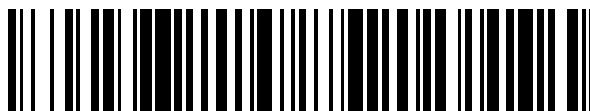


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 102**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2021** **PCT/NL2021/050367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2021** **WO21251824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2021** **E 21733234 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 4165413**

54 Título: **Medios y métodos para la identificación y clasificación de tumores pediátricos**

30 Prioridad:

10.06.2020 EP 20179302

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

19.11.2024

73 Titular/es:

STICHTING EUROFLOW (33.3%)
Dreef 6 f
7202 AG Zutphen, NL;
ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN H.O.D.N.
LUMC (33.3%) y
UNIVERSITY OF SALAMANCA (33.3%)

72 Inventor/es:

DE SA FERREIRA FACIO, CRISTIANE;
DESSANTI BOTAFOGO GONÇALVES, VITOR;
SOBRAL DA COSTA, ELAINE;
VAN DONGEN, JACOBUS JOHANNES MARIA y
ORFAO DE MATOS CORREIA E VALE, JOSÉ
ALBERTO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 988 102 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

Medios y métodos para la identificación y clasificación de tumores pediátricos

La invención se refiere al campo del diagnóstico médico. En particular, se refiere al diagnóstico de tumores pediátricos utilizando citometría de flujo. La invención proporciona métodos y reactivos para la detección y el monitoreo de tumores pediátricos mediante citometría de flujo multiparamétrica (MFC) utilizando un solo tubo. También se proporcionan herramientas para la caracterización simultánea de linfocitos infiltrantes tumorales (TILs) y monocitos/células dendríticas infiltrantes tumorales (TIM) que infiltran los tejidos tumorales. Además de la detección y caracterización de las células tumorales en sitios de tumores primarios, una composición de reactivo de la invención también permite la detección de células tumorales en tejidos distintos que los del tumor primario a través del análisis de sangre periférica, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejidos tumorales metastásicos y cualquier otra muestra de tejido de los pacientes, y la evaluación de la eficacia del tratamiento. También se proporcionan kits y métodos relacionados con la composición del reactivo.

Los tumores sólidos pediátricos comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades que ocurren predominantemente en el intervalo de edad de 0-15 años. A nivel mundial se estima una incidencia de más de 175,000 casos por año y una tasa de mortalidad de 96,000 niños por año. Los tumores sólidos representan aproximadamente el 75% de todos los cánceres infantiles y estos comprenden linfomas, tumores del sistema nervioso central (CNS), neuroblastoma, sarcomas de tejido blando, nefroblastoma, tumores óseos, retinoblastoma, hepatoblastoma, tumores de células germinales y carcinomas (Ward E, CA Cancer J CLIN 2014;64:83).

Se sabe que el diagnóstico correcto del cáncer pediátrico es complejo y difícil. Aunque las características histológicas clásicas son generalmente altamente sugestivas de tipos de tumores específicos, la mayoría de los tumores pediátricos pueden ser indistinguibles mediante únicamente microscopía óptica e inmunohistoquímica. El diagnóstico temprano preciso, la clasificación y la estratificación del riesgo son cruciales en niños con cáncer, particularmente debido a que las distintas entidades de diagnóstico requieren terapias diferentes y altamente específicas.

Actualmente, los procedimientos convencionales utilizados para el cribado diagnóstico y la clasificación de tumores sólidos pediátricos se basan en el análisis morfológico e inmunohistoquímico de muestras de tumores sólidos fijadas con formalina y embebidas en parafina. La mayoría de los tumores sólidos pediátricos se clasifican bajo la categoría descriptiva de "tumores de células redondas pequeñas". Los tumores de células redondas pequeñas incluyen tumores formados por células no diferenciadas, de tamaño pequeño, con escaso citoplasma y núcleos redondos hiper cromáticos. Debido al hecho de que estos tumores muestran características morfológicas similares mediante microscopía óptica, el diagnóstico preciso de tumores sólidos pediátricos es a menudo desafiante, con la posibilidad de diagnóstico erróneo, en la ausencia de análisis adicionales (Magro G, Acta Histochem. 2015;117:397) Por lo tanto, son obligatorios estudios inmunohistoquímicos adicionales. A pesar de esto, no hay un panel de anticuerpos recomendado uniformemente que se pueda aplicar en dichos análisis inmunohistoquímicos para el diagnóstico específico y altamente sensible y la clasificación de la mayoría de los subtipos de cáncer infantil. Incluso más, actualmente no se dispone ni se ha descrito ninguna solución técnica basada en inmunohistoquímica o citometría de flujo, para la evaluación simultánea de todos los marcadores informativos para el diagnóstico directo y la clasificación de tumores.

Por lo tanto, en contraste con el estudio de diagnóstico de las leucemias pediátricas, donde el inmunofenotipado por MFC es esencial para un diagnóstico, clasificación y monitoreo rápidos de la enfermedad, el inmunofenotipado por MFC no se utiliza de forma rutinaria para el estudio de diagnóstico de tumores sólidos pediátricos. De hecho, hasta ahora el inmunofenotipado por MFC se ha restringido a la evaluación de un número limitado de marcadores para la identificación de entidades de diagnóstico específicas, incluyendo aquellas que expresan fenotipos altamente característicos, como el perfil fenotípico CD45-CD56+ en tumores neuroendocrinos (Bryson GJ, J Clin Pathol. 2002;55:535) el inmunofenotipo CD45-CD56+GD2+ del neuroblastoma (Bozzi F, Anticancer Res.2006;26:3281), las características CD57+CD56+CD99+CD45- en tumores neuroectodérmicos primitivos (Dubois SG, Pediatr Blood Cancer. 2010;54:13) y el perfil CD45-CD56+ nuMiogenina+ en rhabdomyosarcoma (Almazin-Moga A, . Cytometry A. 2014; 85:1020).

Sin embargo, a pesar de que estos perfiles fenotípicos son supuestamente característicos de entidades de diagnóstico específicas entre cáncer el pediátrico, estos han mostrado sistemáticamente una eficiencia relativamente baja cuando se prueban prospectivamente en los entornos clínicos frente a procedimientos de diagnóstico convencionales, basados en paneles de combinaciones de anticuerpos de 4-6 colores, debido a su incapacidad para diferenciar con precisión entre diferentes tipos de tumores. Además, los análisis diagnósticos por MFC de tejidos de tumores sólidos infantiles no proporcionaron información simultánea sobre el tipo y la cantidad de células inflamatorias e inmunes infiltrantes tumorales que coexisten dentro del tumor en la misma muestra.

En 2013, Ferreira-Facio et al (Ferreira-Facio, PLoS One. 2013;8: e55534) investigaron el patrón de tinción de células tumorales de 52 tumores sólidos pediátricos mediante inmunofenotipado por MFC utilizando un panel más grande de combinaciones de anticuerpos que contenía 33 especificidades de anticuerpos distintas en múltiples tubos de hasta 8 colores. En el estudio anterior, todas las muestras reactivas/inflamatorias clasificadas como tales mediante criterios histopatológicos convencionales también fueron diagnosticadas correctamente mediante solamente MFC. De manera similar, en todas menos dos muestras de linfoma poco comunes, las células tumorales se detectaron mediante MFC. Con base en este estudio, se concluyó que la evaluación combinada de CD45, CD56, CD81, CD99, EpCAM, GD2, nuMyoD1 nuclear, nuMiogenina y CD271, además de otros marcadores específicos de células B y células T, podría ser un panel de anticuerpo útil tanto para el diagnóstico como para la clasificación de tumores. Sin embargo, los autores fracasaron en proporcionar una forma para combinar todos los marcadores informativos en una única combinación de anticuerpos que permitiera tanto: i) identificación de células tumorales de cáncer pediátrico; ii) su clasificación diagnóstica y iii) análisis detallado de células inmunes infiltrantes tumorales que coexisten en la misma muestra. Además, fracasaron sistemáticamente en la identificación de algunos subtipos de tumores, como el linfoma de Hodgkin.

Paralelamente, en WO2010/140885 van Dongen et al. reportaron un panel de reactivos de anticuerpo conjugado con compuestos fluorescentes para utilizarse en la caracterización inmunofenotípica de poblaciones de células leucocitarias normales, reactivas, en regeneración y neoplásicas. Sin embargo, dicho panel de combinaciones de anticuerpos está completamente restringido a pacientes con leucemia y linfoma, y no se ha realizado ningún intento similar en cáncer pediátrico en lo que respecta al diagnóstico, clasificación y monitoreo de tumores sólidos no hematopoyéticos versus neoplasias malignas hematológicas (por ejemplo, linfoma pediátrico).

Por lo tanto, los presentes inventores se propusieron diseñar una combinación única de reactivos de anticuerpo que permita la identificación y clasificación sistemática de células tumorales en muestras de tumores sólidos pediátricos y simultáneamente proporcione una caracterización detallada de las células inmunes infiltrantes que coexisten en la misma muestra. Además, su objetivo era proporcionar un protocolo de MFC que incluyera una combinación única y exclusiva de reactivos de anticuerpo para el cribado diagnóstico y la clasificación de tumores sólidos en pacientes pediátricos y un análisis detallado simultáneo del microambiente de las células inmunes del tumor.

Estos objetivos se cumplieron sorprendentemente mediante el desarrollo de una novedosa combinación de anticuerpos de ≥ 8 colores/fluorocromo para la detección simultánea de ≥ 12 proteínas diferentes que muestran perfiles de expresión variables pero característicos en células tumorales individuales presentes en muestras de tumor sólido infantil, y permite la identificación y clasificación del cáncer pediátrico en diferentes entidades de diagnóstico y la evaluación simultánea de las células inmunes infiltrantes tumorales. Más en particular, se encontró que esto se puede lograr mediante la tinción para (i) los marcadores de la superficie celular CD45, CD56, GD2, CD99, CD8, EpCAM, CD4, smCD3, CD19 y CD271; (ii) el marcador citoplasmático cyCD3; y (iii) el(los) marcador(es) nuclear(es) nuMiogenina y/o nuMyoD1, en el que los anticuerpos contra los marcadores CD99/CD8 están conjugados a un primer fluorocromo y representan un primer par marcador CD99/CD8; los anticuerpos contra los marcadores EpCAM/CD4 están conjugados a un segundo fluorocromo y representan un segundo par marcador EpCAM/CD4, y el anticuerpo contra CD271 está conjugado a un tercer fluorocromo como el anticuerpo contra ya sea cyCD3 o smCD3 y representa un tercer par marcador CD271/cyCD3 o CD271/smCD3. Para poder permitir una tinción gradual de los marcadores de la superficie celular en células intactas en una alícuota de una muestra de prueba, seguido por la permeabilización de la misma alícuota y la tinción para marcadores intracelulares y nucleares, los anticuerpos contra los marcadores citoplásmicos y nucleares se separan físicamente de (es decir, no se mezclan con) los anticuerpos contra los marcadores de la superficie celular.

Por lo tanto, la invención se refiere a un kit de piezas para la detección por citometría de flujo de células tumorales pediátricas, el kit comprende anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos contra los marcadores de la superficie celular CD45, CD56, GD2, CD99, CD8, EpCAM, CD4, smCD3, CD19 y CD271, el marcador citoplasmático cyCD3 y el(los) marcador(es) nuclear(es) nuMiogenina y/o nuMyoD1, en el que

(i) los anticuerpos contra los marcadores CD99/CD8 están conjugados al mismo fluorocromo y representan un primer par marcador CD99/CD8;

(ii) los anticuerpos contra los marcadores EpCAM/CD4 están conjugados al mismo fluorocromo y representan un segundo par marcador EpCAM/CD4,

(ii) el anticuerpo contra CD271 está conjugado al mismo fluorocromo que el anticuerpo contra ya sea cyCD3 o smCD3 y representa un tercer par marcador CD271/cyCD3 o CD271/smCD3;

en el que el kit comprende los anticuerpos conjugados a ≥ 8 fluorocromos distinguibles (al menos una combinación de anticuerpos de 8 colores);

y en el que, entre los primeros, segundos y terceros pares de marcadores los fluorocromos son distinguibles; y en el que los anticuerpos contra los marcadores citoplasmáticos y nucleares están físicamente separados de los anticuerpos contra los marcadores de la superficie celular.

5 Este kit para la tinción de una alícuota de una suspensión celular individual contiene un panel único de una combinación de anticuerpos conjugados con fluorocromo contra un conjunto de 12 "marcadores principales", en el que los anticuerpos contra ciertos marcadores seleccionados están conjugados a un fluorocromo único y distinto, mientras que los anticuerpos contra otros marcadores seleccionados están "pareados", es decir, los anticuerpos para diferentes marcadores están conjugados al mismo fluorocromo.

10 Por ejemplo, en un kit de la invención, los anticuerpos contra los 4 marcadores seleccionados CD45, CD56, GD2 y nuMiogenina están conjugados cada uno a un fluorocromo distinto (es decir, fluorocromos 1 a 4, respectivamente), mientras que los anticuerpos contra cada uno de los pares de marcadores CD99/CD8, EpCAM/CD4, CD271/cy/smCD3 se combinan con otro fluorocromo, pero distinto (es decir, fluorocromos 5 a 8, respectivamente) (es decir, la combinación de anticuerpos 1 en la Tabla 1).

15 Se abarcan varios diseños de kit que comprenden al menos dos recipientes (tubos de reactivos). Por ejemplo, el kit puede contener más de dos recipientes, el número total de recipientes que comprende el panel de anticuerpo único como se proporciona en la presente. En una realización, los anticuerpos conjugados contra los marcadores de la superficie celular se dividen en dos o más recipientes. Asimismo, los anticuerpos conjugados contra el marcador citoplasmático cyCD3 y el(los) marcador(es) nuclear(es) nuMiogenina y/o nuMyoD 1 pueden estar presentes en recipientes separados. Por conveniencia, el kit comprende
20 preferiblemente una primera composición de reactivos que comprende una mezcla de los anticuerpos conjugados contra los marcadores de la superficie celular CD45, CD56, GD2, CD99, CD8, EpCAM, CD4, smCD3, CD19 y CD271 contenidos en un primer recipiente, y una segunda composición de reactivos que comprende los anticuerpos conjugados contra el marcador citoplasmático cyCD3 y el(los) marcador(es) nuclear(es) nuMiogenina y/o nuMyoD1, contenidos en un segundo recipiente.

25 De acuerdo con la invención, se utilizan como marcadores tanto la versión citoplásmica (cy) como la de membrana superficial (sm) de CD3, y el marcador CD271 siempre está pareado con cyCD o con smCD3. El marcador cyCD3 puede ser un marcador único o puede formar un par marcador con CD271, mientras que el marcador smCD3 puede formar un par marcador con CD271 o con CD19.

30 En una realización, el kit de piezas comprende anticuerpos contra el tercer par marcador CD271/cyCD3, y los anticuerpos contra los marcadores smCD3/CD19 están conjugados al mismo fluorocromo para formar un cuarto par marcador smCD3/CD19, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles. Véase, por ejemplo, una cualquiera de las combinaciones 1-3, 7-16 y 18-29 en la Tabla 1. En otra realización, el kit de piezas comprende el tercer par marcador CD271/smCD3, y los anticuerpos contra los marcadores CD19 y cyCD3 están conjugados cada uno a un fluorocromo distinto. Véase, por ejemplo, una cualquiera de las
35 combinaciones 4-6, 17 y 30 en la Tabla 1.

Un kit de la invención se caracteriza adicionalmente por la presencia de anticuerpos contra ya sea uno o ambos de los marcadores nucleares nuMiogenina y nuMyoD 1. En una realización, solamente se utiliza el marcador nuMiogenina. Véase, por ejemplo, una cualquiera de las combinaciones 1, 4, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 23-26 en la Tabla 1. Por lo tanto, los 12 marcadores se pueden conjugar con un total de 9 fluorocromos: cada uno de 6
40 marcadores (CD45, CD56, GD2, nuMiogenina, CD19 y cyCD3) se conjuga a un fluorocromo distinto, y los otros 6 marcadores se colocan en pares de anticuerpos (CD99/CD8, EpCAM/CD4 y smCD3/CD271), estando cada par combinado con un fluorocromo diferente. En otra realización, solamente se utiliza el marcador nuMyoD 1. Véase, por ejemplo, una cualquiera de las combinaciones 2, 5, 8, 10, 16, 17, 19, 21, 27, 29-30 en la Tabla 1. En aún otra realización, la invención proporciona un kit de piezas que comprende anticuerpos contra los
45 marcadores nuMiogenina y nuMyoD1, y en el que los anticuerpos contra los marcadores nuMiogenina/nuMyoD1 se conjugan al mismo fluorocromo para formar un par marcador adicional nuMiogenina/nuMyoD1, y en el que entre diferentes pares (es decir, el par CD99/CD8, el par EpCAM/CD4, el par CD271/(cy/sm)CD3 y el par nuMiogenina/nuMyoD1) los fluorocromos son distinguibles. Véase, por ejemplo, una cualquiera de las combinaciones 3, 6, 12, 14, 20, 22 y 28 en la Tabla 1.

50 Realizaciones adicionales de esta invención se refieren a cualquiera de las combinaciones de anticuerpos anteriores que se expanden para incluir marcadores adicionales conjugados con hasta cinco fluorocromos adicionales distintos para un total de hasta 12 a 14 colores diferentes (es decir, fluorocromos), para una identificación y caracterización adicional de células del linfoma de Hodgkin, tumores de células germinales y/o tumores óseos. Para células del linfoma de Hodgkin, se pueden seleccionar uno o más marcadores de las
55 siguientes proteínas: HLADR, CD30, CD71, CD40 y CD95. Para una caracterización adicional de los tumores de células germinales, se podrían utilizar los marcadores OCT-3/4, BAP y/o PLAP, mientras que para los tumores óseos se podrían utilizar osteopontina y/o fosfatasa alcalina ósea además de los 12 marcadores principales anteriores.

- Por lo tanto, en alguna realización, un kit de piezas de acuerdo con la invención comprende adicionalmente anticuerpos conjugados con fluorocromo contra uno o más de los marcadores de la superficie celular del linfoma de Hodgkin, HLA-DR, CD30, CD71, CD40 y CD95. Como se ilustra mediante las combinaciones de anticuerpos ejemplares 11-14, 17-30 de la Tabla 1, se utilizan fluoróforos únicos para cada uno de los anticuerpos adicionales. En el kit, se pueden combinar adecuadamente mezclados con los anticuerpos contra los marcadores de la superficie celular CD45, CD56, GD2, CD99, CD8, EpCAM, CD4, smCD3, CD19 y CD271.
- Alternativa o adicionalmente, un kit de piezas de acuerdo con la invención puede comprender adicionalmente anticuerpos conjugados con fluorocromo contra uno o más de los marcadores de la superficie celular tumoral de células germinales, OCT-3/4, BAP y PLAP. En un aspecto, el kit comprende anticuerpos contra los marcadores OCT-3/4 y PLAP, y en el que los anticuerpos contra los marcadores OCT-3/4 /PLAP se conjugan al mismo fluorocromo para formar un par marcador OCT-3/4 /PLAP, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles. Véase las combinaciones de anticuerpos ejemplares 7, 8, 25-29 de la Tabla 1.
- Alternativa o adicionalmente, un kit de piezas puede comprender adicionalmente anticuerpos conjugados con fluorocromo contra uno o ambos marcadores de la superficie celular tumoral ósea, osteopontina y fosfatasa alcalina ósea (BAP).
- En un aspecto, el kit comprende anticuerpos contra los marcadores osteopontina y BAP, y en el que los anticuerpos contra los marcadores osteopontina/BAP están conjugados al mismo fluorocromo para formar un par marcador osteopontina/BAP, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles. Véase las combinaciones de anticuerpos ejemplares 7, 8, 21, 22, 24, 26-29 de la Tabla 1.
- En una realización específica, cuatro marcadores del linfoma de Hodgkin (es decir, HLADR, CD30, CD40 y CD95) más uno o una mezcla de dos o tres de los marcadores tumorales de células germinales anteriores (por ejemplo, OCT-3/4, BAP y/o PLAP) más uno o ambos marcadores tumorales óseos se combinan en seis posiciones de fluorocromo adicionales con los marcadores principales enlistados en las combinaciones 1, 3 y 5 (por ejemplo, combinaciones de anticuerpos 18 a 29 en la tabla 1).
- Aspectos preferibles de la invención se refieren a un kit de piezas que comprende una o más combinaciones de anticuerpos seleccionadas de las combinaciones de anticuerpos 1 hasta 30 de la Tabla 1.
- Cualquiera de las combinaciones de anticuerpos anteriores se puede combinar con un reactivo para excluir células no lisadas y/o restos, como un colorante capaz de detectar células nucleadas. Por lo tanto, también se proporciona un kit de piezas que comprende adicionalmente un colorante para la integridad de células nucleadas.
- Los fluorocromos específicos con los que se conjugan los anticuerpos para uso en la invención se pueden seleccionar de la amplia variedad de fluorocromos que se conocen en la técnica y/o de fluorocromos aún por ser desarrollados. En una realización, se utilizan los siguientes (grupos de) fluorocromos o cualquier otra combinación de fluorocromos y/o tandems de fluorocromos que se puedan medir simultáneamente en un citómetro de flujo de >8 colores: :
- i) Azul Pacífico (PacB), violeta brillante (BV)421, azul Cascada, Alexa flúor (AF)405, eFluor (EF)450, Horizon V450 (HV450), Vio-Blue, Dylight 405, Super Bright 436, BV480;
 - ii) Naranja Pacífico (PacO), OC515, BV510, BV480, amarillo Cascada, BV570, VioGreen, AF430, Amcyan, HV500, naranja cromo (KO), BUV496, EF506, Qdot 525, Qdot 545, BUV563, Qdot 565;
 - iii) Super Bright 600, BV605, eVolve 605 Qdot 585, Qdot 605;
 - v) BV650, EF625NC, EF700NC, Super Bright 645eVolve 655, Qdot 655;
 - v) Qdot 700, Super Bright 702;
 - vi) BV711, Qdot 705;
 - vii) BV750, BV785, BV786, Qdot 800;
 - viii) isotiocianato de fluoresceína (FITC), AF488, BB515, VioBright FITC, VioBright515, Cy2, Oregon Green 488, Dylight488, AF500, EF 525NC, AF514, AF532;
 - ix) ficoeritrina (PE);
 - x) Cy3, AF555, AF546, Dylight550;
 - xi) PE-CF594, PE-EF610, PE-Vio615, PE/Dazzle 594, AF568, PE-alexa594;
 - xii) EF585NC, EF605NC, PE-rojo Texas (ECD), PE-AF610;

xiii) proteína peridina clorofila (PerCP), PerCP-EF710, PERCP-Vio700, PerCPCy5.5, peridina cianina 5 (PE-cy5), BB660, BB700;

xiv) PEcy7, PE-Vio770, PE-AF750, PE-AF700, PERCP-EF710, BB790;

xv) alofocianina (APC), AF647, Cy5, EF660, AF660, AF633, EF625NC, APC-Cy5.5, EF700NC; APC-R700;

5 xvi) AF680, APC-A680, AF700, APC-A700;

xvii) APC-hilite7 (APCH7), APC-R700, APC/Fire 750, APC-Vio 770, AF680, APC-A750, APC-C750, AF700, APC-EF780, APC-cy7, Cy7, AF750, AF790.

10 Un kit de piezas como se proporciona en la presente puede comprender adicionalmente reactivos o soluciones para fijar y permeabilizar a las células, opcionalmente junto con instrucciones de uso, amortiguador y/o muestras de control. En una realización, el reactivo de fijación contiene alrededor de 0.3 a 1.5% p/v, por ejemplo, 0.5% o 1% p/v de paraformaldehído (PFA) en salina amortiguada con fosfato (PBS; pH=7.4). Los reactivos de permeabilización ejemplares contienen entre alrededor de 0.1% y 0.5% de saponina p/v diluida en PBS.

15 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de citometría de flujo multicolor para la identificación y clasificación de tumores pediátricos (sólidos), que comprende los pasos de:

(a) teñir una alícuota de una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende células tumorales infantiles con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra marcadores de la superficie celular comprendidos en un kit de pieza de acuerdo con la invención; seguido por

(b) poner en contacto las células teñidas con una solución de fijación; seguido por

20 (c) permeabilizar las células fijadas y teñidas con una solución permeabilizante; seguido por

(d) teñir las células permeabilizadas con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra los marcadores intracelulares (citoplasmáticos y nucleares) comprendidos en un kit de pieza de acuerdo con la invención;

(e) analizar las células teñidas en dichas alícuotas en un citómetro de flujo; y

(f) almacenar y evaluar los datos obtenidos.

25 Mientras que los kits y las combinaciones de anticuerpos propuestas se ejemplifican en la presente a continuación mediante el estudio de tejidos tumorales primarios, también se pueden aplicar al análisis de médula ósea, sangre periférica, efusiones pleurales, fluido ascítico, efusiones pericárdicas, líquido cefalorraquídeo, fluido vítreo, líquido sinovial, lavado broncoalveolar, orina y cualquier otro tipo de muestras biológicas obtenidas de pacientes pediátricos bajo investigación para tumores pediátricos como linfoma no
30 Hodgkin, neuroblastoma, tumor de Wilms, tumores de células germinales, sarcomas de tejidos blandos (por ejemplo, rhabdomyosarcoma, familia de tumores del sarcoma de Ewing, condrosarcoma, osteosarcoma) y tumores de células epiteliales.

35 En una realización, la muestra biológica es una muestra de tejido tumoral primario, sangre periférica, médula ósea, muestra de tejido como ganglios linfáticos, adenoide, bazo o hígado, u otro tipo de fluido corporal como líquido cefalorraquídeo, fluido vítreo, líquido sinovial, aspirado final con aguja, efusiones pleurales o ascitis, obteniéndose dicha muestra de un paciente pediátrico.

40 Por ejemplo, se coloca una alícuota de tejido en salina amortiguada con fosfato (PBS) y se somete a desagregación mecánica para preparar suspensiones celulares individuales adecuadas para análisis adicionales de citometría de flujo destinados a la máxima viabilidad celular y recuperación celular. Para este propósito, el tejido se coloca adecuadamente (por ejemplo, en una placa de Petri) en PBS que contiene albúmina de suero bovino al 0.5% p/v, luego se pica en trozos pequeños (2-4 mm) y se desagrega mecánicamente con agujas estériles. La suspensión de células tumorales resultante se puede filtrar secuencialmente (por ejemplo, utilizando una jeringa estéril con un tamaño de poro de 120 mm) para eliminar grumos de células y restos, se centrifuga y se resuspende en PBS/ BSA al 0.5 p/v%, a una concentración final
45 de $\geq 5 \times 10^5$ células/tubo. Luego se pueden colocar alícuotas de 50 μ L (es decir, 50,000 células) de la suspensión celular individual en tubos separados.

50 Como otro ejemplo, por ejemplo, con la finalidad de inmunofenotipar células malignas presentes en sitios metastásicos, se recolecta una muestra de fluido ascítico, una muestra de líquido pleural y/o una muestra de orina. La muestra (suspensión celular) se filtra secuencialmente a través de una jeringa estéril para eliminar grumos de células y restos; se centrifuga y se resuspende a una concentración final de $\geq 5 \times 10^5$ células/tubo.

Luego, se pone en contacto una alícuota de la suspensión celular individual con cada uno de los anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos contra marcadores de la superficie celular incluidos en un kit como se

define en la presente anteriormente. Las células y los reactivos de anticuerpos se mezclan bien y se incuban, por ejemplo, durante 30 minutos a RT, protegiéndolos de la luz, para permitir la unión del anticuerpo a el(los) marcador(es) de la superficie celular, si están presentes en las células. Después de esta incubación, las células se lavan y se centrifugan para eliminar los anticuerpos no unidos, y se dejan aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo para tinción adicional de marcadores intracelulares (es decir, citoplásmicos y nucleares) de acuerdo con la invención.

Con este fin, la pella celular se resuspende mezclándola suavemente con un reactivo fijador, por ejemplo, Reactivo A (un fijador que contiene PFA) del kit de reactivos de Fix&Perm™ (An der Grub, Vienna, Austria), seguido de otra incubación durante 15 minutos a TA protegiéndola de la luz. Posteriormente, las células se lavan y la pella celular se resuspende mezclándola suavemente en una solución permeabilizante (por ejemplo, Reactivo B del kit Fix&Perm™ que contiene un agente permeabilizante como saponina). Después de mezclar suavemente, se agrega el volumen adecuado de cada uno de los anticuerpos contra los marcadores intracelulares comprendidos en un kit de la invención, se mezclan y se incuban durante 15 min a TA protegiéndolos de la luz.

Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado utilizando, por ejemplo, PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% p/v, y se dejan aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo. Después de mezclar bien, el volumen residual de la pella celular se resuspende adecuadamente en 200 µL de PBS con NaN₃ al 0.09 % y BSA al 0.5% p/v y se mide inmediatamente en un citómetro de flujo multicolor, por ejemplo, un citómetro de flujo equipado con 4 láseres y 13 detectores de fluorescencia tal como un citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 equipado con 4 láseres y 13 detectores de fluorescencia.

Para el análisis de datos, se pueden utilizar estrategias de selección Booleanas manuales convencionales o análisis de agrupamiento automatizados en combinación o no con una comparación directa con bases de datos de software a través de programas de software de citometría de flujo que permiten la selección manual y/o automática y el análisis de archivos FCS.

Por ejemplo, en primer lugar, se realiza una puerta (G1) en células SSClo/FSClo/CD45hi para la identificación de linfocitos. Esta población de células G1 puede subdividirse adicionalmente dibujando 4 puertas adicionales para la identificación de subconjuntos de linfocitos de la siguiente manera: CD45^{hi}/ smCD3⁺/ cyCD3⁺ para células T (G1A), CD45^{hi}/CD19⁺ para células B (G1B), CD45^{hi}/CD19⁺ para células plasmáticas (G1C) y CD45⁺/smCD3/cyCD3⁻ / CD56⁺ para células NK (G1D). Las células T se pueden subdividir adicionalmente en subconjuntos de células T CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁻.

Se puede dibujar una segunda puerta (G2) para incluir células SSC^{int/hi}/ FSC^{int/hi}/ CD45⁺ para la identificación de células mieloides. Se pueden lograr subconjuntos adicionales de poblaciones de células mieloides mediante el establecimiento de una puerta en células mieloides CD45⁺/CD4⁺ para identificar monocitos y células dendríticas versus neutrófilos y eosinófilos (SSC^{hi}/CD45⁺).

Finalmente, se puede realizar una puerta (G3) en células CD45⁻ para seleccionar células tumorales, eritroblastos, células endoteliales y estromales mesenquimales, donde las células tumorales de Wilms (Figura 1) se caracterizan por un fenotipo CD45⁻/CD56^{hi} CD271⁺ / GD2⁻ EpCAM⁻/ CD99⁻/nuMiogenina⁻ (Figura 1), células de rhabdoides por un perfil CD45⁻/ CD56^{hi}/CD271⁺/ GD2⁻/EpCAM⁻/ CD99⁻/ nuMiogenina⁺ (Figura 2), células de neuroblastoma CD45⁻/ CD56^{hi}/ CD271⁺/ GD2^{hi}/ EpCAM⁻/ CD99⁻/ nuMiogenina⁻ (Figura 3) y células PNET CD45⁻/ CD56⁺/ CD271⁺/ GD2^{lo}/ EpCAM⁻/ CD99⁺/ nuMiogenina⁻. La Figura 1 ilustra todos los pasos de análisis de datos ejemplares en una muestra de tumor de Wilms. La tabla 2 muestra el porcentaje de células neoplásicas y células inmunes en las diferentes muestras de tumores sólidos pediátricos analizadas.

Como apreciará un experto en la técnica, un panel de anticuerpos, kit o kit de acuerdo con la invención se utiliza ventajosamente en el campo del diagnóstico de cáncer pediátrico; por ejemplo, en el diagnóstico temprano, subclasificación diagnóstica, estadificación y/o monitoreo del cáncer pediátrico tanto en el sitio del tejido tumoral primario como en los sitios metastásicos (por ejemplo, fluido ascítico, efusiones pleurales, orina, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, ganglio linfático y lavado broncoalveolar, entre otras muestras de tumores) y sangre periférica. Permite distinguir con precisión entre las células tumorales y otras células residuales en la muestra y caracterizar los distintos subconjuntos de células inmunes que coexisten con las células tumorales en la misma muestra. Además, proporciona herramientas para la clasificación rápida de tumores sólidos pediátricos con alta sensibilidad (detección de 10⁻¹ a 10⁻⁵ células tumorales entre otras células en la muestra) y adicionalmente proporciona información numérica y fenotípica sobre el microambiente asociado al tumor, ya que permite la identificación y enumeración de las principales poblaciones de linfocitos, neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas y células mesenquimales, en las muestras de pacientes infiltrados o no infiltrados.

El procedimiento incluye los siguientes pasos secuenciales: i) proporcionar una muestra biológica obtenida de un paciente sospechoso de padecer un cáncer pediátrico; ii) teñir dicha muestra biológica con un panel de ≥ 12 anticuerpos (por ejemplo, una combinación de acuerdo con la Tabla 1) conjugados con 8 fluorocromos distintos en tinciones con anticuerpos de 8 colores, con el objetivo de identificar y clasificar a las células

tumorales, así como a las células inmunes infiltrantes que coexisten en la muestra; iii) medir las células teñidas en un instrumento de citometría de flujo de >8 colores convencional, y; iv) analizar los datos de citometría de flujo obtenidos utilizando herramientas de software dedicadas para identificar claramente células tumorales versus células normales que coexisten en la muestra, enumerar adicionalmente dichas células tumorales, definir los niveles de expresión por célula de cada marcador que se está expresando en ella, clasificar las células tumorales en distintas entidades de diagnóstico de la WHO de acuerdo con su perfil inmunofenotípico, e identificar y enumerar las distintas poblaciones de células inmunes y sus subconjuntos principales que coexisten con las células tumorales en la muestra.

El procedimiento aquí descrito se puede utilizar para el diagnóstico y la clasificación de los tipos más comunes de tumores pediátricos, incluyendo: i) neoplasias neuroectodérmicas, como neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma, sarcoma de Ewing extraóseo y sarcoma de Ewing clásico, para los cuales los antígenos más útiles son CD45⁺, CD56⁺, CD99⁺, GD2⁺ y CD271⁺; ii) tumores con diferenciación celular de miofibroblastos evaluados mediante un fenotipo CD45⁻, CD56⁺, anti- ν Myogenina⁺, anti- ν MyoD1⁺ y CD271⁺; iii) identificación del compromiso en múltiples linajes celulares definidos mediante el patrón de expresión de, por ejemplo, CD45⁻, CD56⁺, CD271⁺ y EpCAM⁺ en tumor de Wilms; y iv) linfoma/leucemia linfoblástico T y B que característicamente muestran expresión de cyCD3⁺ y CD45⁺CD19⁻, versus células tumorales CD19⁺ CD45⁻ cyCD3⁻.

Además, la invención también permite la identificación simultánea por citometría de flujo de linfocitos (células CD45⁺/SSC^{lo}) incluyendo células T cyCD3⁺/CD3⁺, células B CD19⁺ y células NK CD 19⁻/CD3⁺/CD56⁺, células plasmáticas CD 19⁺/CD45^{lo} y monocitos CD4⁺/SSC^{int} y células dendríticas, además de células mesenquimales CD271⁺⁺ y células endoteliales.

De acuerdo con la expresión de CD56, CD4 y CD8, las células T se pueden dividir adicionalmente en células T CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁻/CD8⁺, CD4⁻/CD8⁻; cada uno de estos subconjuntos de células T se puede dividir adicionalmente en subconjuntos que expresan o no CD56. Simultáneamente, las células NK CD56⁺ se pueden subdividir adicionalmente en subconjuntos NK CD56^{hi}, CD56^{lo}/CD8⁻, CD56^{lo}/CD8⁺.

En particular, cada uno de los kits y combinaciones de anticuerpos proporcionados en la presente para identificar y clasificar la población de células tumorales, también proporciona medios para cuantificar niveles de expresión de proteínas por célula tumoral; por lo tanto, proporciona información crítica, no solamente para el diagnóstico, clasificación y monitoreo de tumores sólidos pediátricos, sino también para seleccionar terapias dirigidas adecuadas (por ejemplo, anti-GD2 en neuroblastoma GD2⁺ y otros tumores GD2⁺). La invención también podría utilizarse para detectar y contar células tumorales en muestras de médula ósea y de sangre periférica antes del trasplante autólogo de células madre, o con fines de monitoreo después de que se haya administrado cualquier tipo de terapia al paciente. Además, esta invención también se puede utilizar para identificar células neoplásicas y no neoplásicas en muestras pequeñas y/o paucicelulares tales como fluido vítreo, líquido cefalorraquídeo y muestras de tejido aspiradas con aguja fina para fines de estadificación, diagnóstico de recurrencia de la enfermedad o monitoreo del paciente en niveles residuales de la enfermedad.

El resultado diagnóstico de un método de citometría de flujo de la invención se utiliza ventajosamente para ayudar a seleccionar una terapia adecuada (dirigida) tal como una terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) o basada en anticuerpos anti-GD2.

La invención también proporciona el uso *in vitro* de un kit de piezas como se divulga en la presente en el diagnóstico y clasificación de uno o más tumores pediátricos. Por ejemplo, el tumor pediátrico se selecciona de: i) neoplasias neuroectodérmicas, como neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma, sarcoma de Ewing extraóseo y sarcoma de Ewing clásico; ii) tumores con diferenciación celular de miofibroblastos; iii) identificación del compromiso en múltiples linajes celulares; y iv) linfoma/leucemia linfoblástico T y B.

Legenda de las figuras

Figura 1: Análisis de estrategia de selección secuencial para identificar los principales subconjuntos de poblaciones en una muestra de masa tumoral utilizando gráficas de puntos de 2 dimensiones. El panel A muestra la identificación de tres grupos de poblaciones celulares: G1 (SSC^{lo} /CD45^{hi}) representa linfocitos, G2 (SSC^{int/hi} /CD45⁺) células mieloides y G3 (SSC^{int-hi} /CD45⁻) células tumorales. En la puerta de las células G1 (Panel B), 4 puertas adicionales permitieron la identificación de las principales poblaciones de linfocitos: C) células B CD45^{hi}/CD19⁺ (G1B) y D) células plasmáticas CD45^{lo}/CD19⁺ (G1C); y, F) células NK CD45⁺/ ν CD3⁻ /cyCD3⁻ /CD56⁺ (G1D). Células T adicionales (células T CD45^{hi}/ ν CD3⁺/cyCD3⁺ - G1A) se subdividieron en el panel E como: subconjuntos de células T CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁻/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁻. En la puerta de las células G2 (panel G), 3 puertas adicionales basadas en 1 gráfica de puntos bivariada (SSC/CD45) permitieron la identificación de eosinófilos (SSChi/CD45⁺), neutrófilos (SSC^{int}/CD4^{lo}) y monocitos (SSC^{int}/CD45⁺); además, en el panel H, una gráfica de puntos bivariada (SSC/CD4) permitió una mejor discriminación entre neutrófilos/eosinófilos (SSC^{int}/CD4⁻) y monocitos/macrófagos/células dendríticas (SSC^{int}/CD4⁺) en la puerta de las células G2. Finalmente, en la puerta de las células G3, las células tumorales se caracterizaron como un fenotipo CD45⁻ / CD56^{hi} / CD271⁺ / GD2⁻ / EpCAM⁻ / CD99⁻ / ν miogenina⁻ (tumor de Wilms).

Figura 2: Estrategia de selección secuencial para identificar los principales subconjuntos de poblaciones en una muestra de efusión pleural utilizando gráficas de puntos de 2 dimensiones. El panel A muestra la identificación de tres grupos de poblaciones celulares: G1 ($SSC^{lo}/CD45^{+hi}$) representa linfocitos, G2 ($SSC^{int/hi}/CD45^{+}$) células mieloides y G3 ($SSC^{hi}/CD45^{-}$) células tumorales. En las células G1 (Panel B), 4 puertas adicionales permitieron la identificación de las principales poblaciones de linfocitos: C) células B $CD45^{+hi}/CD19^{+}$ (G1B) y células plasmáticas $CD45^{+lo}/CD19^{+}$ (G1C); y, D) células NK $CD45^{+}/_{sm}CD3^{-}/_{cy}CD3^{-}/CD56^{+}$ (G1D). Células T adicionales (células T $CD45^{+hi}/_{sm}CD3^{+}/_{cy}CD3^{+}$ - G1A) se subdividieron en el panel E) subconjuntos de células T $CD4^{+}/CD8^{-}$, $CD4^{+}/CD8^{+}$, $CD4^{+}/CD8^{+}$ $CD4^{-}/CD8^{-}$. G) Después de la selección de células G2, 3 puertas adicionales basadas en 1 gráfica de puntos bivariada ($SSC/CD45$) permitieron la identificación de eosinófilos ($SSC^{hi}/CD45^{+}$), neutrófilos ($SSC^{int}/CD45^{+lo}$) y monocitos ($SSC^{int}/CD45^{+}$); H) análisis adicional de la gráfica de puntos bivariada ($SSC/CD4$) de la población G2 permitió una mejor discriminación entre neutrófilos ($SSC^{int}/CD4^{+}$) y monocitos/células dendríticas ($SSC^{int}/CD4^{+}$). Finalmente, la población G3 seleccionada se analizó para la selección e identificación de los marcadores celulares más relevantes para clasificar las células tumorales caracterizadas por un fenotipo $CD45^{-}/CD56^{+hi}/CD271^{+hi}/GD2^{-}/EpCAM^{-}/CD99^{-}/_{nu}MyoD1^{+}$ (Rabdomiosarcoma).

Figura 3: Estrategia de selección secuencial para identificar los principales subconjuntos de poblaciones en la médula ósea utilizando gráficas de puntos de 2 dimensiones. El panel A muestra la identificación de tres grupos de poblaciones celulares. G1 ($SSC^{lo}/CD45^{+hi}$) representa linfocitos, G2 ($SSC^{int/hi}/CD45^{+}$) células mieloides y G3 ($SSC^{hi}/CD45^{-}$) células tumorales. En la puerta de las células G1 (Panel B), 4 puertas adicionales permitieron la identificación de las principales poblaciones de linfocitos: C) células B $CD45^{+hi}/CD19^{+}$ (G1B) y células plasmáticas $CD45^{+lo}/CD19^{+}$ (G1C); y, D) células NK $CD45^{+}/_{sm}CD3^{-}/_{cy}CD3^{-}/CD56^{+}$ (G1D). Células T adicionales (células T $CD45^{+hi}/_{sm}CD3^{+}/_{cy}CD3^{+}$ - G1A) se subdividen en el panel E) subconjuntos de células T $CD4^{+}/CD8^{-}$, $CD4^{+}/CD8^{+}$, $CD4^{+}/CD8^{+}$ y $CD4^{-}/CD8^{-}$. G) Después de la selección de células G2, 3 puertas adicionales basadas en 1 gráfica de puntos bivariada ($SSC/CD45$) permitieron la identificación de eosinófilos ($SSC^{hi}/CD45^{+}$), neutrófilos ($SSC^{int}/CD45^{+lo}$) y monocitos ($SSC^{int}/CD45^{+}$); H) análisis adicional de la gráfica de puntos bivariada ($SSC/CD4$) de la población G2 permitió una mejor discriminación entre neutrófilos ($SSC^{int}/CD4^{+}$) y monocitos/células dendríticas ($SSC^{int}/CD4^{+}$). Finalmente, en la puerta de las células G3, las células tumorales se caracterizaron por un fenotipo $CD45^{-}/CD56^{+hi}/CD271^{-+}/GD2^{++}/EpCAM^{-}/CD99^{-}/_{nu}MyoD1^{-}$ (Neuroblastoma), mientras que las células eritroides nucleadas se presentan como $SSC^{lo}/CD45^{-}/CD56^{-}$ y las células mesenquimales como $SSC^{hi}/CD45^{-}/CD56^{-+lo}/CD271^{+hi}$.

Sección experimental

La invención se ejemplifica mediante los ejemplos a continuación, que se proporcionan con fines ilustrativos y de ninguna manera limitan el alcance.

Ejemplo 1 : Análisis de una muestra de masa tumoral.

Recolección de muestra. Se recolectaron en el quirófano muestras de tumores sólidos de cincuenta y cinco pacientes pediátricos; Las muestras de tumores se enviaron a patología y un patólogo experimentado las dividió en dos alícuotas: una se utilizó para patología convencional y la segunda para citometría de flujo. La alícuota de tejido utilizada para citometría de flujo se colocó inmediatamente en salina amortiguada con fosfato (PBS) en hielo húmedo y se transportó al laboratorio de citometría de flujo. Una vez que llegó la muestra, se pesó, se registró una descripción física y la muestra se dividió adicionalmente en dos fragmentos pequeños: uno para almacenamiento fresco congelado a -80°C y el otro para disgregación mecánica inmediata.

Desagregación mecánica de la muestra tumoral. Cincuenta y cinco muestras de tejido tumoral se disgregaron inmediatamente en suspensiones celulares individuales adecuadas para análisis adicionales de citometría de flujo dirigidos a la máxima viabilidad celular y recuperación celular. Para este propósito, el tejido se colocó en una placa de Petri en 2 ml de PBS que contiene albúmina sérica bovina al 0.5% (BSA; Calbiochem, La Jolla, CA). Luego, la muestra de tumor se picó en trozos pequeños (2-4 mm) con una hoja de bisturí y se desagregó mecánicamente con agujas estériles. Posteriormente, la suspensión de células tumorales se filtró secuencialmente a través de una jeringa Filcon estéril (tamaño de poro de 120 μm) para eliminar grumos de células y restos, se centrifugó (10 min a 540 g) y se resuspendió en 500 μl de PBS que contiene BSA al 0.5%, a una concentración final de $\geq 5 \times 10^5$ células/tubo. Luego se colocaron alícuotas de 50 μL (es decir, 50,000 células) de la suspensión celular individual en un tubo diferente. Se tiñeron un total de 4 alícuotas distintas/por muestra por tubo a adquirir.

Tinción de la muestra. Se añadieron cincuenta μl de muestra (suspensión celular individual de los tejidos desagregados) a cada una de las alícuotas de 4 tubos, seguido de la adición de los volúmenes adecuados (concentraciones de saturación) de cada una de las composiciones de reactivos correspondientes, que comprenden anticuerpos dirigidos contra marcadores de la superficie celular, como se recomienda para estos paneles de un solo tubo

i) CyCD3 BV421 + CD271 BV421/ CD45 BV510 CD99 FITC + CD8 FITC/ nuMiogenina PE/ EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 AF647/ csmD3 APC-H7 + CD19 APC-H7 (es decir, combinación de anticuerpos 1 en la Tabla 1);

5 ii) CyCD3 BV421 + CD271 BV421/ CD45 PO/ CD99 FITC+ CD8 FITC/ nuMyoD1 PE / EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 AF647/ cyCD3 APC-H7 + CD19 APC-H7 (combinación de anticuerpos 2 en la Tabla 1);

iii) CyCD3 BV786+CD271 BV786/ HLADR APC/ CD45 AF700/ CD30 APCH7/ CD71 BV650/ CD95 BV421/ CD99 FITC + CD8 FITC/ nuMyoD PE/ CD40 BV711/ EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 BV510/ smCD3 APC-H7 + CD19 APC-H7 (combinación de anticuerpos 17 en la Tabla 1)

10 iv) CyCD3 BV786 + CD271 BV786/ HLADR PECF594/ CD45 AF700/ CD30 BV650/ CD99 FITC + CD8 FITC/ GD2 BV510/ osteopontina APC/ numiogenina PE/ CD40 BV711/ EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ OCT3 APCH7/ CD95 BV421/ smCD3 BV605 + CD 19 BV605 (combinación de anticuerpos 18 en la Tabla 1).

15 Posteriormente, las células y los reactivos de anticuerpos se mezclaron bien y se incubaron durante 30 minutos a RT, protegiéndolos de la luz. Después de esta incubación, se agregaron 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% a la pella celular, se mezclaron bien y se centrifugaron durante 5 minutos a 540 xg. Luego, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo. La pella celular se resuspendió mezclando suavemente y se añadieron 100 µL de reactivo A (fijador que contiene PFA) del kit de reactivos de Fix&Perm™ (An der Grub, Vienna, Austria), seguido de otra incubación durante 15 minutos a TA protegiéndola de la luz. 20 Posteriormente, se añadieron a la pella celular 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% que contiene BSA al 0.5%, se mezcló bien y se centrifugó durante 5 minutos a 540 g.

Posteriormente, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo; la pella celular se resuspendió mezclando suavemente y se añadieron 100 µL de reactivo B (solución permeabilizante que contiene saponina) del kit Fix&Perm™. Después de mezclar suavemente, se añadió el volumen adecuado de cada uno de los anticuerpos contra marcadores intracelulares (nuMyoD 1, nuMiogenina, OCT3 y cyCD3), se mezcló y se incubó durante 15 min a TA protegiéndolos de la luz. Posteriormente, se añadieron 2 mL de PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% a la pella celular, se mezcló bien y se centrifugó durante 5 min a 540g, el sobrenadante se descartó utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo. Tras mezclar bien el volumen residual, la pella celular se resuspendió en 200 µL de PBS con NaN₃ al 0.09 % y BSA al 0.5 % y se mide inmediatamente en un citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 equipado con 4 láseres y 13 detectores de fluorescencia.

35 Análisis de datos. En primer lugar, se realizó una puerta (G1) en células SSC^{lo}/FSC^{lo}/CD45^{hi} para la identificación de linfocitos; y se seleccionaron, entonces estas células G1 se subdividieron adicionalmente dibujando 4 puertas adicionales para la identificación de subconjuntos de linfocitos de la siguiente manera: CD45^{hi}/ smCD3⁺/ cyCD3⁺ para células T (G1A), CD45^{hi}/CD19⁺ para células B (G1B), CD45^{lo}/CD19⁺ para células plasmáticas (G1C) y CD45⁺/smCD3⁻/cyCD3⁻/CD56⁺ para células NK (G1D). Las células T se subdividieron adicionalmente en subconjuntos de células T CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁻ (panel E en la Figura 1). Una segunda puerta (G2) para incluir células SSC^{int/hi}/FSC^{int/hi}/CD45⁺ se extrajo para la identificación de células mieloides. Se lograron subconjuntos adicionales de poblaciones de células mieloides estableciendo una puerta en células mieloides CD45⁺/CD4⁺ para identificar monocitos y células dendríticas versus neutrófilos y eosinófilos (SSC^{hi}/CD45⁺). Finalmente, se realizó una puerta (G3) en células CD45⁻ para seleccionar células tumorales, eritroblastos, células endoteliales y estromales mesenquimales, donde las células tumorales de Wilms (Figura 1) se caracterizan por un fenotipo CD45⁻/CD56^{hi}/CD271⁺/GD2⁻/EpCAM⁻/CD99⁻/nuMiogenina⁻ (Figura 1), células de rhabdomyosarcoma por un perfil CD45⁻/CD56^{hi}/CD271^{hi}/GD2⁻/EpCAM⁻/CD99⁻/nuMiogenina⁻ (Figura 2), células de neuroblastoma CD45⁻/CD56^{hi}/CD271⁻/GD2^{hi}/EpCAM⁻/CD99⁻/nuMiogenina⁻ (Figura 3) y células PNET CD45⁻/CD56⁺/CD271^{hi}/GD2^{lo}/EpCAM⁻/CD99⁺/nuMiogenina⁻. La Figura 1 ilustra todos los pasos del análisis de datos en una muestra de tumor de Wilms y la 40 tabla 2 muestra el porcentaje de células neoplásicas y células inmunes en las diferentes muestras de tumores sólidos pediátricos analizadas.

Ejemplo 2: Análisis de fluido ascítico, líquido pleural y muestra de orina.

55 Recolección de muestra. Con la finalidad de inmunofenotipar las células malignas presentes en sitios metastásicos, se estudiaron muestras de 5 niños previamente diagnosticados con cáncer pediátrico: 1 muestra de fluido ascítico, 3 de líquido pleural y 1 de orina. Las muestras se recolectaron en el quirófano o en la unidad de cuidados intensivos y se procesaron en ya sea el diagnóstico o en la recaída, siguiendo los pasos secuenciales que se describen a continuación. En primer lugar, la muestra (suspensión celular) se filtró secuencialmente a través de una jeringa Filcon estéril (tamaño de poro de 120 µm) para eliminar grumos de

células y restos; luego, se centrifugó (10 min a 540 g) y se resuspendió en 500 µl de PBS que contiene BSA al 0.5%, a una concentración final de $\geq 5 \times 10^5$ células/tubo. Luego se prepararon cuatro alícuotas de 50 µL (es decir, 50,000 células) de la suspensión celular individual y se colocaron en tubos diferentes.

Tinción de la muestra. Se añadieron cincuenta µl de muestra (suspensión celular individual de los distintos fluidos corporales) a cada una de las alícuotas de 4 tubos, seguido de los volúmenes adecuados (concentraciones de saturación) de cada uno de los anticuerpos correspondientes dirigidos contra marcadores de la superficie celular, como se recomienda para las siguientes combinaciones de un solo tubo de anticuerpos conjugados con fluorocromo: i) CyCD3 BV421+CD271 BV421/ CD45 BV510/ CD99 FITC+ CD8 FITC/ nuMiogenina PE/ EpCAM PERCPcy5.5+ CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 APC/ smCD3 APCH7/ CD19 APC-H7 (combinación de anticuerpos 1 en la Tabla 1); ii) smCD3 BV421+CD271 BV421/ CD45 BV510/ CD99 FITC+ CD8 FITC/ nuMyoD1 PE / EpCAM PERCPcy5.5+ CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 APC/ cyCD3 APCH7/ CD19 BV786 (es decir, combinación de anticuerpos 4 en la Tabla 1) iii) CyCD3 BV421 + CD271 BV421/ HLADR APC/ CD45 AF700/ CD30 APCH7/ CD71 BV650/ CD99 FITC + CD8 FITC/ nuMiogenina PE / CD40 BV7111 EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 AF647/ smCD3 APC-H7 + CD19 APC-H7 (es decir, combinación de anticuerpos 13 en la Tabla 1) y iv) CyCD3 BV786 + CD271 BV786/ HLADR PECF594/ CD45 AF700/ CD30 BV650/ CD99 FITC + CD8 FITC/ GD2 BV510/ osteopontina APC + BAP APC/ nuMiogenina PE + nuMyoD1 PE/ CD40 BV711/ EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ PLAP APCH7/ CD95 BV421/ smCD3 BV605 + CD19 BV605 (es decir, combinación de anticuerpos 22 en la Tabla 1). Posteriormente, las células y los reactivos de anticuerpos se mezclaron bien y se incubaron durante 30 minutos a TA protegiéndolos de la luz. Después de esta incubación, se agregaron a la pella celular 2 mL de PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%, se mezclaron bien y se centrifugaron durante 5 minutos a 540g. Luego, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo. La pella celular se resuspendió mezclando suavemente y se agregaron 100 µL de Reactivo A (fijador que contiene PFA) del kit de reactivos de Fix&Perm™ (An der Grub, Vienna, Austria), seguido de otra incubación durante 15 minutos a TA protegiéndola de la luz. Posteriormente, se agregaron a la pella celular 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%, se mezcló bien y se centrifugó durante 5 min a 540 g. Luego, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 µL de volumen residual en cada tubo; la pella celular se resuspendió mezclando suavemente y se agregaron 100 µL de reactivo B (solución permeabilizante que contiene saponina) del kit Fix&Perm™. Después de mezclar suavemente, se añadió el volumen adecuado de cada uno de los anticuerpos intracelulares (nuMyoD 1, nuMiogenina, Osteopontina, BAP, PLAP y cyCD3 APC-H7), se mezcló y se incubó durante 15 min a TA protegiéndolos de la luz. Posteriormente, se agregaron a la pella celular 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%, se mezcló bien y se centrifugó durante 5 min a 540g, el sobrenadante se descartó utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejó en cada tubo un volumen residual de aproximadamente 50 µL. Tras mezclar bien el volumen residual, la pella celular se resuspendió en 200 µL de PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% y se mide inmediatamente en un citómetro de flujo BD Symphony X-20 equipado con 5 láseres y 48 detectores de fluorescencia.

Análisis de datos. En primer lugar, se realizó una puerta (G1) en células SSC^{lo}/FSC^{lo}/CD45^{hi} para la identificación de linfocitos y se seleccionaron; entonces, estas células G1 se subdividieron adicionalmente dibujando 4 puertas adicionales para la identificación de subconjuntos de linfocitos de la siguiente manera: CD45^{hi}/smCD3⁺ /cyCD3⁺ para células T (G1A), CD45^{hi}/CD19⁺ para células B (G1B), CD45^{lo}/ CD19⁺ para células plasmáticas (G1C) y CD45⁺/ smCD3⁻/ cyCD3⁻/ CD56⁺ para células NK (G1D). Las células T se subdividieron adicionalmente en subconjuntos de células T CD4⁺/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ y CD4⁻/CD8⁻ (panel E en la Figura 2). En segundo lugar, se realizó una puerta (G2) para incluir células SSC^{int/hi}/FSC^{int/hi}/CD45⁺ para identificar células mieloides. Se lograron subconjuntos adicionales de poblaciones de células mieloides estableciendo una puerta en células mieloides CD45⁺/CD4⁺ para identificar monocitos y células dendríticas versus neutrófilos y eosinófilos. Finalmente, se realizó una puerta (G3) en células CD45⁻ para seleccionar células tumorales, células tumorales de Wilms que muestran un fenotipo CD45⁻/ CD56⁺/ CD271⁺/ GD2⁻/ EpCAM⁺/ CD99⁻/ nuMiogenina⁻, las células del rhabdomyosarcoma siendo CD45⁻/CD56⁺/CD271⁺/ GD2⁻/ EpCAM⁻/ CD99⁻/nuMiogenina⁺ (Figura 2), células de neuroblastoma por CD45⁻/CD56⁺/ CD271⁻/ GD2^{hi}/ EpCAM⁻/ CD99⁻/ nuMiogenina⁻ y células PNET por CD45⁻/ CD56⁺/ CD271^{hi}/ GD2^{lo}/ EpCAM⁻/ CD99⁺/nuMiogenina⁻. La Figura 2 ilustra todos los pasos de selección realizados durante el análisis de datos para la identificación en una muestra de líquido pleural infiltrada por células de Rhabdomyosarcoma, de tanto las células tumorales como las células inmunes reactivas normales residuales; a su vez, la Tabla 3 muestra el porcentaje de células neoplásicas identificadas en las cinco muestras de fluidos corporales analizadas.

Ejemplo 3: Análisis de una muestra de médula ósea.

Recolección de muestra. Se investigaron veintitrés muestras de médula ósea y diez de sangre periférica recolectadas de 23 pacientes con cáncer para la presencia de diseminación metastásica durante los procedimientos de estadificación. Al menos 10×10^6 células nucleadas de cada muestra se tiñeron en 4 tubos/alícuotas distintos por muestra de sangre periférica y de médula ósea utilizando el protocolo de lisis masiva EUROFLOW, como se describió anteriormente (Flores-Montero et al., Leukemia. 2017 Oct;31(10):2094-2103) para la adquisición de $> 5 \times 10^6$ células/tubo. Brevemente, se mezclaron 2 ml de cada

muestra más 50 mL de solución de lisis de cloruro de amonio en un tubo Falcon de 50 ml y se incubaron durante 15 minutos en un rodillo o en un dispositivo agitador de muestras. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 800g durante 10 minutos y el sobrenadante se descartó utilizando una pipeta Pasteur sin alterar la pella celular. Tras descartar el sobrenadante, el tubo se rellenó con PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% hasta un volumen final de 50 ml y se centrifugó una vez más a 800g (5 min). Sin alterar la pella celular, se descartó el sobrenadante y la pella celular se resuspendió en 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%. Luego, las células se transfirieron a un tubo Falcon de fondo redondo de poliestireno de 5 mL ("tubo FACS") en un volumen de 300 µl/tubo. Dicho volumen se completó con PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% para alcanzar 2 ml (volumen final), se mezcla suavemente y se centrifuga a 540g durante 5 min; luego, se eliminó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur sin alterar la pella celular. Este procedimiento se repitió dos veces. La concentración celular final se ajustó con PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5% para 5 x 10⁵ células/µL y se utilizaron alrededor de 100 µL (es decir, 10 millones de células) de la suspensión celular final/muestra por tubo para teñir y medir en el citómetro de flujo.

Tinción de la muestra. Se añadieron cien pl de las suspensiones celulares procesadas anteriormente a cada una de las alícuotas de 4 tubos preparados por muestra, seguido de los volúmenes adecuados (concentraciones de saturación) de cada uno de los anticuerpos correspondientes dirigidos contra marcadores de la superficie celular, como se recomienda para las siguientes combinaciones de un solo tubo de anticuerpos conjugados con fluorocromo: i) CyCD3 BV421+CD271 BV421/ CD45 BV510/ CD99 FITC + CD8 FITC/ nuMiogenina PE + nuMyoD1 PE / EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ GD2 APC/ smCD3 APC-H7+CD19 APC-H7 (es decir, combinación de anticuerpos 3 en la Tabla 1); ii) CyCD3 BV421+CD271 BV421/ CD45 AF700/ CD99 FITC + CD8 FITC/ GD2 BV510/ osteopontina APC + BAP APC/ nuMiogenina PE / EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ OCT-3/4/ APCH7 + PLAP APCH7/ smCD3 BV786 + CD19 BV786 (es decir, combinación de anticuerpos 7 en la Tabla 1) iii) CyCD3 BV421 + CD271 BV421/ HLADR APC/ CD45 AF700/ CD30 APCH7/ GD2 BV510/ CD99 FITC + CD8 FITC/ nuMiogenina PE/ CD40 BV711/ EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ CD56 PEcy7/ smCD3 APC-H7 + CD19 APC-H7 (es decir, combinación de anticuerpos 13 en la Tabla 1) y iv) CyCD3 BV786 + CD271 BV786/ CD45 AF700/ PLAP APCH7/ CD99 FITC + CD8 FITC/ GD2 BV510/ osteopontina APC + BAP APC/ nuMiogenina PE/ CD95 BV421/ CD30 BV650/ CD40 BV711/ / EpCAM PERCPcy5.5 + CD4 PERCPcy5.5/ HLADR PECF594/ CD56 PEcy7/ smCD3 BV605 + CD19 BV605 (es decir, combinación de anticuerpos 24 en la Tabla 1). Después de mezclar bien las células y los reactivos de anticuerpos dirigidos contra marcadores de la superficie celular, se incubaron durante 30 minutos a TA protegiéndolos de la luz. Después de esta incubación, se agregaron a la pella celular 2 mL de PBS que contiene NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%, se mezclaron bien y se centrifugaron durante 5 minutos a 540g. Luego, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 pL de volumen residual en cada tubo.

La pella celular se resuspendió mezclando suavemente, y posteriormente se agregaron 100 µL de reactivo A (fijador que contiene PFA) del kit de reactivos de Fix&Perm™. (An der Grub, Vienna, Austria), seguido de otra incubación durante 15 minutos a TA protegiéndola de la luz. Posteriormente, se agregaron a la pella celular 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%, se mezclaron bien y se centrifugaron durante 5 min a 540 g. Luego, se descartó el sobrenadante utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 pL de volumen residual en cada tubo; la pella celular se resuspendió mezclando suavemente, y posteriormente se añadieron 100 µL de reactivo B (solución permeabilizante que contiene saponina) del kit Fix&Perm™. Después de mezclar suavemente, se añadió el volumen adecuado de cada uno de los anticuerpos intracelulares (nuMyoD 1, nuMiogenina PE, Osteopontina, BAP, OCT-3/4, PLAP y cyCD3), se mezcló y se incubó durante 15 min a TA protegiéndolos de la luz. Posteriormente, se agregaron a la pella celular 2 mL de PBS con NaN₃ al 0.09% y BSA al 0.5%, se mezcló bien y se centrifugó durante 5 min a 540g, el sobrenadante se descartó utilizando una pipeta Pasteur o un sistema de vacío sin alterar la pella celular, y se dejaron aproximadamente 50 uL de volumen residual en cada tubo. Tras mezclar bien el volumen residual, la pella celular se resuspendió en 200 pL de PBS con NaN₃ al 0.09 % y BSA al 0.5 % y se mide inmediatamente en un citómetro de flujo BD LSRFortessa X-20 equipado con 4 láseres y 13 detectores de fluorescencia.

Análisis de datos. En primer lugar, se realizó una puerta (G1) en células SSC^{lo}/FSC^{lo}/CD45^{hi} para la identificación de linfocitos y se seleccionaron; entonces, estas células G1 se subdividieron adicionalmente dibujando 4 puertas adicionales para la identificación de subconjuntos de linfocitos de la siguiente manera: CD45^{hi}/ smCD3⁺/ cyCD3⁺ para células T (G1A), CD45^{hi}/ CD19⁺ para células B (G1B), CD45^{lo}/ CD19⁺ para células plasmáticas (G1C) y CD45⁺/smCD3⁻/ cyCD3⁻ / CD56⁺ para células NK (G1D). Las células T se subdividieron adicionalmente en subconjuntos de células T CD4⁺/CD8⁺, CD4⁻/CD8⁺, CD4⁺/CD8⁻ y CD4⁻/CD8⁻ (panel E en la Figura 3). Se dibujó una segunda puerta (G2) para incluir células SSC^{int/hi}/ FSC^{int/hi}/CD45⁺ para la identificación de células mieloides. Se lograron subconjuntos adicionales de poblaciones de células mieloides estableciendo una puerta en células mieloides CD45⁺/ CD4⁺ para identificar monocitos y células dendríticas versus neutrófilos y eosinófilos. Finalmente, se realizó una puerta (G3) en células CD45⁻ para seleccionar células tumorales, eritroblastos, células endoteliales y estromales mesenquimales, donde las células tumorales (Figura 1) se caracterizan por un fenotipo CD45⁻ / CD56^{hi}/ CD271⁺/ GD2⁻/ EpCAM⁻/ CD99⁻ nuMiogenina⁻ (Figura 1), células de rabdomiosarcoma por un perfil CD45⁻/ CD56^{hi}/CD271^{hi}/ GD2⁻/ EpCAM⁻/ CD99⁻

^{nu}Miogenina⁺ (Figura 2), células de neuroblastoma CD45⁻/ CD56^{+hi}/ CD271^{-/+}/ GD2^{+hi}/ EpCAM⁻/ CD99⁻/
^{nu}Miogenina⁻ (Figura 3) y células PNET CD45⁻/ CD56⁺/ CD271^{+hi}/ GD2^{+lo}/ EpCAM⁻/ CD99⁺/ ^{nu}Miogenina⁻. La
 5 Figura 3 ilustra todos los pasos de selección aplicados durante el análisis de datos en una muestra de médula
 ósea infiltrada por células de neuroblastoma. La Tabla 4 muestra el porcentaje de células neoplásicas y células
 inmunes en las muestras de médula ósea y de sangre periférica de todos los pacientes diagnosticados con
 diferentes tumores sólidos pediátricos, según se analiza de acuerdo con la presente invención.

Tabla 1. Panel de combinación de anticuerpos de 12/13 marcadores principales en 8 o 9 fluorocromos distintos y para combinaciones de 14 colores:

Posición del fluorocromo														
	F1 p. ej. BV421	F2 p. ej. BV510	F3 p. ej. BV605	F4 p. ej. BV650	F5 p. ej. BV711	F6 p. ej. BV786	F7 p. ej. FITC	F8 p. ej. PerCP Cy5.5	F9 p. ej. PE	F10 p. ej. PE CF594	F11 p. ej. PE Cy7	F12 p. ej. APC	F13 p. ej. AF700	F14 p. ej. APCH7
1	CyCD3/ CD271	CD45	-	-	-	-	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina	-	CD56	GD2	-	smCD3/ CD19
2	CyCD3/ CD271	CD45	-	-	-	-	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	NuMYOD1	-	CD56	GD2	-	smCD3/ CD19
3	CyCD3/ CD271	CD45	-	-	-	-	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina/ NuMYOD1	-	CD56	GD2	.	smCD3/ CD19
4	smCD3/ CD271	CD45	-	-	-	CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina	-	CD56	GD2	.	Cy CD3
5	smCD3/ CD271	CD45	-	-	-	CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nu MYOD1	-	CD56	GD2	.	Cy CD3
6	smCD3/ CD271	CD45	-	-	-	CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina/ nuMYOD1	-	CD56	GD2	.	Cy CD3
7	cyCD3/ CD271	GD2	-	-	-	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina	-	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	OCT3 /4/PLAP
8	cyCD3/ CD271	GD2	-	-	-	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	-	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	OCT3 /4/PLAP
9	cyCD3/ CD271	GD2	-	-	-	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina	-	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3 /4
10	cyCD3/ CD271	GD2	-	-	-	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	-	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3/4
11	cyCD3/ CD271	GD2	-	CD71	CD40	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	-	CD56	-	CD45	CD30
12	cyCD3/ CD271	GD2	-	CD71	CD40	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina/ nuMYOD1	-	CD56	-	CD45	CD30
13	cyCD3/ CD271	GD2	-	CD71	CD40	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	-	CD56	HLADR	CD45	CD30
14	cyCD3/ CD271	GD2	-	CD71	CD40	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina/ nuMYOD1	-	CD56	HLADR	CD45	CD30
15	cyCD3/ CD271	GD2	-	-	BAP	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina	PLAP	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3/4
16	cyCD3/ CD271	GD2	-	-	BAP	smCD3/ CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	PLAP	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3/4
17	CD95	GD2	cyCD3/ CD271	CD71	CD40	CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	-	CD56	HLADR	CD45	CD30

18	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	HLADR	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3/4
19	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3/4
20	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina/ nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina	CD45	OCT3/4
21	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	PLAP
22	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMiogenina/ nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	PLAP
23	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	HLADR	CD56	BAP	CD45	PLAP
24	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	PLAP
25	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	HLADR	CD56	BAP	CD45	OCT3/4/ PLAP
26	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	OCT3/4/ PLAP
27	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	OCT3/4/ PLAP
28	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	numiogenina/ nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	OCT3/4/ PLAP
29	CD95	GD2	smCD3/ CD19	CD30	CD40	cyCD3/ CD271	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	HLADR	CD56	Osteopontina/ BAP	CD45	OCT3/4/ PLAP
30	CD95	GD2	cyCD3/ CD271	CD71	CD40	CD19	CD99/ CD8	CD4/ Epcam	nuMYOD1	HLADR	CD56	-	CD45	CD30

Tabla 2. Porcentaje de células neoplásicas y células inmunes presentes en biopsias de masa tumoral en el diagnóstico de pacientes pediátricos con cáncer (n = 55) clasificadas de acuerdo con los subtipos de diagnóstico de tumores. *Incluye dos sarcomas no diferenciados, un condrosarcoma y un sarcoma de células claras.

Distribución de células de tejido (%)	% EN CELULARIDAD TOTAL			% EN LEUCOCITOS TOTALES												
	Viabilidad	Células tumorales	Células inmunes	Linfocitos T	Proporción CD4:CD8	Linfocitos T CD4	Linfocitos T CD8	Linfocitos B	Linfocitos T		Célula NK	Neutrófilos	Monocitos /Células dendríticas	Eosinófilos		
Grupo diagnóstico (No. de muestras)									CD56 +	CD56-						
NEOPLASIAS MALIGNAS HEMATOLÓGICAS																
-Linfoma difuso de células B grandes (4)	61 (39-81.6)	30.9 (0-92.6)	69 (7.4-100)	54.3 (2.5-91.2)	0.98 (0.44-1.89)	22.4 (0.8-41.2)	27.2 (1.5-58.3)	5.1 (0.2-14.4)	7.9 (0.4-28.8)	46.3 (1.9-88.8)	3 (0.4-7.9)	25.8 (0.8-84.4)	8 (1.5-18)	2.1 (0.5-5.9)		
-Linfoma de Burkitt (9)	45.8 (1.1-83.9)	60 (14.5-96.4)	39.8 (3.6-85.5)	72.9 (35.3-98.8)	0.78 (0.06-2.0)	31.3 (3.8-56)	36.8 (10.8-67.9)	5 (0.28-1)	3.5 (0.17-11.6)	72.5 (23.7-97.7)	1 (0-2.5)	6 (0.1-31.2)	3.2 (0-14.9)	1.5 (0-8.9)		
NO MALIGNAS																
-Neuroblastoma y ganglioneuroblastoma (10)	33.7 (2-92.6)	34.8 (6-96.8)	65.1 (3.2-94)	48.6 (7.4-88)	1.70 (0.51-4.13)	21.7 (2.8-49)	16 (1.5-39.6)	10.2 (0.1-36.5)	5 (0.02-31.2)	43.5 (6-87.8)	2.1 (0-6.46)	27.4 (0.93-78.7)	13.2 (0-50.3)	1.8 (0-8.2)		
-Nefroblastoma (10)	37 (4.3-83.9)	64.3 (1.5-98.3)	34.6 (1.7-98.5)	35.5 (13.6-67.7)	0.56 (0.16-1.5)	11.6 (3.3-31.7)	22.6 (6.8-44.4)	3 (0-9)	2.7 (0.05-9.6)	33.4 (12.5-62.4)	17.3 (1.6-65.4)	23.9 (1.7-59.6)	22 (2.4-41.4)	0.9 (0-2.5)		
-Tumor de Ewing y sarcomas óseos relacionados (4)	29.5 (9.4-52.7)	68.3 (51.8-92)	31.6 (8-48.2)	41.6 (10.9-73)	0.48 (0.16-1.0)	12.4 (1.4-31.6)	24.9 (8.8-46.8)	3.8 (0.7-8.1)	5.2 (0.2-13)	36.4 (10.9-60)	5.8 (3-10.4)	33.8 (7.8-60.3)	12.5 (5.2-17.2)	0.52 (0-1.1)		
-Tumores de células germinales (11)	17.6 (6-45)	34.3 (0.9-97.2)	65 (2.8-99.1)	23.9 (2.7-63.5)	0 (0.51-3.8)	11.05 (0.7-27.5)	8.8 (1.4-25.6)	2.5 (0.05-5.8)	1.0 (0-3.1)	22.8 (2.6-61.3)	3.5 (0.17-13.9)	52.2 (22.7-98)	12.9 (1.0-39.3)	5 (0.4-38.7)		
-Carcinoma nasofaríngeo (3)	55 (21-65)	32 (10-69.2)	60.4 (30.8-90)	37 (22-46.2)	1.05 (0.70-1.5)	11.9 (4.2-23.4)	12.3 (4.5-18.2)	35 (10-54)	2.3 (1.9-2.7)	30.2 (20.2-40.2)	2.4 (0.4-3.9)	1.6 (0.6-3.3)	3.7 (0.5-6.2)	0.02 (0-0.04)		

Tabla 3. Porcentaje de células neoplásicas y de las diferentes células inmunes en muestras fluidicas.

Distribución de células fluidicas (%)		% EN CELULARIDAD TOTAL				% EN LEUCOCITOS TOTALES									
Grupo diagnóstico (No. de muestras)		Viabilidad	Células tumorales	Células inmunes	Linfocitos T	Proporción CD4:CD8	Linfocitos T CD4	Linfocitos T CD8	Linfocitos B	Linfocitos T		Célula NK	Neutrófilos	Monocitos /Células dendríticas	Eosinófilos
										CD56 +	CD56-				
NEOPLASIAS MALIGNAS NO HEMATOLÓGICAS															
-Sarcoma de tejidos blandos (3)*		52.6 (45.3-57.7)	15.8 (0-47.5)	84 (52.5-100)	36.2 (10.5-80.2)	1.20 (0.9-1.5)	5.3 (4.9-5.7)	4.6 (3.8-5.4)	1.8 (0.6-3.8)	1.3 (1.1-1.46)	34.6 (9.1-78.6)	2.1 (1.3-4.7)	41.5 (3.8-78.1)	17.2 (1.6-42.8)	0
-Tumores de células germinales (2) δ		52.5 (25-80)	7.8 (-27)	73 (73-92.2)	42 (10.9-73)	1.70 (0.84-2.7)	15.5 (5.4-25.7)	16.4 (2-30.8)	6 (0.3-11.7)	5.4 (1.2-9.6)	36.5 (9.7-63.4)	6.1 (0.3-12)	35.2 (1.5-69)	13.3 (0.6-26)	0.5 (0.2-0.8)
		*Incluye dos muestras de efusión pleural y una de orina; δ incluye una muestra de fluido ascítico y una de efusión pleural.													

Tabla 4. Porcentaje de células neoplásicas y células inmunes diferentes presentes en muestras de médula ósea y sangre periférica de niños diagnosticados con tumores sólidos pediátricos.

Distribución de células de tejido (%)	% EN CELULARIDAD TOTAL		% EN LEUCOCITOS TOTALES									
	Viabilidad	Células tumorales	Células inmunes	Linfocitos T	Proporción CD4:CD8	Linfocitos T CD4	Linfocitos T CD8	Linfocitos B	Linfocitos T	Célula NK	Neutrófilos	Monocitos /Células dendríticas
Neuroblastoma y ganglioneuroblastoma (30)												
	84,8 (70-95)	0	100	6	1.21 (0.24-2.40)	2.8 (0.3-5.5)	2.4 (1.5-5.2)	13.3 (0.2-51.4)	0.04 (0.1-0.1)	0.89 (0.2-1.6)	50.8 (20.3-79.7)	6.7 (2.6-12.5)
	76.6 (67-87.8)	13.5 (0.2-41.3)	86.4 (58.7-99.8)	15.8 (3.7-45.3)	1.3 (0.86-2.00)	7.9 (1.5-22.9)	5.6 (1.6-15.2)	9.4 (1.5-23.5)	6.3 (0.6-28)	1.7 (0.02-7.4)	51.7 (28.5-78.2)	4.6 (0.6-10.4)
	77.4 (54.6-96.7)	0.014 (0-0.09)	99.8 (99-100)	19.9 (8.2-38.63)	1.65 (35-4.6)	8.9 (4-17.1)	8.7 (2.5-20.5)	6.4 (1.6-11.7)	0.7 (0.01-2.7)	17.9 (7.46-38.1)	57.8 (23.2-84.3)	11.8 (4.01-24.4)
Tumor de Ewing y sarcomas óseos relacionados (2)												
• Sangre periférica (2)	71.6(60-83.3)	0	100	14.3 (5.2-23.4)	1.4 (1.3-1.5)	7.1 (2.2-12.1)	4.7 (1.6-7.8)	3.9 (0.6-7.3)	1.3 (0.5-2.2)	12.9 (4.7-21.2)	74.3 (60-88.6)	1.8 (1.5-2.1)
Rabdomiosarcoma (1)												
• Sangre periférica (1)	78	0	100	5.8	1.69	3.3	2.0	1.8	0.34	5.5	82.8	8.2
												0.02

Referencias

- Almazán-Moga A, Roma J, Molist C, Vidal I, Jubierre L, Soriano A, Segura MF, Llorca A, Sánchez de Toledo J, Gallego S. Optimization of rhabdomyosarcoma disseminated disease assessment by flow cytometry. *Cytometry A*. 2014 Dec;85(12):1020.
- 5 Bozzi F, Gambirasio F, Luksch R, Collini P, Brando B, Fossati-Bellani F. Detecting CD56+/NB84+/CD45-immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry. *Anticancer Res*. 2006 Sep-Oct;26(5A):3281.
- Bryson GJ, Lear D, Williamson R, Wong RC. Detection of the CD56+/CD45- immunophenotype by flow cytometry in neuroendocrine malignancies. *J Clin Pathol*. 2002 Jul;55(7):535.
- 10 Dubois SG, Epling CL, Teague J, Matthay KK, Sinclair E. Flow cytometric detection of Ewing sarcoma cells in peripheral blood and bone marrow. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Jan;54(1):13.
- Ferreira-Facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, da Rocha-Filho AS, Werneck F, Forny DN, Dekermacher S, de Azambuja AP, Ferman SE, de Faria PA, Land MG, Orfao A, Costa ES. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PLoS One*. 2013;8(3): e55534.
- 15 Magro G, Longo FR, Angelico G, Spadola S, Amore FF, Salvatorelli L. Immunohistochemistry as potential diagnostic pitfall in the most common solid tumors of children and adolescents. *Acta Histochem*. 2015 May-Jun;117(4-5):397.
- 20 Van Dongen JJM, Orfao de Matos Correia e Vale JA, Flores-Montero J, Almeida PJM, Van der Velden VHJ, Bottcher S, Rawstron AC, De Tute RM, Lhermitte LBS, Asnafi V, Mejstrikova E, Szczepanski T, Da Silva Lucio PJM, Marin Ayuso M, Pedreira CE. Methods, reagents and kits for flow cytometric immunophenotyping. *US 2012/0165213 A1* Jun 2012.
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014 Mar-Apr;64(2):83.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de piezas para la detección por citometría de flujo de células tumorales pediátricas, el kit comprende anticuerpos conjugados con fluorocromo dirigidos contra los marcadores de la superficie celular CD45, CD56, GD2, CD99, CD8, EpCAM, CD4, smCD3, CD19 y CD271, el marcador citoplasmático cyCD3, y el(los)
 - (i) los anticuerpos contra los marcadores CD99/CD8 están conjugados al mismo fluorocromo y representan un primer par marcador CD99/CD8;
 - (ii) los anticuerpos contra los marcadores EpCAM/CD4 están conjugados al mismo fluorocromo y representan un segundo par marcador EpCAM/CD4;
 - (ii) el anticuerpo contra CD271 está conjugado al mismo fluorocromo que el anticuerpo contra ya sea cyCD3 o smCD3 y representa un tercer par marcador CD271/cyCD3 o CD271/smCD3;
 en el que el kit comprende los anticuerpos conjugados a ≥ 8 fluorocromos distinguibles; en el que entre el primer, segundo y tercer pares de marcadores los fluorocromos son distinguibles; y en el que los anticuerpos contra los marcadores citoplasmáticos y nucleares están físicamente separados de los anticuerpos contra los
2. Kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una primera composición de reactivo que comprende los anticuerpos conjugados contra los marcadores de la superficie celular CD45, CD56, GD2, CD99, CD8, EpCAM, CD4, smCD3, CD19 y CD271 contenidos en un primer recipiente, y una segunda composición de reactivo que comprende los anticuerpos conjugados contra el marcador citoplasmático cyCD3 y el(los)
3. Kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende el tercer par marcador CD271/cyCD3 y en el que los anticuerpos contra los marcadores smCD3/CD19 están conjugados al mismo fluorocromo para formar un cuarto par marcador smCD3/CD19, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles.
4. Kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende el tercer par marcador CD271/smC3, y en el que los anticuerpos contra los marcadores CD19 y cyCD3 están conjugados cada uno a un fluorocromo distinto.
5. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende anticuerpos contra los marcadores nuMiogenina y nuMyoD1, y en el que los anticuerpos contra los marcadores nuMiogenina/nuMyoD1 están conjugados al mismo fluorocromo para formar un quinto par marcador nuMiogenina/nuMyoD1, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles.
6. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera composición de reactivo comprende adicionalmente anticuerpos conjugados con fluorocromo contra uno o más de los marcadores de la superficie celular del linfoma de Hodgkin HLA-DR, CD30, CD71, CD40 y CD95.
7. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente anticuerpos conjugados con fluorocromo contra uno o más de los marcadores de la superficie celular de células germinales tumorales OCT-3/4, BAP y PLAP.
8. Kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende anticuerpos contra los marcadores OCT-3/4 y PLAP, y en el que los anticuerpos contra los marcadores OCT-3/4 /PLAP están conjugados al mismo fluorocromo para formar un par marcador OCT-3/4 /PLAP, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles.
9. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente anticuerpos conjugados con fluorocromo contra uno o más de los marcadores de la superficie celular tumoral ósea, osteopontina y fosfatasa alcalina ósea.
10. Kit de piezas de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende anticuerpos contra los marcadores osteopontina y BAP, y en el que los anticuerpos contra los marcadores osteopontina/BAP están conjugados al mismo fluorocromo para formar un par marcador osteopontina/BAP, y en el que entre diferentes pares los fluorocromos son distinguibles.
11. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una o más combinaciones de anticuerpos seleccionadas de las combinaciones de anticuerpos 1 hasta 30 de la Tabla 1.
12. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente un colorante de integridad de células nucleadas.

13. Kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente reactivos para fijar y permeabilizar células, opcionalmente junto con instrucciones de uso, amortiguador y/o muestras de control.
- 5 14. Un método de citometría de flujo multicolor para identificación y clasificación de tumores pediátricos, que comprende los pasos de:
- (a) Teñir una alícuota de una muestra biológica que comprende o se sospecha que comprende células tumorales infantiles con los anticuerpos conjugados con fluorocromo contra marcadores de la superficie celular comprendidos en un kit de pieza de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13; seguido por
- (b) Poner en contacto las células teñidas con una solución de fijación, seguido por
- 10 (c) permeabilizar las células fijadas y teñidas con una solución permeabilizante; seguido por
- (d) teñir las células permeabilizadas con los anticuerpos conjugados con fluorocromo contra marcadores citoplasmáticos y nucleares comprendidos en un kit de pieza de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13;
- (e) analizar las células teñidas en dicha alícuota en un citómetro de flujo; y
- 15 (f) almacenar y evaluar los datos obtenidos.
15. Método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido tumoral primario, sangre periférica, médula ósea, muestra de tejido tal como ganglios linfáticos, adenoide, bazo o hígado, u otro tipo de fluido corporal tal como líquido cefalorraquídeo, fluido vítreo, líquido sinovial, aspirado final con aguja, efusiones pleurales o ascitis, obteniéndose dicha muestra de un paciente pediátrico.
- 20 16. Método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, que comprende adicionalmente seleccionar una terapia dirigida adecuada.
17. El uso de un kit de piezas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en el diagnóstico *in vitro* y clasificación de uno o más tumores pediátricos, seleccionados preferiblemente de: i) neoplasias neuroectodérmicas, tales como neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma, sarcoma de Ewing extraóseo y sarcoma de Ewing clásico; ii) tumores con diferenciación celular de miofibroblastos; iii)
- 25 identificación del compromiso en múltiples linajes celulares; y iv) linfoma/leucemia linfoblástico T y B.

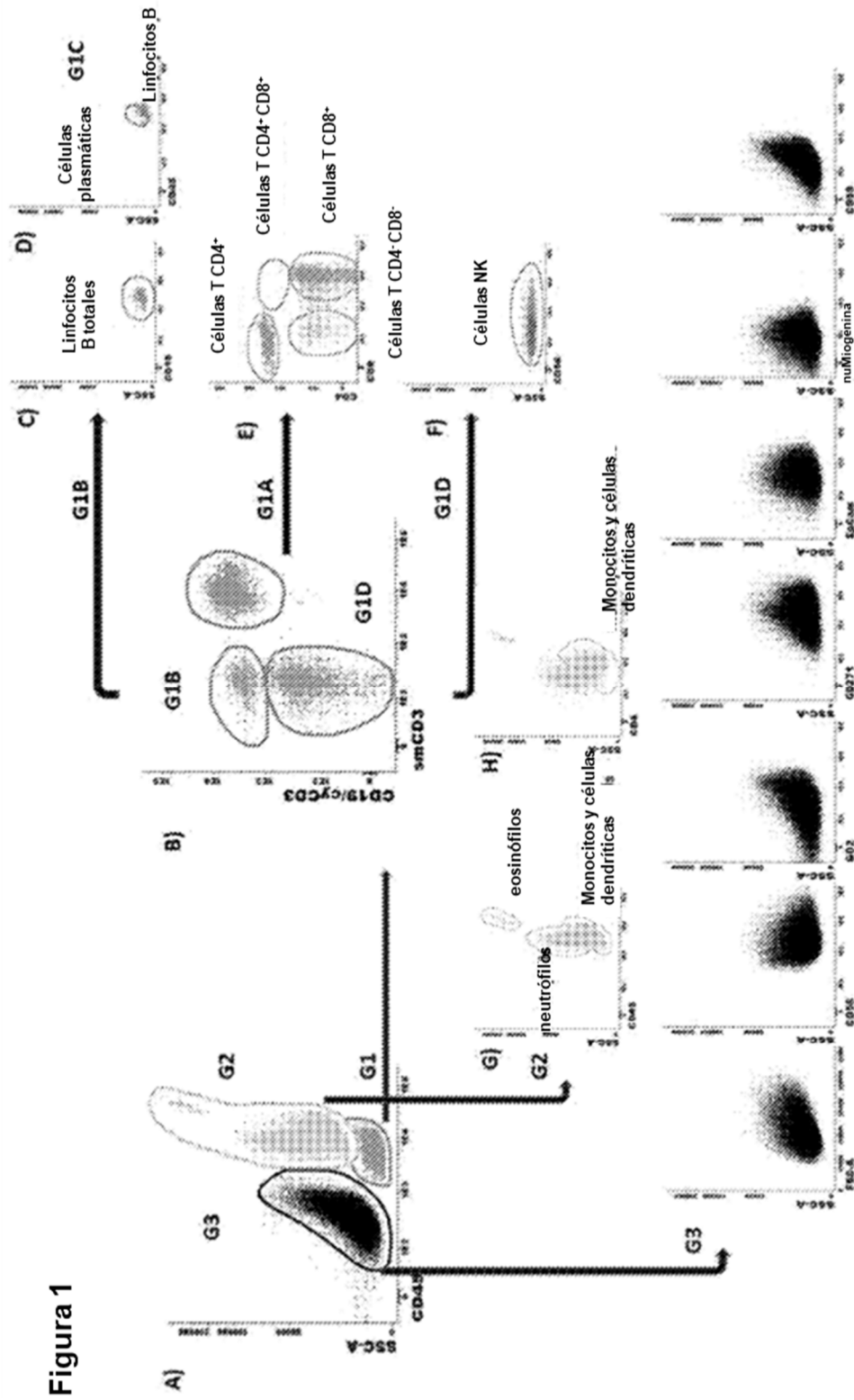


Figura 2

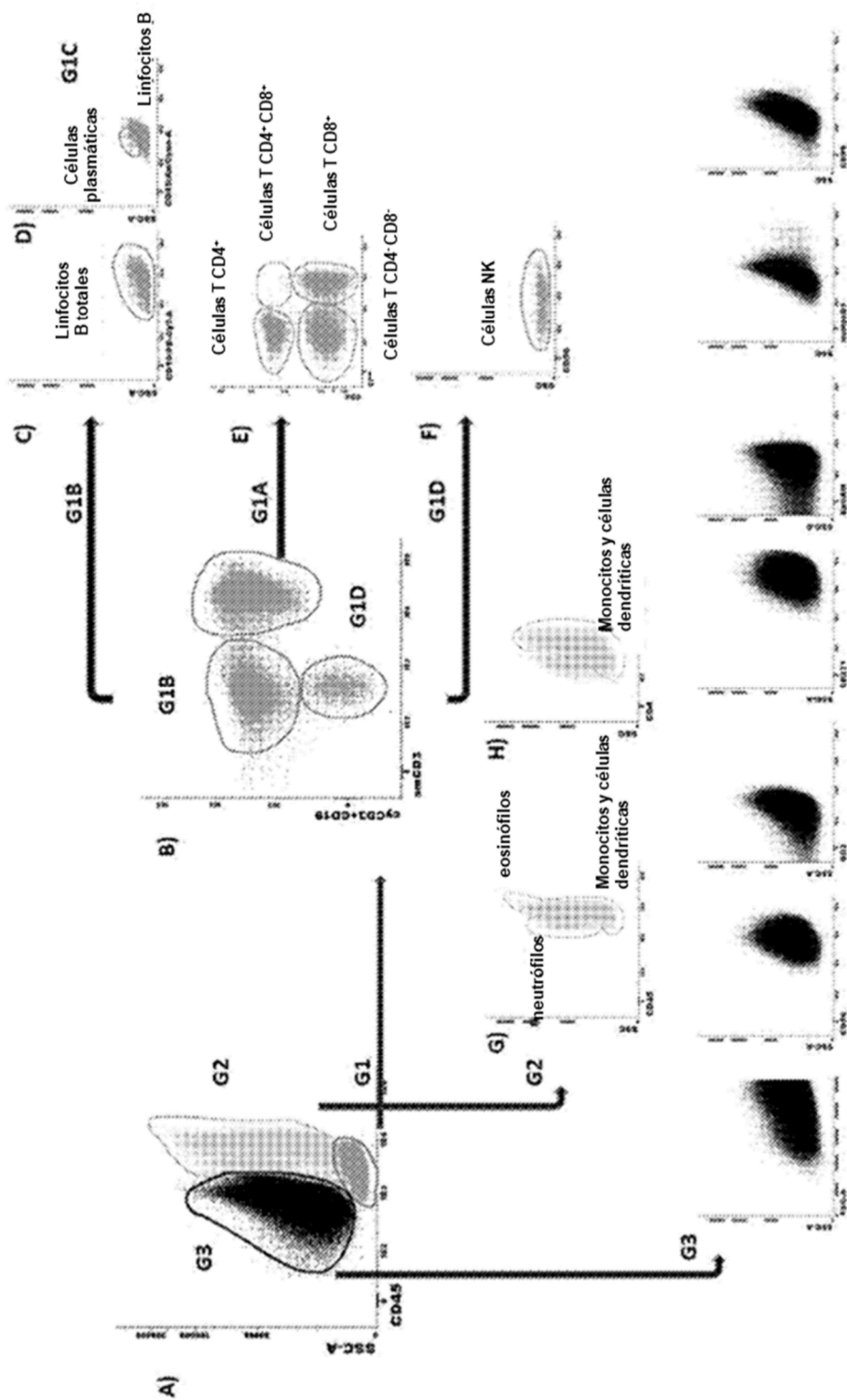


Figura 3

