

ÖZET

AKIM SİTOMETRİK İMMÜNOFENOTİPLEMEYE YÖNELİK YÖNTEMLER, REAKTİFLER VE KİTLER

- 5 Buluş, akış sitometrisi alanı ile ve özellikle floresan bileşiklere konjuge edilmiş antikor reaktiflerinin bir paneli ile ilgilidir. İlgili bir lökosit popülasyonunun tanımlanmasına yönelik en az üç tanımlama antikor ve söz konusu lökosit popülasyonunun ayrıca karakterizasyonuna ve/veya sınıflandırılmasına yönelik en az dört karakterizasyon antikor kümesini içeren en az sekiz ayrı florokrom-
- 10 konjuge antikor içeren lökositlerin akış sitometrik immünofenotiplemesine yönelik bir reaktif bileşimdir sağlanır. Ayrıca burada, reaktif bileşimler ile ilgili kitler ve yöntemler de sağlanır.

İSTEMLER

1. İlgili bir lökosit popülasyonunun tespit edilmesine yönelik en az üç tanımlama antikoru dizisini ve söz konusu lökosit popülasyonunun ayrıca karakterizasyonu ve/veya sınıflandırmasına yönelik en az dört karakterizasyon antikorumu kapsayan en az sekiz belirgin florokrom-konjuge antikoru içeren lökositlerin akış sitometrik immünofenotiplemesine yönelik bir reaktif bileşimdir, burada antikorlar, aşağıda bulunan markörlerin kombinasyonuna karşı yönlendirilir: cyCD3, CD45, cyMPO, cyCD79a, CD34, CD19, CD7 ve CD3.
2. En az iki reaktif bileşim kümesidir, söz konusu küme, istem 1'e göre bir birinci reaktif bileşimi ve aşağıdaki markör kombinasyonlarına karşı yönlendirilmiş ayrı florokrom-konjuge antikorlar içeren en az bir diğer reaktif bileşimi içerir:
 - (i) CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34, CD19, CD10 ve CD38
 - (ii) Igκ, CD45, cyIgμ, CD33, CD34, CD19, IgM, CD117 ve Igλ, burada IgM ve CD117'ye karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir
 - (iii) CD9, CD45, TdT, CD13, CD34, CD19, CD22 ve CD24
 - (iv) CD21, CD45, CD15, CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123 ve CD81, burada CD15 ve CDw65'e karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir
 - (v) cyCD3, CD45, TdT, CD99, CD5, CD10, CD1a ve CD3
 - (vi) cyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7 ve CD3
 - (vii) cyCD3, CD45, TCRγδ, TCRαβ, CD33, CD56, cyTCRβ ve CD3
 - (viii) cyCD3, CD45, CD44, CD13, HLADR, CD45RA, CD123 ve CD3
 - (ix) HLADR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b ve CD10
 - (x) HLADR, CD45, CD35, CD64, CD34, CD117, IREM2 ve CD14
 - (xi) HLADR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33 ve CD71
 - (xii) HLADR, CD45, CD15, NG2, CD34, CD117, CD7 ve CD38

- (xiii) HLADR, CD45, CD42a, CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123 ve CD4, burada CD42a ve CD61'e karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir
- (xiv) HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b ve CD9 veya
- 5 (xv) HLADR, CD45, TdT, CD56, CD34, CD117, CD22 ve CD19.
3. İstem 1 veya istem 2'ye göre reaktif bileşimi veya reaktif bileşimleri kümesidir, burada her bir reaktif bileşimi, pasifik mavisi (PacB) veya Horizon V450, pasifik turuncusu (PacO) veya AMCA, floresin izotiyosiyanat (FITC) veya Alexa 488, fikoeritrin (PE), peridinin klorofil protein/siyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP veya PE-Teksas Kırmızısı, fikoeritrin/siyanin 7 (PE-Cy7), allofikosiyanin (APC) veya Alexa 647 ve allofikosiyanin/H7 (APC-H7), APC-Cy7, Alexa680 veya Alexa700'e konjuge edilen antikorları içerir.
- 10
- 15
4. İstem 3'e göre reaktif bileşimleri kümesidir, burada Tablolar 3-5'ten herhangi birinde belirtilen en az bir reaktif bileşimi ile birlikte Tablo 2'nin tüp#20'sinde belirtilen en az bir reaktif bileşimi içerir.
- 20
5. İstem 3 veya 4'e göre reaktif bileşim dizisidir, burada Tablo 2'deki tüp#20'de belirtildiği üzere en azından reaktif bileşimi, Tablo 1'deki tüp#1'de belirtildiği üzere reaktif bileşimi ve Tablo 5'teki tüpler #29, 30, 31 ve 32'de belirtildiği üzere reaktif bileşimleri içerir.
- 25
6. İsteğe bağlı olarak kullanıma yönelik talimatlar, tampon ve/veya kontrol numuneleri ile birlikte, istemler 2-5'e göre en az iki reaktif bileşimi kümesini içeren lökositlerin akış sitometrik immünofenotiplemesine yönelik bir tanı kitidir.
- 30
7. İstem 6'ya göre olgun lenfoid hücrelerin tanımlanmasına ve karakterizasyonuna yönelik bir tanı kitidir, burada istem 2'de (ix) ila

(xv)'ye kadar olan maddeler altında belirtilen bir dizi reaktif bileşimi içerir.

- 5 8. Lökositlerin akış sitometrik immunotiplemesine yönelik bir yöntemdir, burada aşağıdaki adımları içerir
- (a) lökositleri içeren bir biyolojik numunenin sağlanması;
- (b) söz konusu numunenin birinci alikotu ile istemler 2 ila 5'ten herhangi birindeki kümenin birinci reaktif bileşiminin temas ettirilmesi ve söz konusu numunenin en az bir ikinci alikotu ile söz konusu kümenin başka
- 10 bir reaktif bileşiminin temas ettirilmesi;
- (c) söz konusu alikotların bir akış sitometresinde analiz edilmesi ve
- (d) elde edilen verinin saklanması ve değerlendirilmesi.
- 15 9. İstem 8'ye göre yöntemdir, burada söz konusu numune, periferik kan, kemik iliği, lenf düğümleri, adenoid, dalak veya karaciğer gibi doku numunesi veya beyin-omurilik sıvısı, camsı cisim, eklem sıvısı, plevra effüzyonlar ve asitler gibi bir vücut sıvısıdır.

TARİFNAME
AKIM SİTOMETRİK İMMÜNOFENOTİPLEMEYE YÖNELİK
YÖNTEMLER, REAKTİFLER VE KİTLER

- 5 Buluş, akış sitometrisi alanı ile ve özellikle floresan bileşiklere konjuge edilmiş antikor reaktiflerinin bir paneli ile ilgilidir. Bunlar, periferal kan (PB), kemik iliği (BM), plevral effüzyonlar, assit, beyin-omurilik sıvısı (CSF), camsı cisim, eklem sıvısı, bronkoalveoler lavaj, ürin, dalak, karaciğer, lenf düğümü ve diğer doku numunelerindeki normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik hücrelerin
- 10 immünofenotipik karakterizasyonunda kullanım imkanı bulurlar. Normal, reaktif, yenileyici ve köyü huylu hücrelerin (özellikle lökositler) akış sitometrik immünofenotiplemesi, halihazırda, immünoloji, hematoloji ve onkoloji de dahil tıpta birçok uygulamaya yönelik olarak kullanılır. Diğerlerinin yanı sıra, söz konusu uygulamalar, bağışıklık sisteminin izlenmesini; primer immün
- 15 yetmezliklerin tanısını ve sınıflandırılmasını; lösemilerin, lenfomaların ve plazma hücresi diskrazilerinin immünofenotiplemesini; tedavi etkinliğine yönelik bir ölçü olarak kötü huylu lökositlerin düşük sıklıklarının izlenmesini; paroksimal noktürnal hemoglobürini (PNH) ve mastositoz gibi klonal hastalıkların tanısını ve izlenmesi; kök hücre transplantasyonundan veya gen terapisinden (hedef olarak
- 20 hematopoietik prekürsör hücreler kullanılarak) farklı klinik koşullarında, örneğin, sağlıklı bireylerdeki hematopoiezin veya lenfopoiezin değerlendirilmesini ve terapötik amaçlara yönelik olarak kullanılacak hücre ürünlerinin bileşiminin ve kalitesinin değerlendirilmesini içerir.
- 25 Akış sitometrik immünofenotiplemedeki klasik tanı prosesi tipik olarak, antikor panellerinin kullanımına dayanır. Şimdiki durumda, farklı, antikor örtüşme panelleri, spesifik uygulamalar için önerilir. Bu tür paneller, tıbbi bir belirti (örneğin, sitopeninin görüntülenmesi, lenfositozun karakterizasyonu), hastalık (örneğin, akut lösemi tanısı, lenfoma tanısı) veya hastalık durumu (örneğin,
- 30 ALL'nin tanı sınıflandırmasına karşı tedavi etkinliğinin değerlendirilmesine yönelik ALL'nin izlenmesi) ile yönlendirilir. Tavsiye edilen antikor panellerinin

- örnekleri, Avrupa Lösemi Ağı (ELN) (1), hematolojik malignitelerin farklı alt türlerine yönelik 2006 Bethesda Uluslararası Konsensus (2) panelleri, soyun tayin edilmesine ve akut lösemilerin alt sınıflandırmasına yönelik EGIL panelleri (3),
- 5 Avrupa Miyelom Ağı (EMN) panelleri (4), diğer kronik lenfoproliferatif bozukluklara karşı kronik lenfotik lösemi ve saçaklı hücre lösemisinin immünofenotipik alt sınıflamasına yönelik ERIC (5) ve Matutes (6) skor panelleridir.
- 10 Önerilen bu antikor panelleri çoğunlukla, farklı ülkeler ve çalışma grupları arasında benzerdirler, ancak hiçbir zaman tamamen aynı değildirler. Önemli olarak, antikorların, spesifik floresans bileşikleriyle konjuge edilmiş antikor reaktiflerinin bir paneline tercihen nasıl kombine edilmesi gerektiğine ilişkin çeşitli ağlar ve çalışma grupları ile herhangi bir bilgi sağlanmamıştır veya sınırlı
- 15 bilgi sağlanmıştır. Tanı laboratuvarları, ayrı olarak ölçülebilen floresans emisyonlarına sahip farklı floresan boyalar ile konjuge edilmiş 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 veya daha fazla antikor ile bir numune alikotunu eş zamanlı olarak boyadığında dahi antikorların sadece basit listeleri sunulmuştur. Dünya genelinde merkezler arasındaki varyasyonlar, aşağıdakileri kullanımı nedeniyle:
- 20 – Antikorların ve antikor klonlarının benzer ancak aynı olmayan listeleri;
- Farklı duyarlılıklar gösteren farklı florokromlar aynı antikorlar ile konjuge edilir. Örneğin, bir antikor reaktifi, antikorun düşük duyarlılıklı bir florokrom ile kombine edilmesi halinde bir negatif sonuç sağlayabilirken, farklı, daha duyarlı bir florokrom ile kombine edilmiş aynı antikordan
- 25 oluşan bir antikor reaktifinin aynı hücreleri boyamak üzere kullanılması durumunda, bir pozitif sonuç elde edilebilir.
- Antikor reaktiflerinin farklı kombinasyonlarının eş zamanlı olarak değerlendirilmesi.
- Akut miyeloplastik lösemilerdeki CD45 kapılama gibi, ilgili hücre popülasyonunun (popülasyonlarının) tanımlanmasına yönelik değişken ve
- 30 genellikle teresiz ve uygun olmayan stratejiler.

Sonuç olarak, görünürde benzer antikor panelleri, klinik numunelerin benzer tanımlarını ortaya çıkarmazlar. Aslında, tanı laboratuvarları arasındaki yeniden üretilebilirlik, %70'ten fazla değildir. Maalesef, normal ve kötü huylu hücreler arasındaki uygun olmayan ayırım nedeniyle tanı yapılamaz veya yenileyici kemik iliği, akut löseminin tekrarlamaşı şeklinde hatalı olarak tanı konur.

US Patent No. 5,047,321'de Loken ve Terstappen, PB ve BM'deki hücresel bileşenlerin çok parametrelili analizine yönelik bir prosedür açıklamıştır. Açıklanan prosedür ile, bu buluşçular, PB ve BM'nin birkaç hücresel bileşenini ayırt edebilmişler, her bir bileşendeki hücre sayısını hesaplayabilmişler ve bunlardan her birinin, LDS-751 (Eksiton) DNA-boyası, tiyazol turuncusu (TO, Molecular Probes, Inc) RNA-boyası, floresans olarak işaretli anti-CD45 monoklonal antikor, ileri ışık dağılımı (FSC) ve yanlamasına ışık dağılımının (SSC) kombine kullanıma dayanan bir diferansiyel analizini sağlayabilmişlerdir. Bu yaklaşım, çekirdekli kırmızı hücrelerin, eritrositlerin, retikulositlerin, plateletlerin, lenfositlerin, monositlerin, nötrofilik granülositlerin, bazofilik granülositlerin, eozinofilik granülositlerin ve çekirdekli hematopoietik hücrelerin tamamının prekürsörlerinin spesifik tanımlanmasına imkan sağlamıştır. Ancak açıklanan multi parametre analizi, aynı numunede bir arada bulunan normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik hücreler arasında spesifik olarak farklılaşamaz, ayrıca bu prosedür hücrelerin bu gruplarını karakterize edemez. Bu patentin başka bir gelişmesi, daha sonra Terstappen ve Chen tarafından U.S. Patent No 6,287,791'de açıklanmıştır, ancak lökositlerin farklı popülasyonlarının karakterize edilmesinde herhangi bir gelişme göstermemişlerdir.

Son zamanlarda, Orfao et al., US. Patent No. 7,332,295'te, çekirdekli kırmızı hücrelere, lenfositlere, monositlere, nötrofilik granülositlere, bazofilik granülositlere, eozinofilik granülositlere ve çekirdekli hücrelerin tamamının hematopoietik prekürsörlerine ek olarak, dendritik hücrelerin ve bunların alt kümelerinin tanımlanmasına spesifik olarak imkan sağlayan, PB, BM ve diğer

vücut sıvılarının çok boyutlu lökosit diferansiyel analizine yönelik bir prosedür açıklamıştır. Bununla birlikte U.S. Patent No 5,538,855, Orfao et al.'te Orfao et al., PB, BM ve lenf düğümü numunelerindeki T, B ve NK-hücrelerinin 12'ye kadar farklı alt türlerinin eş zamanlı tanımlanması yoluyla lenfoid kompartmanlarının daha detaylı bir analizine imkan sağlayan bir prosedürü açıklamıştır. Patentte, Orfao et al., bir 3-renkli tek boyamadaki CD3, CD19, CD56 (ve/veya CD16), CD4 ve CD8 antijenlerine yönelik bir kombine boyama kullanmıştır, burada aynı florokroma konjuge edilmiş monoklonal antikor çiftleri kullanılmıştır. Ancak, bu yaklaşım aracılığıyla, normal ve neoplastik hücreleri ayırt edememişler ve tanımlanan hücre alt kümelerini de karakterize edememişlerdir; bununla birlikte, normal PB, BM veya diğer dokularda ve vücut sıvılarında bulunan lenfoid ve lenfoid olmayan hücrelerin (örneğin, TCR $\gamma\delta$ + T-hücreleri) ilgili bazı alt kümeleri spesifik olarak saptanamamıştır.

Bahsi geçen prosedürlerin hiçbirisi, normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik/klonal hücre popülasyonlarının ayrımı da dâhil, tanımlanan hücrelerin daha detaylı karakterizasyonuna direkt olarak imkân sağlamamıştır. Bu tür bir karakterizasyon ve ayırım, daha fazla sayıda fark edilebilir floresans emisyonları ile bağlantılı boyaların ve daha yüksek sayıda farklı floresans emisyonlarını ölçebilen akış sitometresi araçlarının kullanımını gerektirir.

Başka birçok yayın, spesifik immünofenotipik profillere dayanılarak, normal hücrelerin, neoplastik benzerlerinden ayrılacaklarını ve ayırım kapasitelerinin (normali klonal/kötü huylu hücrelerden ayırmaya yönelik duyarlılık), aynı numuneyi boyamak üzere kullanılan florokom-konjuge antikor reaktiflerinin sayısı ile arttığını gösterir. Bazı raporlar ayrıca, BM yenilenmesi sırasında olgunlaşan hücrelerin yanı sıra normal ve reaktif hücrelerin, ayrı immünofenotipik profiller gösterebileceklerini, ancak bu hücrelerin belirgin bir biçimde kötü huylu hücrelerden ayrılamayacaklarını gösterir. Önemli olarak, Bu doğrultuda önerilen antikor kombinasyonlarının panelleri, normal, reaktif, yenileyici hücre popülasyonları ile neoplastik benzerlerini sistematik bir şekilde etkili olarak

ayıramazlar, fakat aynı zamanda, kötü huylu hücrelerin genişletilmiş bir immünojenotipik karakterizasyonu yoluyla farklı tanısal hastalık kategorileri arasında belirgin bir ayırmaya imkan sağlayabilir.

- 5 Tanı laboratuvarlarında yeni nesil çok lazerli akış sitometrelerinin uygulanması ile, aynı antikor listeleriyle dahi farklı paneller oluşturmaya yönelik potansiyel alan, daha fazla sayıda farklı floresan bileşiklerinin kullanılması ve eş zamanlı olarak tek hücrelerde daha fazla sayıda floresans emisyonunun ölçülmesi olasılığı nedeniyle katlanarak artmaktadır. U.S. Patent No. 7,321,843'te, Orfao, Pedreira
- 10 ve Sobral da Costa, matematiksel hesaplamam prosedürlerine (örneğin, en yakın komşu prensibi) dayanan yeni bir yaklaşım sunar, burada sınırsız sayıda parametreye ilişkin olarak ölçülmüş her bir hücreye yönelik bilgiyi içeren akış sitometresi liste modu veri dosyaları, farklı, kısmen örtüşmeli monoklonal antikorların kombinasyonları ile boyanan bir numunenin birkaç alikotunun bir
- 15 akış sitometresinde ölçülmesinden sonra oluşturulabilmiştir. Bu prosedürün kullanılması sadece en son akış sitometresinin artırılmış çok renkli kapasiteleri ile maksimize edilebilir. Bunun nedeni, bu prosedürlerin, bilinen omurga markörlerinin, bir paneldeki monoklonal antikorların her bir kombinasyonuna yönelik olarak değişebilen diğer ek markörler ile kombine edildiği, monoklonal
- 20 antikor reaktiflerin kombinasyonlarına ait etkili panellerinin tasarımlarını gerektirmesidir. Buna paralel olarak, aynı yazarlar ayrıca (U.S. Patent No. 7,507,548), örneğin, neoplastik hücrelere karşı normalin doğrudan karşılaştırmasına imkan sağlayacak bir referans veri dosyasına karşı bir vakadan akış sitometri verilerinin karşılaştırılmasına yönelik bir prosedür açıklamıştır.
- 25 Ancak, her iki patentte de, yazarlar, lösemi, lenfoma ve plazma hücresi diskrazisinin tanısına/sınıflandırmasına, evrelemesine ve/veya izlemesine tam ve sistematik olarak uygulanabilen bir kapsamlı antikor paneli sunamamışlardır.

- Bu nedenle, mevcut protokoller, bir panelde büyük ölçüde önerilen monoklonal
- 30 antikorların spesifik olarak nasıl kombine edileceğini öğretmez; bir minimal hastalığın tanı sınıflandırmasına ve izlenmesine yönelik farklı paneller sunarlar;

büyük ölçüde test edildiklerinde sınırlı bir etkinlik gösterirler; tek bir numuneden birkaç alikota yönelik olarak ölçülmüş bilginin direkt kombinasyonuna yönelik bir yol sağlamazlar; ve/veya kronik T ve NK lenfoproliferatif bozukluklar (örneğin, daha geniş granüler lenfotik löseminin diferansiyel tanılarında) gibi spesifik hastalıklarda, immünofenotipik özelliklerine göre klonal/neoplastik hücrelere karşı normal/reaktifleri sistemik olarak ayırmada başarısız olmuşlardır.

Mevcut buluşçular bu zorlukları fark etmişler ve sonuçların yanlış yorumlanmasını ve aşırı yorumlanmasını önleyen gelişmiş, iyi tanımlanmış antikor panelleri ortaya koymuşlardır. İlgili markörlerin dikkatli bir şekilde seçilmesinden, çok renkli tüplerdeki uygun antikor kombinasyonlarının tasarımından ve uygun florokromların seçilmesinden (parlaklık, dengeleme, stabilite ihtiyaçlarına göre) sonra, antikor reaktiflerinin bir alt kümesi geliştirilmiştir. Çalışmalar, bir optimal etkinliğe ulaşmak ve bunu yeniden biçimlendirmek amacıyla, uzlaşma panellerinin kapsamlı çok merkezli bir değerlendirmesi ile tamamlanmıştır.

Bu doğrultuda buluş, bir düzenlemede, ilgili bir lökosit popülasyonunun tanımlanmasına yönelik en az üç tanımlama antikorunun ve söz konusu lökosit popülasyonunun karakterizasyona ve/veya sınıflandırmasına yönelik en az dört karakterizasyon antikorunun bir kümesini içeren en az sekiz ayrı florokom-konjuge antikorları içeren lökositlerin akış sitometrik immünofenotiplemesine yönelik bir reaktif bileşim sağlar. Burada sağlanan bir reaktif bileşimi, aşağıdaki markör kombinasyonlarına karşı yönlendirilmiş antikorların bir panelini içerir: cyCD3, CD45, cyMPO, cyCD79a, CD34, CD19, CD7 ve CD3 (ALOT reaktif bileşimi).

Braylan et al. (Cytometry, Vol. 46, no. 1, pp.23-27, 2001) lenfositlerin akış sitometrik fenotiplemeye yönelik reaktifler ile ilgilidir. On markörden oluşan bir dizinin (CD10, CD19, CD13, CD33, CD34, CD45, CD7, CD14, CD3 ve HLA-DR), akut löseminin değerlendirilmesine yönelik olarak gerekli olduğu öğretilir.

İlave markörler eklenebilir. Bununla birlikte, Braylan *et al.*, mevcut buluşa ait belirli markör kombinasyonlarına karşı antikorları içeren tekli bir reaktif kompozisyonunu açıklamakta başarısız olur.

- 5 Mevcut buluşun tercih edilen bir düzenlemesinde bileşim, monoklonal antikorlar içerir. CD, yığın adlandırmasını temsil eder ve monoklonal antikorlar tarafından tanımlanan spesifik hücre yüzeyi antijenlerinin tanımlanmasına yönelik bir nomenklatürdür. Kullanılan kısaltmalar şu şekildedir: cyIg κ = sitoplazmik IgG kappa zinciri; cyIg λ = sitoplazmik IgG lambda zinciri; β 2micro = β 2mikroglobulin; cyMPO = sitoplazmik myeloperoksidaz. Belirtilen markörlere
- 10 karşı (Monoklonal) antikorlar, Becton/Dickinson (BD) Biosciences, Dako, Beckman Coulter, CYTOGNOS, Caltag, Pharmingen, Exbio, Sanquin, Invitrogen ve benzerleri de dahil, çeşitli firmalardan ticari olarak elde edilebilirler.
- 15 Antikorları konjuge etmeye yönelik uygun florokromlar teknikte bilinirler. Anlaşılabileceği üzere, bir reaktif bileşiminin içerisine kullanılan florokromlar akış sitometrisi ile ayırt edilebilirler. Florokromlar tercihen, parlaklık, sınırlı spektral örtüşme ve sınırlı dengeleme, stabilite, vs. ihtiyacına yönelik olarak tercih edilirler. Florokromların aşağıdaki paneli, buluşa göre bir reaktif bileşiminde özel
- 20 bir kullanıma sahiptir: (1) pasifik mavisi (PacB) veya Horizon V450, (2) pasifik turuncusu (PacO) veya AMCA, (3) floresin izotiyosiyanat (FITC) veya Alexa 488, (4) fikoeritrin (PE), (5) peridinin klorofil protein/siyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP veya PE-Tektaş Kırmızısı, (6) fikoeritrin/siyanin 7 (PE-Cy7), (7) allofikosiyanin (APC) veya Alexa 647 ve (8) allofikosiyanin /H7 (APC-H7),
- 25 APC-Cy7, Alexa680 veya Alexa700. Birçok test diliminden sonra, mevcut buluşçular, aşağıdaki florokromların seçilmesi halinde çok iyi sonuçların elde edilebildiğini gözlemlemiştir: Pasifik Mavisi veya Horizon V450, Pasifik Turuncusu, floresin izotiyosiyanat (FITC), fikoeritrin (PE), peridinin klorofil protein/siyanin 5.5 (PerCp-Cy5.5), PE-Cy7, allofikosiyanin (APC) ve APC-H7.
- 30 Reaktif bileşimi, örneğin, bir lenfoid hastalığının görüntülenmesine yönelik olarak

bu şekilde kullanılabilir. Çeşitli reaktif bileşimlerin örnek uygulamalarının bir şematik genel bakışı için bakınız Şekil 2. Buluş bu nedenle ayrıca, bir veya daha fazla reaktif bileşimi içeren tanı kitleri ile ilgilidir. Ancak bileşimler ayrıca, bir veya daha fazla başka reaktif bileşimi, özellikle hastalığın görüntülenmesi ve sınıflandırılmasına yönelik olarak ayrıca tasarlanmış reaktif bileşimleri ile kombinasyon halinde avantajlı olarak kullanılırlar. “İle kombinasyon halinde” ifadesi, reaktif bileşimlerin fiziksel kombinasyonuna veya karıştırılmalarına refere etmez, ancak ayrı (ardışık) analiz adımlarında uygulanmalarına ve bu şekilde elde edilen verilerin kombinasyonuna refere eder. Örneğin, bir karakterizasyon tipi ile kombinasyon halinde kullanılan görüntüleme tüpü, her birinin reaktif bileşimlerden birini kullandığı, aynı biyolojik numunenin farklı alikotları üzerinden iki farklı analitik adım, akabinde kaydetme ve değerlendirmeyi içerir.

Bu nedenle buluş ayrıca, en az iki reaktif bileşiminin bir kümesini, söz konusu küme yukarıda açıklanan bir reaktif bileşimini içerir ve ayrı florokrom-konjuge antikorlar içeren en az bir başka reaktif ile ilgilidir. Bu nedenle her iki reaktif bileşimi, bazılarının her iki bileşimde de bulunabilmesine rağmen, antikorların ayrı bir panelini içerir. Ayrı florokromların panelinin esasında her bir reaktif bileşime yönelik olarak aynı olması ve toplamda sekize kadar farklı florokromun kullanılması oldukça uygundur.

Bir düzenlemede, yukarıda, burada açıklandığı üzere (ALOT reaktifi) bir birinci reaktif bileşimini içeren en az iki reaktif bileşimlerin bir dizisi ve belirgin florokrom-konjuge antikorları içeren en az bir diğer reaktif bileşimi, aşağıdaki markör kombinasyonlarından birine karşı yönlendirilir:

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

(ii) IgK, CD45, cyIgμ, CD33, CD34, CD19, IgM, CD117 ve Igλ, burada IgM ve CD117’ye karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir.

(iii) CD9, CD45, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT), CD13, CD34, CD19, CD22 ve CD24

- (iv) CD21, CD45, CD15, CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123 ve CD81, burada CD15 ve CDw65'e karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir.
- (v) cyCD3, CD45, TdT, CD99, CD5, CD10, CD1a ve CD3
- (vi) cyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7 ve CD3
- 5 (vii) cyCD3, CD45, TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, CD33, CD56, cyTCR β ve CD3
- (viii) cyCD3, CD45, CD44, HLADR, CD45RA, CD123 ve CD3
- (ix) HLADR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b ve CD10
- (x) HLADR, CD45, CD35, CD64, CD34, CD117, miyeloid hücre 2 (IREM2) ile ifade edilen immün reseptörü ve CD14
- 10 (xi) HLADR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33 ve CD71
- (xii) HLADR, CD45, CD15, kondroitin sülfat proteoglikan (NG2), CD34, CD117, CD7 ve CD38
- (iv) HLADR, CD45, CD42a, CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123 ve CD4, burada CD42a ve CD61'e karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir.
- 15 (xiv) HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b ve CD9
- (xv) veya
- HLADR, CD45, TdT, CD56, CD34, CD117, CD22 ve CD19.

Reaktif bileşimlerinin örneklendirici dizileri, Tablo 3-5'in herhangi birinde belirtildiği üzere en az bir reaktif bileşimi ile birlikte olmak üzere en azından aşağıda bulunan Tablo 2'deki tüpte#20 belirtilen reaktif bileşimini içerir. Ayrıca burada en azından Tablo 2'deki tüpte#20 belirtilen reaktif bileşimini, Tablo 1'deki tüpte#1 belirtilen reaktif bileşimini ve Tablo 5'teki tüplerde #29, 30, 31 ve 32 belirtilen reaktif bileşimlerini içeren bir dizi reaktif bileşimi sağlanır.

25

Başka bir açı, lökositlerin akış sitometrik immünofenotiplemesine yönelik bir tanı kiti ile ilgilidir, burada kit, yukarıda açıklanan en az iki reaktif bileşiminin bir veya daha fazla kümesini içerir. Kit, ek olarak, kullanıma yönelik talimatlar, numune hazırlama reaktifi, tampon ve/veya kontrol numuneleri gibi diğer faydalı bileşenleri de içerebilir.

30

Burada sağlanan reaktif bileşimler, kümeler ve tanı kitleri, çeşitli alanlarda uygulama alanı bulurlar. Örneğin, nerilen paneller, numunenin doğasına, tıbbi belirtiye ve spesifik bir amaca bağlı olarak tamamen veya kısmen uygulanabilirler. Panel, hücre yüzeyinin ve/veya hücre yüzeyine artı hücre içi

5 markörlerin boyanmasına yönelik farklı hücre hazırlama teknikleri ile kombinasyon halinde, tek veya birkaç farklı üreticiye ait spesifik monoklonal antikorlar reaktiflerini kullanabilir. Benzer şekilde reaktif bileşimleri, aynı omurga markörlerinin sağlandığı ve ek veya benzer markörler ile kombine edildiği >8 farklı florokromlar ile konjuge edilmiş monoklonal antikor reaktiflerini içeren

10 kombinasyonları içeren bir panele artırılabilir. Bir antikor bileşimi, bağışıklık sisteminin izlenmesi de dahil farklı amaçlar ile yeni kombinasyonların ekleneceği bir ana panel olarak da işlev görebilir.

Burada ayrıca, CD20, CD45, CD58, CD66c, CD34, CD19, CD10 ve CD38; Igκ, CD45, cyIgμ, CD33, CD34, CD19, IgM, CD117 ve Igλ'ye karşı antikorları içeren

15 B-hücre prekürsörünün ALL (BCP-ALL) tespitine yönelik en az bir reaktif bileşimi ile birlikte ALOT reaktif bileşimini içeren olgunlaşmamış lenfoid hücrelerinin tanımlanması ve karakterize edilmesine yönelik bir tanı kiti sağlanır, burada IgM ve CD117'ye karşı antikorlar, aynı floro kroma konjuge edilir; CD9,

20 CD45, TdT, CD13, CD34, CD19, CD22 ve CD24 veya CD21, CD45, CD15, CDw65, NG2, CD34, CD19, CD123 ve CD81, burada CD15 ve CDw65'e karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir.

Diğer bir açıda, olgunlaşmamış lenfoid hücrelerinin tanımlanması ve karakterize edilmesine yönelik bir tanı kiti, cyCD3, CD45, TdT, CD99, CD10, CD1a ve CD3; cyCD3, CD45, CD2, CD117, CD4, CD8, CD7 ve CD3; cyCD3, CD45, TCRγδ, TCRαβ, CD33, CD56, TCR βF1 ve CD3 veya cyCD3, CD45, CD44, HLADR, CD45RA, CD123 ve CD3'e karşı antikorları içeren T-hücre prekürsörü ALL'nin

25 (T-ALL) tespitine yönelik en az bir reaktif bileşimi ile birlikte ALOT reaktif bileşimini içerir.

30

Diğer bir açıda, HLADR, CD45, CD16, CD13, CD34, CD117, CD11b ve CD10; HLADR, CD45, CD35, CD64, CD34, CD117, IREM2 ve CD14; HLADR, CD45, CD36, CD105, CD34, CD117, CD33 ve CD71; HLADR, CD45, CD15, NG2, CD34, CD117, CD7 ve CD38; HLADR, CD45, CD42a, CD61, CD203c, CD34, CD117, CD123 ve CD4'e karşı antikorları içeren akut miyeloid lösemi (AML), miyelodisplastik sendrom (MDS)/kronik myeloproliferatif hastalığın (MPD) tespitine yönelik en az bir reaktif ile birlikte ALOT reaktif bileşimini içeren miyeloid hücrelerin tanımlanması ve karakterize edilmesine yönelik olarak bir tanı kiti sağlanır, burada CD42a ve CD61'e karşı antikorlar aynı florokroma konjuge edilir; HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b ve CD9; HLADR, CD45, CD41, CD25, CD34, CD117, CD42b ve CD9 veya HLADR, CD45, TdT, CD56, CD34, CD117, CD22 ve CD19.

Buluş ayrıca, lökositleri içeren bir biyolojik numuneni sağlanması ve numunenin en azın bir kısmının (alikit) burada sağlanan reaktif bileşim ile temas ettirilmesi adımlarını içeren, lökositlerin akış sitometrik immünofenotiplemelerine yönelik bir yöntem ile ilgilidir. Lökositleri içerdiği bilinen veya şüphelenilen herhangi bir tip (insan) numune kullanılabilir. Örneğin numune, periferik kan, kemik iliği, lenf düğümleri, adenoid, dalak veya karaciğer gibi doku numunesi veya beyin-omurilik sıvısı, camsı cisim, eklem sıvısı, plevra effüzyonlar ve assitler gibi, vücut sıvısının başka tipleridir. Tercihen yöntem, söz konusu numunenin birinci alikotu ile buluşa göre bir kümenin birinci reaktif bileşiminin temas ettirilmesini ve söz konusu numunenin en az bir ikinci alikotunun, söz konusu kümenin başka bir reaktif bileşimi ile temas ettirilmesini; bir akış sitometresinde söz konusu alikotlardaki lökositlerin analiz edilmesi ve elde edilen verilerin saklanması ve değerlendirilmesini içerir. Tipik olarak adım (c), akış sitometrisi dosyalarının çok boyutlu analizine ve veri entegrasyonuna yönelik bir yazılımın kullanılmasını içerir. INFINICYT™ ticari adı altında, CYTOGNOS SL'den (Salamanca, İspanya) ticari olarak temin edilebilen yazılım, buluşun yönteminde kullanılmaya çok uygundur. INFINICYT™ yazılımı, en yakın komşu hesaplamalarına göre birçok tüpten seçilmiş hücre popülasyonlarının immünofenotipik bilgisini

otomatik olarak kombine edebilir, burada bir numunenin bir alikotundan hücreler, omurga markörlerine ve yayılım profillerine göre, aynı numunenin başka bir alikotundan ilgili hücreler ile eşleştirilirler. INFINICYT prosedürü, burada sağlanan 8-renkli EuroFlow panellerini, tüp başına omurga markörü sayısına ve panel başına tüp sayısına bağlı olarak, 12, 16 veya ≥ 20 -color immunoboyamalara dönüştürebilir. Antikor panelleri ve INFINICYT yazılımı, FACSCanto™ II, FACS Aria, LSRII, DAKO CyAn™, Gallio, vs. gibi 8-renkli immünoboyamaya imkan sağlayan halihazırda mevcut akış sitometrelerinin tamamı ile kombinasyon halinde kullanılabilir.

10

Şekillerin Açıklamaları

Şekil 1. Üç antikor paneli Kategorisinin bileşimi.

Şekil 2. EuroFlow antikor panellerinin olası uygulamalarını gösteren tanısal akış diyagramı.

15

DETAYLI AÇIKLAMA

1. Giriş

20

Mevcut çalışma, lösemilerin, lenfomaların ve plazma hücre diskrazilerinin tanısına, sınıflandırılmasına ve izlenmesine yönelik standartlaştırılmış çok renkli immünofenotipleme protokollerinin tasarımını içeren, "Flow Cytometry for Fast and Sensitive Diagnosis and Follow-up of Haematological Malignancies" projesini başlatan EuroFlow Birliği (LSHB-CT-2006-018708) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu protokollerin ana yenilikçi bileşeni, antikor kombinasyonlarının (EuroFlow panelleri) EuroFlow panelleridir. Bu EuroFlow buluşu, diğerlerinin yanı sıra, standartlaştırılmış bir şekilde, normal, reaktif, yenileyici ve kötü huylu hematopoietik hücreleri tanımlamak üzere kullanılabilen, antikor reaktifleri (reaktif bileşimler) kombinasyonlarının panelleri ile ilgilidir. Böylece, kronik ve akut lösemilerin, miyelodisplastik sendromların,

30

miyeloproliferatif sendromların, mastositozun, paroksizmal noktürnal hemoglobinürinin, lenfomaların ve plazma hücre diskrazilerinin kapsamlı bir immünojenotipik tanısına, sınıflandırılmasına, evrelemesine ve izlenmesine imkan sağlarlar. İlk olarak, önerilen paneller, öznel uzman görüşlerine dayanmazlar, ancak ileriye dönük olarak test edilmiştirler ve akış sitometrisi immünojenotipleme için en sık belirtilerine yanıtın geliştirilmesine yönelik olarak modifiye edilmiştirler. Sonrasında bu paneller, tek hücrelerdeki bilginin antikor paneli ile bir numunenin boyanma ölçümünden elde edilmiş parametrelerin tamamına yönelik olarak kombine edildiği yeni interaktif ve yarı otomatik veri analizi prosedürleri ve klasik veri analizi yaklaşımları ile kombinasyon halinde uygulanacak yenilikçi bir şekilde tasarlanırlar.

Bu panelleri kurmak üzere, aşağıdaki adım dizisi gerçekleştirilmiştir:

1. Kullanılışlıklarına veya katma değerlerine göre alanda kullanılan ilgili markörlerin tamamının değerlendirilmesi
 - ELN, EMN, ERIC gibi Avrupa ağı tarafından önerilen markörler;
 - Birleşik Devletler’de 2006 Bethesda Uluslararası Konsensüsü tarafından önerilen markörler;
 - Rawstron et al. Tarafından önerilen olgun B-hücre malignitelerine yönelik yeni markörler.
2. Hematopoietik hücrelerin (hücre soyu, farklılaşma yolağı, olgunlaşma evresi ve/veya fonksiyonel altküme) spesifik bir kompartmanın içerisindeki normal ve reaktif ve yenileyici ve anormal/kötü huylu hücreleri tanıyabilen markörlerin (≥ 6) tasarımı ve seçimi.
3. Hastalardan ve sağlıklı öznelerden primer numunelerdeki antikor reaktiflerinin kombinasyonlarına ait önerilen panellerin değerlendirilmesi.
4. Bağımsız amaçlara ve gelişmeye yönelik ortama bağlı olarak antikor reaktiflerinin kombinasyonlarının tekrarlanarak test edilmesi ve optimizasyonu (markör seçimi, antikor klonu seçimi ve florokrom seçimi).

5. Sağlıklı kontrollerden numunelerin ve iyi-tanımlanmış hasta numunelerinin büyük bir serisi üzerinde EuroFlow panellerinin optimize edilmiş versiyonlarının değerlendirilmesi.

- 5 Önceden var olan bilgiler ile karşılaştırıldığında, bu kapsamlı bir panelin (prospektif olarak çok merkezli bir şekilde değerlendirildikten sonra) birinci tasarımıdır, bu, normal, reaktif, yenileyici ve klonal/neoplastik hücreler arasında ayırma yapılmasına ve klonal/neoplastik hematopoetik bozuklukların sınıflandırılmasına, evrelemesine ve izlenmesine olanak tanır: 1) bir numunenin boyanmış alikotlarının tamamındaki ilgili hücre popülasyonlarının uygun ve tekrarlanabilir tanımlanmasına yönelik olarak birlikte boyanması gereken markörler ve 2) bunların, florokrom-konjuge edilmiş antikor reaktiflerinin spesifik kombinasyonlarındaki başka karakterizasyon markörleri ile nasıl kombine edilmeleri gerektiği. Ek olarak her bir kombinasyonun amacına ilişkin bilgi, ne zaman ve nasıl uygulanacağı hakkında bir belirti olarak verilir. Buluş sadece, kapsamlı antikor paneli denemesinden ve birkaç yeniden tasarlama döngüsünden sonra yapılmıştır.

- 20 Reaktiflerin EuroFlow panelleri, bir veya daha fazla floresan bileşik ile konjuge edilmiş bir veya birçok antikor kombinasyonunun (tüp olarak adlandırılır) alt kümelerinden oluşur, söz konusu reaktif kombinasyonları, farklı amaçlara sahiptir. EuroFlow panelleri, üç kategoriden oluşur: Kategori1, Kategori 2 ve Kategori 3 antikor panelleri (Şekil 1).

25 **2. Antikor panellerinin kategorileri**

Aşağıdaki amaçlar, antikor kombinasyonlarının EuroFlow panelleri tarafından gerçekleştirilir:

- 30 Kategori 1 antikor panelleri, normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik B-, T-, NK-hücreler ve plazma hücreler de dahil, olgun lenfoid hücrelerin farklı alt kümelerinin, özellikle, bir klonal ve/veya neoplastik lenfoid bozukluğu,

lenfositoz, lenf düğümü genişlemesi, dalak büyümesi, monoklonal serum bileşeni, açıklanmamış nörolojik semptomlar, vs. nedeniyle olmasından şüphelenilen numunelerde tanımlanmalarını ve karakterizasyonlarını amaçlar. Kategori 2 antikor panelleri, normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik olgunlaşmamış (veya 5 erken olgunlaşma) T- ve/veya B-lenfoid hücrelerin, özellikle neoplastik lenfoid prekürsörler içerdiklerinden şüphelenilen numunelerde tanımlanmalarını ve karakterizasyonunu amaçlar. Kategori 3 antikor panelleri, normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik olgunlaşmamış, olgunlaşmakta ve olgunlaşmış miyeloid hücrelerinin, özellikle neoplastik miyeloid hücreler veya miyeloid-ilişkili 10 markörleri ifade eden neoplastik hücreler içerdiklerinden şüphelenilen numunelerde tanımlanmalarını ve karakterizasyonlarını amaçlar.

Söz konusu üç kategori içerisinde, antikor reaktifleri kombinasyonlarının bazılarının, daha genel amaçlar ile tek tüplü gözlemlene adımında kullanılmaları 15 amaçlanırken, diğerleri muhtemelen, önceden gözlemlene adımında daha spesifik hedef popülasyonlar tanımlandığında, çok tüplü sınıflandırma adımlarında uygulanırlar.

2.1 Kategori 1 antikor panelleri

20 Kategori 1 antikor panelleri, sırasıyla normal veya yüksek hücre sayımları (örneğin, normal periferik kan) ve düşük hücre sayımlarını (örneğin, camsı cisim) ve B-, T-, NK-hücrelerinin ve plazma hücrelerinin başka bir karakterizasyonuna hedeflenen çok tüplü antikor kombinasyonlarının dört farklı kümesini içeren 25 numunelerde bulunan olgun lenfoid hücrelerin spesifik alt gruplarının başlangıç tanımlamalarına ve karakterizasyonlarına hedeflenmiş üç görüntüleme tüpünden oluşur. Kategori 1 görüntüleme tüpleri, sırasıyla, oldukça yüksek ve düşük hücre sayımlarına sahip numunelerdeki klonal ve neoplastik T, B- veya NK-hücrelerin ve plazma hücrelerinin varlığını görüntülemek üzere kullanılabilirler. Düşük 30 hücre sayımlı numunelerin tipik örnekleri, ince iğne aspiratları (FNA), beyin-omurilik sıvısı (CSF) ve camsı cisimdir.

Yukarıda belirtilen görüntüleme tüpleri hâlihazırda, yüksek hücre sayımlı numunelere (LST olarak kısaltılmıştır) yönelik olarak lenfoid görüntüleme tüpü, düşük hücre sayımlı numunelere yönelik olarak küçük numune tüpü (SST) ve ayrı bir plazma hücre görüntüleme tüpü (PCST) olarak adlandırılır. Dolayısıyla, 5 tüplerin diğer dört kümesi ayrıca, diğer kullanımların yanı sıra, tanımlanan klonal veya neoplastik B-, T- ve NK- hücre ve plazma hücrelerini, sırasıyla, farklı B-, T- ve NK- hücre kronik lenfoproliferatif bozukluklara (sırasıyla, BCLPD, TCLPD ve NKCLPD olarak kısaltılmıştır) ve plazma hücresi diskrazisine (PCD olarak kısaltılmıştır) sahip hastalarda karakterize etmeye adanır.

10

2.2 Kategori 2 antikor panelleri

Kategori 2 antikor panelleri, olgunlaşmamış lenfoid ve lenfoid olmayan prekürsörlerin ilk teşhisine ve karakterizasyonuna ayrılmış bir görüntüleme 15 tüpünden ve B-hücre ve T-hücre prekürsörlerinin diğer ayrıntılı karakterizasyonuna yönelik iki dizi tüpten oluşur. Diğer uygulamalar arasında, görüntüleme tüpü, akut lösemilerin lenfoid, lenfoid olmayan, farklılaşmamış ve bifenotipik veya bilineaj akut lösemilere karşı sınıflandırılmasına yönelik olarak kullanılabilir. Bu tüp ayrıca sırasıyla kemik iliğinde normal/yenileyici ve 20 neoplastik/malign B-hücre prekürsörleri, periferik kan ve diğer dokular ve timustaki T-hücre prekürsörleri arasındaki ayrıma yönelik olarak kullanılabilir. Sonuç olarak bu görüntüleme tüpü artık akut lösemi oryantasyon tüpü (ALOT olarak kısaltılmıştır) olarak ifade edilir. Diğer iki dizi tüp, diğer uygulamalar arasında, B-hücre prekürsör akut lenfoblastik lösemi ve T-ALL sahibi hastalarda 25 ve ayrıca farklılaşmamış veya bifenotipik/bilinmeyen fenotip gösteren akut lösemili hastalarda B-hücre ve T-hücre bağlılığı gösteren lenfoid patlama hücrelerinin karakterizasyonuna yönelik olarak kullanılabilir.

2.3 Kategori 3 antikor panelleri

Nihai olarak, Kategori 3 antikor panelleri, lenfoid ile lenfoid olmayan prekürsör hücreleri ayırt etmeyi amaçlayan ve Kategori 2'de (ALOT tüpü) yukarıda

5 açıklanan tüplere benzer olan bir görüntüleme tüpü ve numunede (örneğin BM'de) mevcut olması halinde eritroid, megakaryositik, monositik, nötrofilik, eozinofilik, bazofilik, mast hücre ve dendritik hücre soylarının yanı sıra, daha olgunlaşmamış, işlenmemiş hematopoetik prekürsörler ve stromal hücrelere bağlı

10 hücrelerin en erken hematopoetik prekürsörlerinden olgunlaşmış miyeloid hücrelerine olgunlaşmasını karakterize etmeyi amaçlayan ilave bir tüp dizisinden oluşur. Diğer kullanımların arasında, bu tüp dizisi, neoplastik/klonal hastalıkların ve diğer hastalıkların karakterizasyonuna yönelik olarak uygulanabilir, burada ilgili hücreler (örneğin klonal/neoplastik, değiştirilmiş/atipik hücreler), akut

15 miyeloid lösemi (AML), miyelodisplastik sendrom (MDS)/kronik myeloproliferatif hastalık (MPD), paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (PNH), mastositoz, saptanmamış öneme sahip idiyopatik sitopeni (ICUS) ve/veya bifenotipik ve bilineaj akut lösemilerde olduğu üzere miyeloid ile ilişkili belirteçleri içeren akut lösemiye sahip hastalarda olduğu üzere miyeloid

20 farklılaştırmayı gösterir. Bu tüplere ait gruplar bundan böyle AML/MDS/MPD olarak kısaltılabilir.

2.4 EuroFlow panellerinde kullanılan markör tipleri

25 EuroFlow panellerinin her birinde, iki tip antikor reaktifi kombine edilir: 1) çoğunlukla, söz konusu hücre popülasyonlarının fenotipik karakteristikleri ile ilgili ek bilgi de sağlayan, numunede (Omurga markörleri) bulunan ilgili kesin hücre popülasyonunu tanımlamayı amaçlayan reaktifler ve 2) çoğunlukla, numunedeki (Karakterizasyon markörleri) diğer hücre gruplarının yanı sıra söz

30 konusu hücre popülasyonlarının ayrıca karakterizasyonuna/sınıflandırılmasına adanmış reaktifler.

Tipik olarak omurga markörleri, aşağıdaki tüp kümelerinin her birinde tekrar edilirler: AML/MDS/MPD, BCP-ALL, T-ALL, B-CLPD, T-CLPD, NK-CLPD, PCD). Ek olarak, B-CLPD tüp kümesinin omurga markörleri ayrıca, LST ve SST görüntüleme tüpleri için ortaktır, PCT tüp kümelerinin omurga markörleri PCST için ortaktır ve BCP-ALL ve T-ALL tüp kümelerinin omurga markörleri de ALOT için ortaktır; son olarak AML panelindeki (diğer bir deyişle: CD34 ve CD45) omurga markörleri de ALOT tüpü için ortaktır.

Dolayısıyla karakterizasyon markörleri, her bir tüpte kapsamlı bir şekilde kombine edilirler, böylece düşük sayıda mevcut olmaları halinde dahi, klonal/neoplastik hücelere karşı normal, reaktif, yenileyicilerin ayrılmasına imkân sağlarlar ve neoplastik hücreler durumunda ayrıca, akut ve kronik lösemilerin, lenfomaların ve plazma hücre diskrazilerinin tanısına, alt sınıflandırmasına, evrelemesine ve izlenmesine de imkan sağlarlar. Çok tüplü panellerdeki bu amaca yönelik olarak her bir tüp, ilgili görüntüleme tüpünden (örneğin, CLL'nin tanısına, evrelemesine ve görüntülenmesine yönelik olarak, LST ile kombinasyon halindeki B-CLPD çok tüplü panelinin tüp#4'ü yeterli olacaktır) ilgili bilgi ile kombine edilmesi halinde ve belirli hastalık ile ilişkili bilgilere (örneğin, Tablo 3'te gösterilen BCP-ALL çoklu tüp panelindeki tüp#24, malign B-hücre prekürsörleri ile normal/reaktif ve yenilemeye karşı kötü huylu B-hücre prekürsörlerini ve BCP-ALL'de minimal rezidüel hastalık izlemeyi ayırt etmek amacıyla özel olarak ayrılmıştır) yönelik olarak bir hastalık varlığının tam karakterizasyonu ve izlenmesi ile ilişkili spesifik bir amaca adanır.

25 **2.5 EuroFlow panellerinin optimal uygulanmasına yönelik INFINICYT yazılım araçları**

Buluşa göre antikor panelleri, ticari olarak temin edilebilir INFINICYT yazılım araçları ile kombinasyon halinde kullanılabilirler. Yazılım, farklı numunelerin ve farklı numune gruplarının arasındaki karşılaştırmaların (US 7,507,548) yanı sıra sadece kısmi örtüşmeye (US 7,321,843) sahip antikor reaktiflerinin farklı

5 kombinasyonları kullanılarak, aynı numunenin diğer alikotlarında ölçülmüş tek hücrelere kadar bir numune alikotunun markörlerinin ölçülmesinden elde edilen bilginin hesaplanması ve veri dosyalarının birleştirilmesi yoluyla sınırsız sayıda parametre ile dosyalar oluşturmaya yönelik olarak son zamanlarda açıklanan prosedürlere dayanır.

3. Olgun lenfoid hücrelere yönelik Kategori 1 antikor panellerinin bileşiği

10 Olgun lenfoid hücrelere yönelik Kategori 1 antikor panellerinin antikor reaktiflerine ait ok tüplü kombinasyonlarında, seçilen ortak omurga markörleri, dört farklı panel arasında farklılık gösterirler ve (antikor CD arı florokrom bileşik sayısı): 1) B-CLPD'ye yönelik CD20-1, CD45-2 ve CD19-6; 2) T-CLPD'ye yönelik CD4-1, CD45-2, CD3-5 ve CD8-8; 3) NK-CLPD'ye yönelik CD45-2, CD3-5, CD56-6 ve CD19-8 ve 4) PCD'ye yönelik CD45-1, CD138-2, CD38-3 ve 15 CD19-6'dan oluşur. Ek olarak, B-CLPD tüpünde kullanılan omurga markörleri ayrıca, LST ve SST görüntüleme tüplerinde de kullanılırlar ve PCD tüplerinin omurga markörleri ayrıca PCST'de de kullanılırlar.

20 Antikor reaktiflerinin bu çok tüplü kombinasyonlarının her birindeki omurga markörleri, ilgili hücre gruplarının belirlenmesinin sağlanmasını ve yeterli sayıda tümör hücresi içeren tanı ve izleme numunelerindeki neoplastik hücrelerin spesifik tanımlanmasını hedefler. Ek olarak dört çok tüplü kombinasyonun her birine yönelik olarak, omurga markörleri, farklı hastalık kategorilerinden klonal/neoplastik hücrelerin ayırt edilmesinin yanı sıra, minimal sayıda (örneğin, 25 minimal kalıntısal hastalık izleme ve hastalık evreleme) bulunduklarında dahi, sırasıyla normal, reaktif, yenileyici ve neoplastik/klonal B-, T-, NK- hücrelerin ve plazma hücrelerinin ayırımına katkı sağlayan değişken sayıda ek karakterizasyon markörleri ile kombine edilebilirler.

30

3,1. Lenfoid görüntüleme tüpü (LST), küçük numune tüpü (SST) ve plazma hücre görüntüleme tüpü (PCST)

EuroFlow LST reaktif bileşimi, lenfositler, lenf düğümü genişlemesi, dalak büyümesi, monoklonal serum bileşeni, açıklanmamış nörolojik semptomlar, açıklanmamış sitopeni, vs. (Şekil 2) gibi birkaç şüpheli klinik durumun değerlendirilmesi için tasarlanmıştır ve onaylanmıştır. Bir örnek LST tüpü bileşimi, Tablo 1’de sağlanır. Bu tüp, B, T ve NK soyunun atipik olgun lenfosit popülasyonlarını saptar.

10

Mevcut başvurunun herhangi bir Tablosunda, florokrom numara 1, pasifik mavisine (PacB) veya Horizon V450’ye, numara 2, pasifik turuncusuna (PacO) veya AMCA’ya, numara 3, floresin izotiyosiyanat (FITC) veya Alexa488’e, numara 4, fikoeritritine (PE), numara 5, peridinin klorofil protein/siyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), PerCP veya PE-Teksas Kırmızısına, numara 6 fikoeritrin/siyanin 7’ye (PE-Cy7), numara 7, allofikosiyantin veya (APC) Alexa647’ye ve numara 8, allofikosiyantin/H7 (APC-H7), APC-Cy, Alexa680 veya Alexa700’e karşılık gelir. Tercih edilen kombinasyon, pasifik mavisi (PacB) pasifik turuncusu (PacO), floresin izotiyosiyanat (FITC), fikoeritrin (PE), peridin klorofil protein/siyanin 5.5 (PerCP-Cy5.5), fikoeritrin/siyanin 7 (PE-Cy7), allofikosiyantin (APC), ve allofikosiyantin/H7’dir (APC-H7).

20

TABLO 1. Normal ve kötü huylu/ atipik olgun lenfoid hücrelere yönelik tek tüplü EuroFlow izleme kombinasyonları

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

Florokrom

Tüp#	1	2	3	4	5	6	7	8
------	---	---	---	---	---	---	---	---

2

(SST)	CD20 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD8 ve Igλ	ve CD56 ve Igκ	CD4	CD19 ^{BB}	CD3 ve CD14	CD38
-------	--------------------	--------------------	------------	----------------	-----	--------------------	-------------	------

3

(PCST)	CD45 ^{BB}	CD138 ^{BB-}	CD38 ^{BB}	CD56	β2mikro	CD19 ^{BB}	CyIgκ	CyIgλ
--------	--------------------	----------------------	--------------------	------	---------	--------------------	-------	-------

BB = Bu markörler, LST veya SST sonuçları, B-CLPD'ye yönelik çok tüplü EuroFlow sınıflandırma kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar ile kombine edildiğinde veya PCST sonuçları, PCD'ye yönelik 2-tüplü EuroFlow sınıflandırma kombinasyonu ile elde edilen sonuçlar ile kombine edildiğinde Omurga markörleri olarak işlev görürler; LST = lenfoid izleme tüpü; SST = küçük numune tüpü; PCST= plazma hücresi izleme tüpü.

4. Olgunlaşmamış lenfoid hücrelere yönelik Kategori 2 bileşimi

4.1. Akut lösemi oryantasyon tüpü (ALOT)

5

EuroFlow ALOT tüpü, akut lösemi hastalarında (B, T, lenfoid olmayan, farklılaştırılmamış veya karışık fenotip akut lösemilere karşı) olgunlaşmamış patlama hücresi popülasyonlarının doğası ve sonuçta en uygun tamamlayıcı antikor panellerine doğru oryantasyonun değerlendirilmesi için tasarlanmıştır:

- 10 BCP-ALL, T-ALL ve/veya AML/MDS/MPD. ALOT tüpünün bileşimi, Tablo 2'de sağlanır; markörler CD45-2, CD34-5 ve CD19-6, ALOT bilgileri, BCP-ALL paneli (örneğin INFINICYT yazılımı kullanılarak) ile kombine edilir ve cyCD3-1, CD45-2 ve CD3-8 markörleri ayrıca, ALOT'un bilgileri T-ALL paneliyle birleştirildiğinde ortak omurga belirteçleri olarak işlev görür; buna ek olarak

CD45-2 ve CD34-5, AML/MDS/MPD çoklu tüp paneline ortak omurga markörleridir.

TABLO 2. Akut lösemilerdeki blast hücrelerin soy tayinine yönelik tek tüplü

5 EuroFlow kombinasyonu

Tüp#	1	2	3	4	5	6	7	8
20	(ALOT)	cyCD3 ^{BB}	CD45 ^{BB}	cyMPO	cyCD79a	CD34 ^{BB}	CD19 ^{BB}	CD7 CD3 ^{BB}

BB =Bu markörler, sonuçlar, BCP-ALL veya T-ALL'ye (bakınız, sırasıyla Tablo 3 ve Tablo 4) yönelik çok tüplü Euro-Flow sınıflandırma kombinasyonları ile elde edilmiş sonuçlar ile kombine edildiğinde Omura markörleri olarak çalışırlar.

ALOT, ALOT antikor kombinasyonunun, bu amaç için yeterli olmaması nedeniyle, bir hematolojik malignitenin çıkarılması için uygun değildir. Ancak, ALOT, LST ve 4 tüp AML/MDS protokolü (tüp # 29, 30, 31 ve 32) ile kombine edildiğinde, hematolojik malignite türlerinin neredeyse tamamı saptanabilir (sınıflandırılmamış) veya çıkarılabilir (Şekil 2).

4,2. B-hücre prekürsör akut lenfoblastik lösemiye (BCP-ALL) yönelik çoklu tüplü antikor paneli

15

EuroFlow BCP-ALL tüpü, tam olarak klasik şekilde tanımlanan bu BCP-ALL'nin (B-ALL sonrası, ortak-ALL, ön-B-ALL) veya belirli füzyon genleri gibi iyi tanımlı moleküler durumlar ile ilgili immunofenotipik sınıflandırmalar dahil olmak üzere alternatif BCP-ALL sınıflandırmalarının tanımlanması ve sınıflandırılmasını amaçlar. BCP-ALL tüpü ile elde edilen bilgiler, omurga markörleri CD45-2, CD34-5 ve CD19-6'ya bağlı olarak ve uygun veri analiz yazılımı (örneğin INFINICYT yazılımı aracılığıyla) (Tablo 3) kullanılarak ALOT ile kombine edilmeye ihtiyaç duyar.

TABLO 3. B-hücre prekürsörü ALL'ye (BCP-ALL) yönelik çok tüplü Euro-Flow sınıflandırma kombinasyonları

Tüp#	1	2	3	4	5	6	7	8	Amaç
21	CD20	CD45 ^{BB}	CD58	CD66c	CD34 ^{BB}	CD19 ^{BB}	CD10	CD38	BCP-ALL tanı ve sınıflandırma; Lap markörlerinin tespiti
22	Igκ	CD45 ^{BB}	CyIgμ	CD33	CD34 ^{BB}	CD19 ^{BB}	IgM ve Igλ CD117		BCP-ALL tanı ve sınıflandırma; moleküler durumlar ile ilişkili fenotiplerin tespiti
23	CD9	CD45 ^{BB}	TdT	CD13	CD34 ^{BB}	CD19 ^{BB}	CD22	CD24	BCP-ALL tanı ve sınıflandırma; moleküler durumlar ile ilişkili fenotiplerin tespiti, LAP markörlerinin tespiti
24	CD21	CD45 ^{BB}	CD15 ve CDw65	NG2	CD34 ^{BB}	CD19 ^{BB}	CD123	CD81	BCP-ALL alt sınıflandırma; LAP markörlerinin tespiti

BB = Omurga markörleri. Tüpler ayrıca, hastalık evreleme ve izlemeye yönelik olarak başarılı bir şekilde uygulanabilirler.

4,3. T-hücre akut limfoblastik lösemiye (T-ALL) yönelik çok tüplü antikor paneli

EuroFlow T-ALL paneli, dört tüpten oluşur ve ALOT ile ortak şekilde omurga markörleri (bakınız Tablo 4) olarak cyCD3-1, CD45-2 ve CD3-8'ü kullanır. T-ALL paneli, örneğin TCR protein ifadesi (cyTCRβ, TCRαβ, TCRγδ) veya iyi

tanımlı moleküler durumlar ile arasındaki ilişkiye bağlı olarak tüm klasik şekilde açıklanan T-ALL (olgunlaşmamış T-ALL, ortak timositik T-ALL, olgunlaşmış T-ALL) veya alternatif T-ALL sınıflandırmasının tanımlanmasını ve sınıflandırılmasını amaçlar.

5

TABLO 4. T-ALL'ye yönelik çok tüplü EuroFlow sınıflandırma kombinasyonları

Tüp#	1	2	3	4	5	6	7	8	Amaç
25	cyCD3 ^{BB}	CD45 ^{BB}	TdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	CD3 ^{BB}	T-ALL tanısı; Lap markörlerinin belirlenmesi
26	cyCD3 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	CD3 ^{BB}	T-ALL tanısı; T-ALL sınıflandırması ve arest olgunlaşma aşamasının tespiti; LAP markörlerinin tanımlanması
27	cyCD3 ^{BB}	CD45 ^{BB}	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta$	CD33	CD56	Cy TCR β	CD3 ^{BB}	T-ALL tanısı ve arest olgunlaşma aşamasının tespiti; LAP markörlerinin tanımlanması
28	cyCD3 ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD44	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	CD3 ^{BB}	T-ALL alt sınıflandırma

BB = Omurga markörleri. Tüpler ayrıca, hastalık evreleme ve izlemeye yönelik olarak başarılı bir şekilde uygulanabilirler.

5. Miyeloid hücrelere yönelik Kategori 3 bileşimi

EuroFlow AML/MDS/MPD paneli, tümü, omurga markörleri (Tablo 5) olarak HLA-DR-1, CD45-2, CD34-5 ve CD117-6'yı içermek üzere iki bütünleyici markör kombinasyonunu (tüpler 29-32 ve tüpler 32-35; bakınız Tablo 5) içerir. Birinci tüp dizisi (tüpler 29-32) tercihen, olgunlaşmamış nötrofilik soyu (tüp 30), monositik soyu (tüp 31) ve eritroid soyu (tüp 32) üzerine odaklanarak AML ve MDS gibi miyeloid malignitelerin tespit edilmesi ve sınıflandırılması (soy değerlendirilmesi ve olgunlaşması) amacıyla yönelik olarak EuroFlow ALOT ile kombinasyon halinde kullanılmak üzere tasarlanır. Bu dört tüp ayrıca, APL (tüp 32), PNH (tüpler 29 ve 30) ve diğer atipik miyeloid fenotiplerin tespit edilmesine katkıda bulunur.

İkinci tüp dizisi (tüpler 33-35), AML/MDS (tüp 34) ile ilişkili olarak (veya değil) mastositoz tanısına yönelik megakaryositik, bazofilik, plazmasitoid dendritik soylar (tüp 33) hakkında ilave bilgileri sağlar. Tüp 35 ayrıca AML/MDS'yi karakterize eder ve özellikle lenfoid ilişkili markörler ve anormal lenfoid olgunlaşmanın atipik ifadesine odaklanır.

TABLO 5. AML/MDS/MPD'ye yönelik çok tüplü EuroFlow sınıflandırma kombinasyonları

Tüp#	1	2	3	4	5	6	7	8	Amaç
29	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD16	CD13	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	CD11b	CD10	AML tanısı
30	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD35	CD64	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	IREM2	CD14	Özellikle nötrofilik soya odaklanan PNH ve AML'nin tanısı ve alt sınıflandırması
31	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD36	CD105	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	CD33	CD71	Özellikle

Tüp#	1	2	3	4	5	6	7	8	Amaç
									monositik soya odaklanan AML'nin tanısı ve alt sınıflandırması
32	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD15	NG2	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	CD7	CD38	Özellikle eritroid soya odaklanan APL ve AML'nin tanısı ve alt sınıflandırması
33	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD42a artı CD61	CD203c	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	CD123	CD4	Özellikle megakaryositik, bazofilik ve plazmasitoid dendritik soya odaklanan AML'nin tanısı ve alt sınıflandırması
34	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	CD41	CD25	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	CD42b	CD9	AML/MDS'nin karakterizasyonu
35	HLADR ^{BB}	CD45 ^{BB}	TdT	CD56	CD34 ^{BB}	CD117 ^{BB}	CD22	CD19	AML/MDS'nin karakterizasyonu

BB = Omurga markörleri; Antikor kombinasyonlarının bu çok tüplü dizisi, yalnızca AML, MDS ve MPD saptamasına yönelik değil, aynı zamanda mastositoz, PNH ve ICUS'a yönelik olarak faydalıdır. Tüpler ayrıca, hastalık evreleme ve izlemeye yönelik olarak başarılı bir şekilde uygulanabilirler.

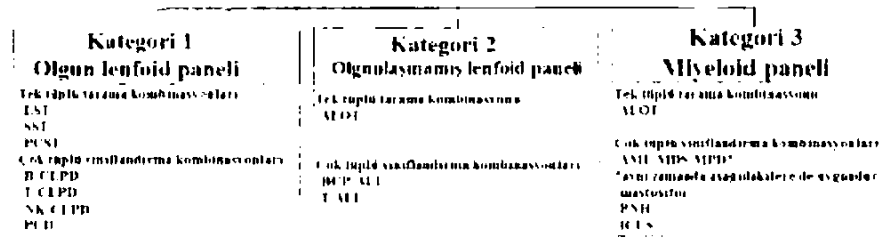
REFERANSLAR

- 1.- Consensual European Immunophenotyping panels for leukemia.
www.leukemia-net.org/content/home/.
- 5 2.- Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T, Shenkin M, Stone E, Wallace P. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72 Suppl 1:S14-22.
- 10 3.- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9:1783-6
- 15 4.- Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdicikova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omedé P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N,
- 20 Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE; European Myeloma Network. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica.* 2008;93:431-8.
- 25 5.- Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Colomer D, Moreno C, Geuna M, Evans PA, Natkunam Y, Coutre SE, Avery ED, Rassenti LZ, Kipps TJ, Caligaris-Cappio F, Kneba M, Byrd JC, Hallek MJ, Montserrat E, Hillmen P. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2007;21:956-64.
- 30 6.- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. The immunological profile of B-cell disorders and

proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. Leukemia.
1994;8:1640-5.

Şekil 1

Antikor Kombinasyonlarının EuroFlow Panelleri



Şekil 2

