5420	433	4987
3	6098	12	6086
4	7680	22	7658
5	26561	2244	24317
6	7682	52	7630
7	18621	63	18558
8	14889	111	14778
9	7039	13	7026
10	12608	15	12593
11	9708	2	9706
12	34273	5	34268
13	21771	182	21589
14	7097	0	7097
15	2988	3	2985
16	7936	1	7935
17	10879	69	10810
18	4990	0	4990
19	6153	12	6141
20	4248	0	4248
21	13757	0	13757
22	3334	1	3333

Ejemplo 9 Captura usando muestras normales de Anti-CD 38 y Anti-CD 138

También se probaron doce donantes normales, usando la misma configuración de kit que en el Ejemplo 8. Estas muestras se hicieron en donantes internos y se procesaron 4 ml de sangre en CellTracks® AutoPrep® y luego se escanearon en el CellTracks Analyzer II®. La tabla 4 es una tabla generada a partir de las muestras de sangre de 4 ml. En 4,0 ml de sangre de donantes normales, se detectaron 0 CPC en 5/12 (42%) y se detectaron números bajos (1-3 CPC) en 7/12 (58%) de las muestras.

Tabla 4 de CPC de donantes normales

Muestra	Eventos totales	Células CD38+CD 138+, CD19/45-	Eventos no asignados
1	7120	2	7118
2	13075	3	13072
3	9208	3	9205
4	29057	3	29054
5	20525	1	20526
6	19619	2	19617
7	6004	1	6003
8	14456	0	14456
9	8528	0	8528
10	7966	0	7966
11	17311	0	17311
12	5924	0	5924

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para capturar, aislar y analizar células de mieloma múltiple circulantes en una muestra de sangre obtenida de un sujeto de prueba que comprende
- (a) poner en contacto dicha muestra con partículas magnéticas coloidales que se conjugan con un primer ligando, que es anti-CD138, y un segundo ligando, que es anti-CD38;
- 10 (b) someter la muestra del paso (a) a un campo magnético para producir una facción separada de células de mieloma múltiple circulantes unidas a partículas magnéticas;
- (c) tratar la muestra del paso (b) con un primer marcador adicional; y
- (d) analizar las células de mieloma múltiple circulantes.
- 15 **2.** El método de la reivindicación 1, en donde la muestra tiene un volumen de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 10 ml, de aproximadamente 3 ml a aproximadamente 7,5 ml, o de aproximadamente 4 ml.
- 3.** El método de la reivindicación 1, en donde dichas partículas magnéticas coloidales se conjugan con más de dos ligandos, opcionalmente en donde uno de los ligandos es anti-CD56.
- 20 **4.** El método de la reivindicación 1, en donde dicho primer marcador adicional se selecciona del grupo que consiste de DAPI, anti-CD38, anti-CD19 y anti-CD45 anti-CD138, anti-CD56, anti-lambda, anti-kappa anti-CD200, anti-Ki67.
- 5.** El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto la muestra del paso (b) con un segundo marcador adicional, opcionalmente (i) en donde dicho segundo marcador adicional se selecciona del grupo que consiste de anti-CD19, anti-CD45 y DAPI.
- 25 **6.** El método de la reivindicación 5 que comprende además poner en contacto la muestra del paso (b) con un tercer marcador adicional, opcionalmente en donde dicho tercer marcador adicional se selecciona del grupo que consiste de anti-CD19, anti-CD45 y DAPI.
- 30 **7.** El método de la reivindicación 6 que comprende además poner en contacto la muestra del paso (b) con un cuarto marcador adicional, opcionalmente en donde el cuarto marcador adicional es anti-CD45.
- 8.** El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto la muestra del paso (b) con cuatro o más marcadores adicionales.
- 35 **9.** Un método para determinar si un paciente es un candidato probable para una intervención terapéutica para enfermedades asociadas con células plasmáticas anormales que comprende
- (a) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra, en donde el procesamiento comprende el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y
- 40 (b) determinar por recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor que o igual al intervalo normal.
- 10.** El método de la reivindicación 9 en donde el intervalo normal de CMMC en una muestra de paciente es inferior a 7 CMMC en aproximadamente de 2 ml a 10 ml de sangre.
- 45 **11.** El método de la reivindicación 9 que comprende además recomendar una intervención terapéutica si el número de CMMC es mayor que 8 en de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 10 ml de sangre.
- 50 **12.** Un método para determinar si un paciente que se está sometiendo a intervención terapéutica está reduciendo el número de CMMC o para determinar si un paciente que tenía una enfermedad de células plasmáticas anormales y que ha sido tratado con éxito para dicha enfermedad, permanece en remisión; el método comprendiendo
- (a) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra en un primer punto en el tiempo, en donde el procesamiento comprende el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
- 55 (b) determinar mediante recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor o igual al intervalo normal;
- (c) procesar la sangre de dicho paciente para determinar cuántas CMMC hay en la muestra en un segundo punto en el tiempo, en donde el procesamiento comprende el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8; y
- 60 (d) determinar mediante recuento si el número de CMMC presentes en dicha muestra es igual o mayor que o igual al intervalo normal;
- (e) comparar los números en los pasos (b) y (d).
- 65

13. Un reactivo para capturar células de mieloma múltiple circulantes que comprende partículas magnéticas coloidales y por lo menos dos ligandos, en donde los por lo menos dos ligandos comprenden anti-CD138 y anti-CD38.

5

Figura 1: Tinción de CD138 en Líneas Celulares H929, MM.1S y RPMI 8226

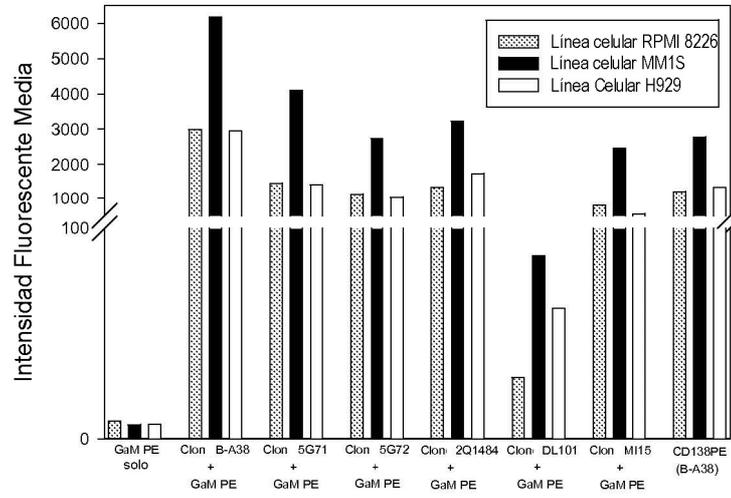


Figura 2: FITC de CD38 y Tinción de PE en Líneas Celulares RPMI 8226, H929, y MM.1S

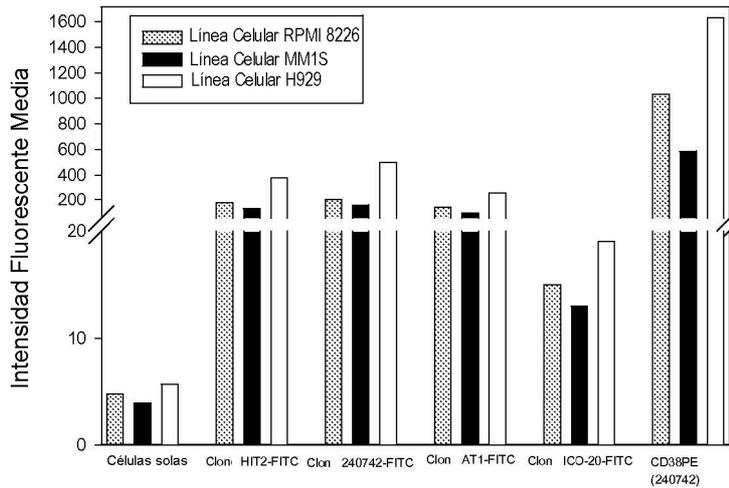


Figura 3: Tinción de CD19 APC en PBMC

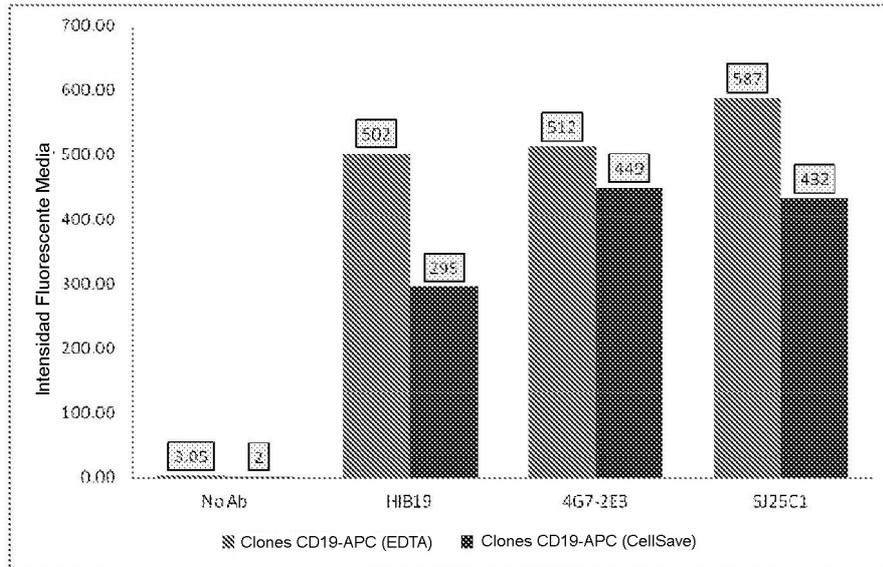


Figura 4: Tinción de CD19-APC de PBMN a Varias Diluciones

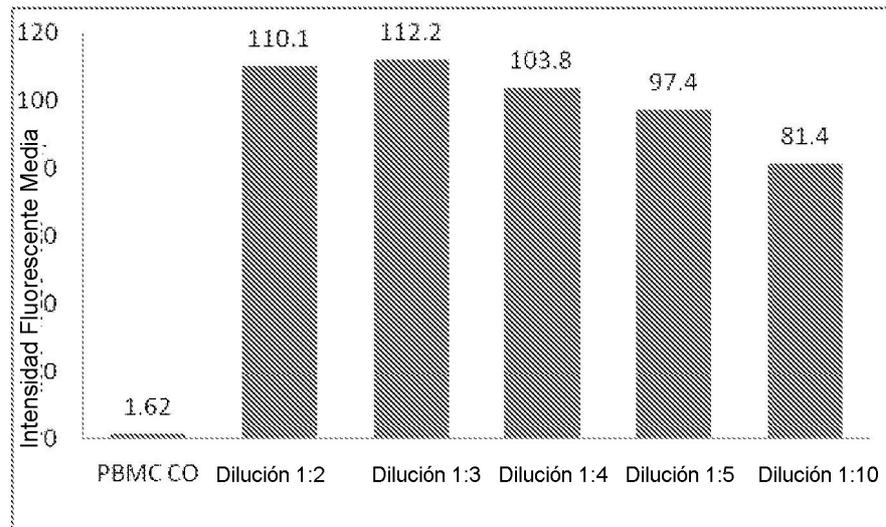


Figura 5: **CD56 FITC Tinción en PBMC**

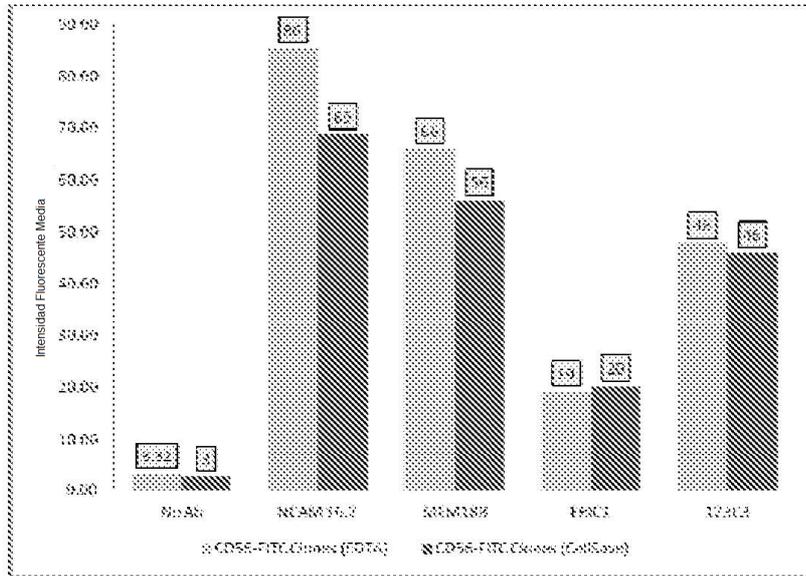


Figura 6: **CD56 FITC Tinción en Líneas Celulares**

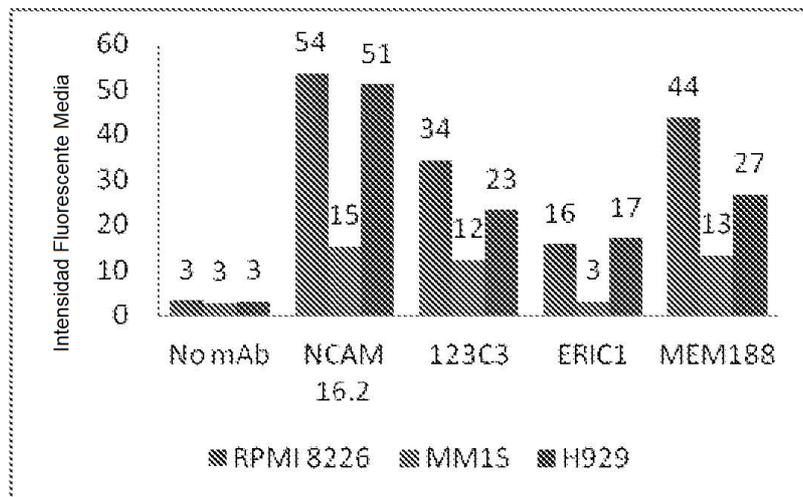


Figura 7 Tinción de CD56 FITC de Células H929 a Varias Diluciones

No CD56 FITC

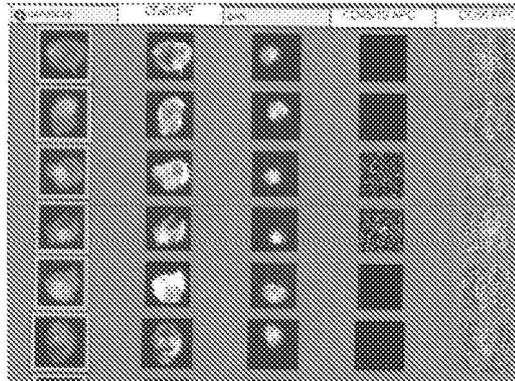


Figura 8

Dilución 1:5 de CD56 FITC

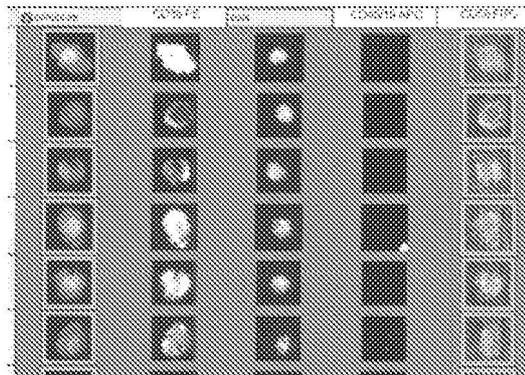


Figura 9

Dilución 1:4 de CD56 FITC

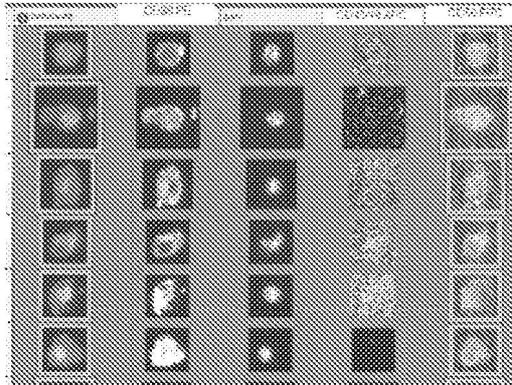
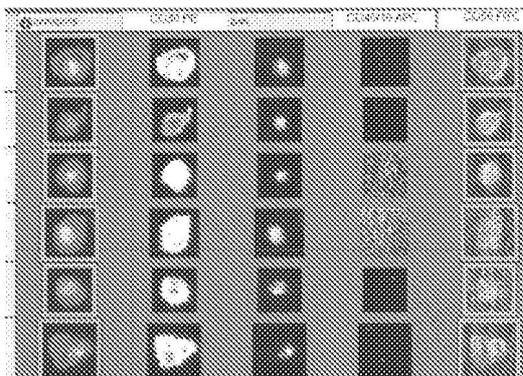


Figura 10

Dilución 1:3 de CD56 FITC



**Figura 11: Imágenes de CellTracks® de Líneas Celulares H929 y MM.1S
Recuperadas de Sangre de CellSave**

Células MM.1S

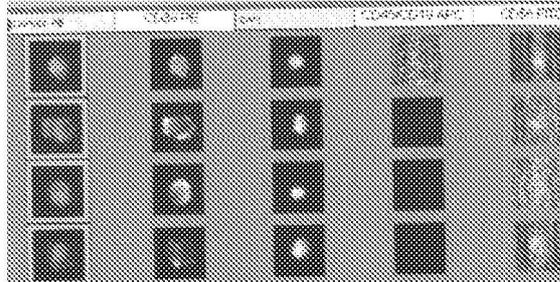


Figura 12

Células H929

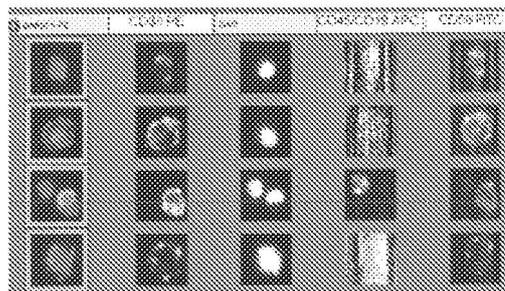


Figura 13: Imágenes de CellTracks® de Glóbulos blancos Sobrantes de Sangre de CellSave

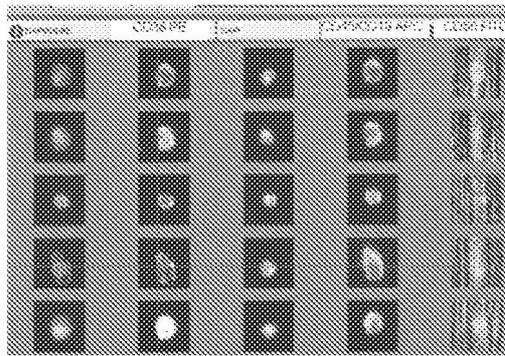


Figura 14: Imágenes de CellTracks® de Muestras de Pacientes con Mieloma Múltiple

Muestra Número: 7

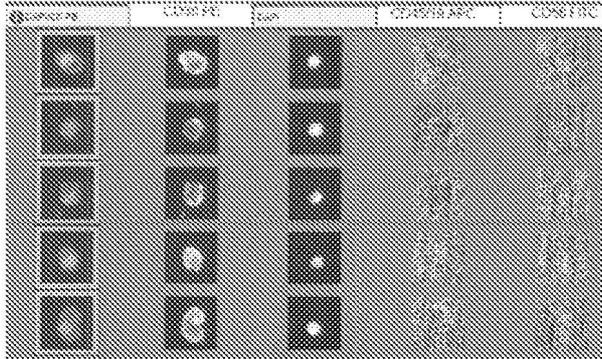


Figura 15

Muestra Número: 8

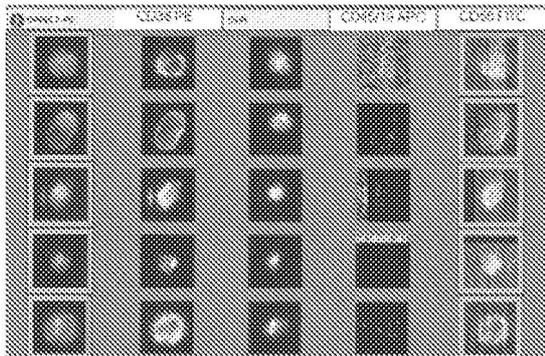


Figura 16:

Número de Muestra: 4

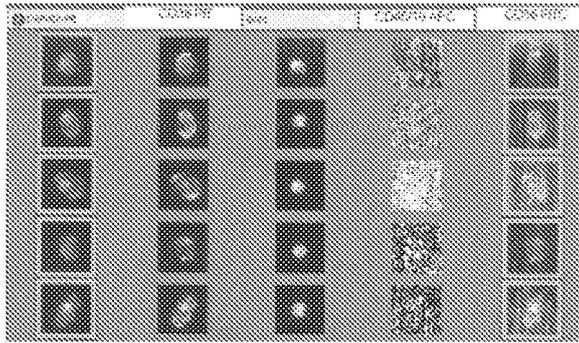


Figura 17

Número de Muestra: 6

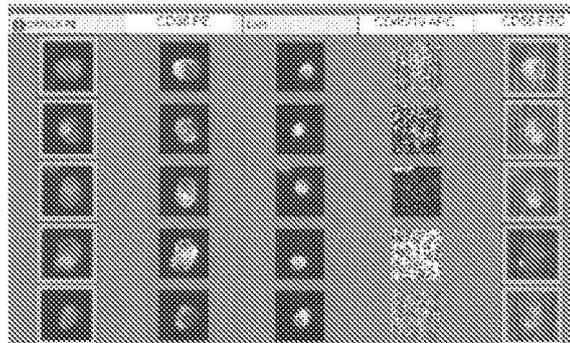


Figura 18: Imágenes de CellTracks® (Flechas de Células CD38+, CD45/19- de Normales)

