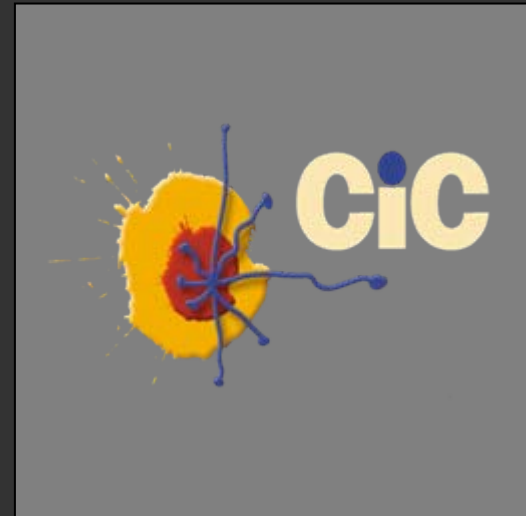


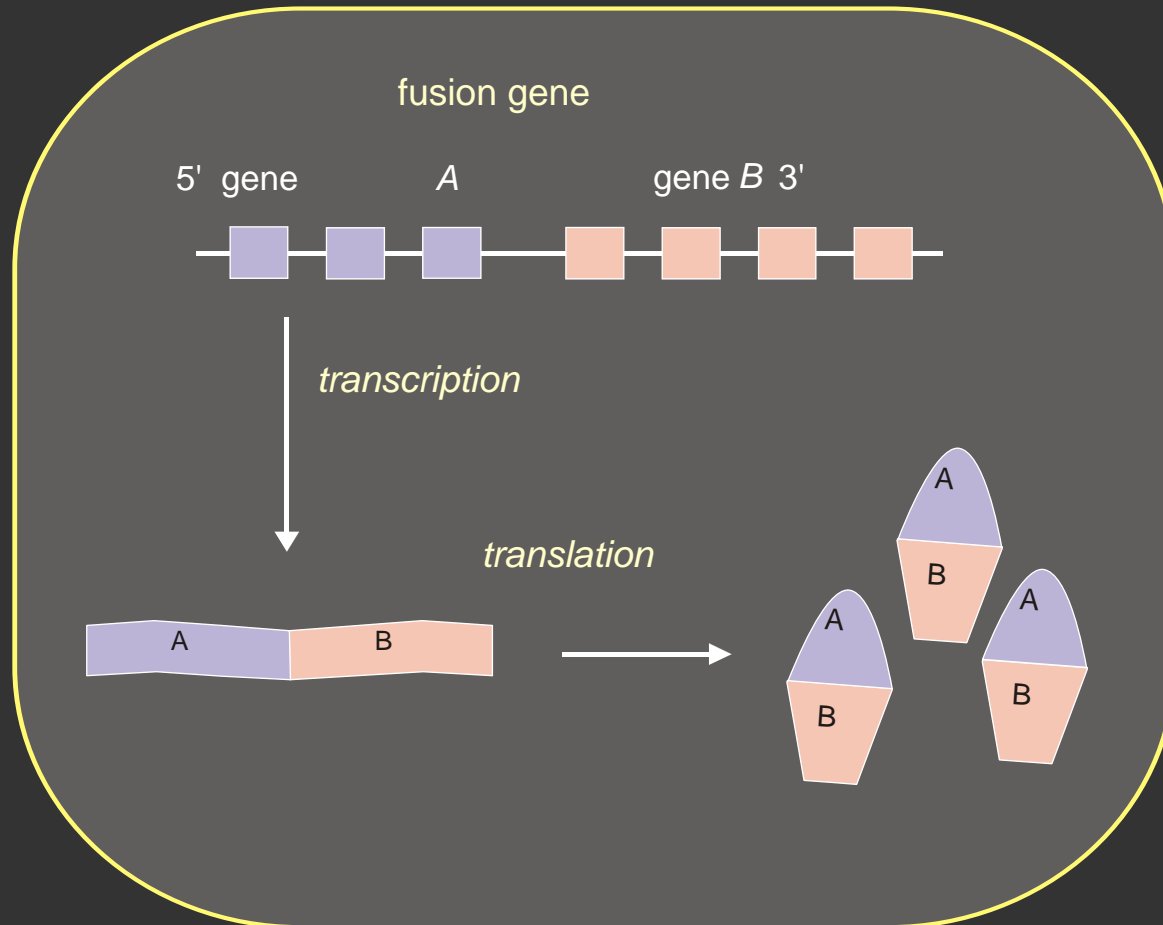
# ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO



CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER.  
UNIVERSIDAD Y HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
SALAMANCA. SALAMANCA, ESPAÑA

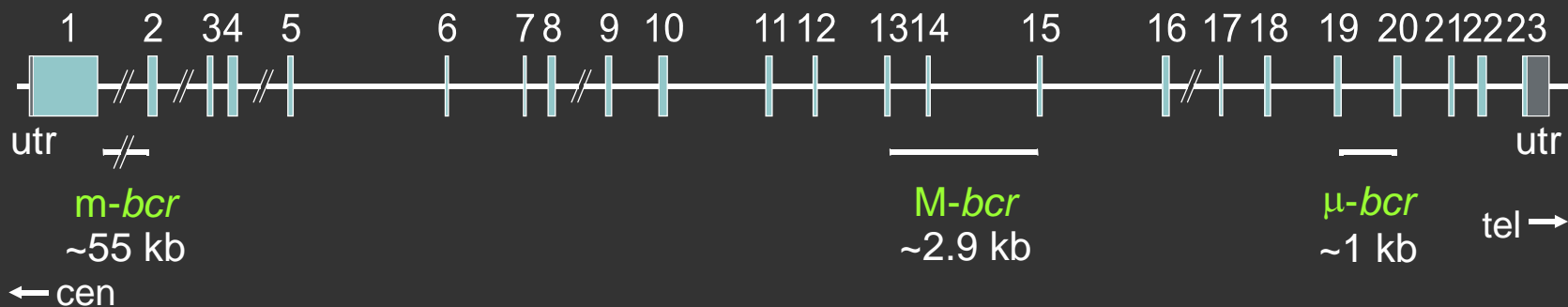
*Juan Flores Montero, MD*  
*REUNION ANUAL RTICC, MADRID, NOVIEMBRE 2008*

# Proteínas de fusión

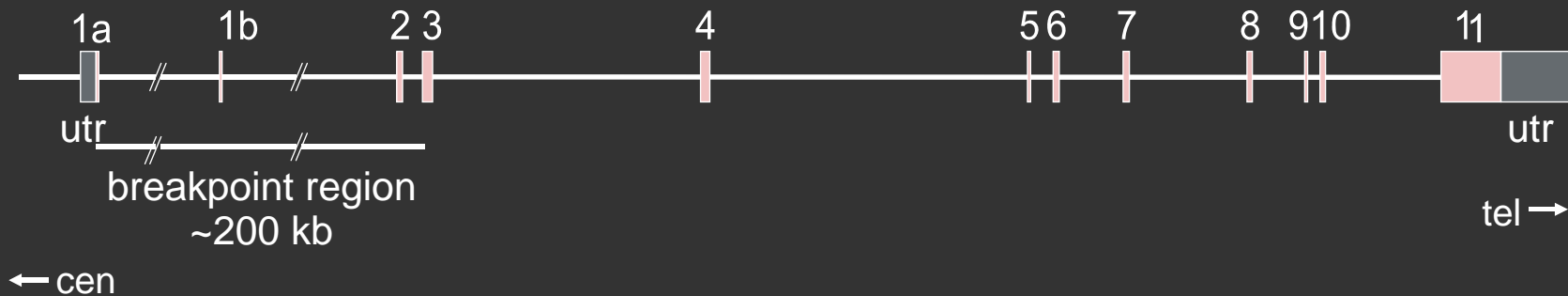


# Puntos de corte de t(9;22)(q34;q11) en genes *BCR* y *ABL*

## *BCR* gene (# 22q11)



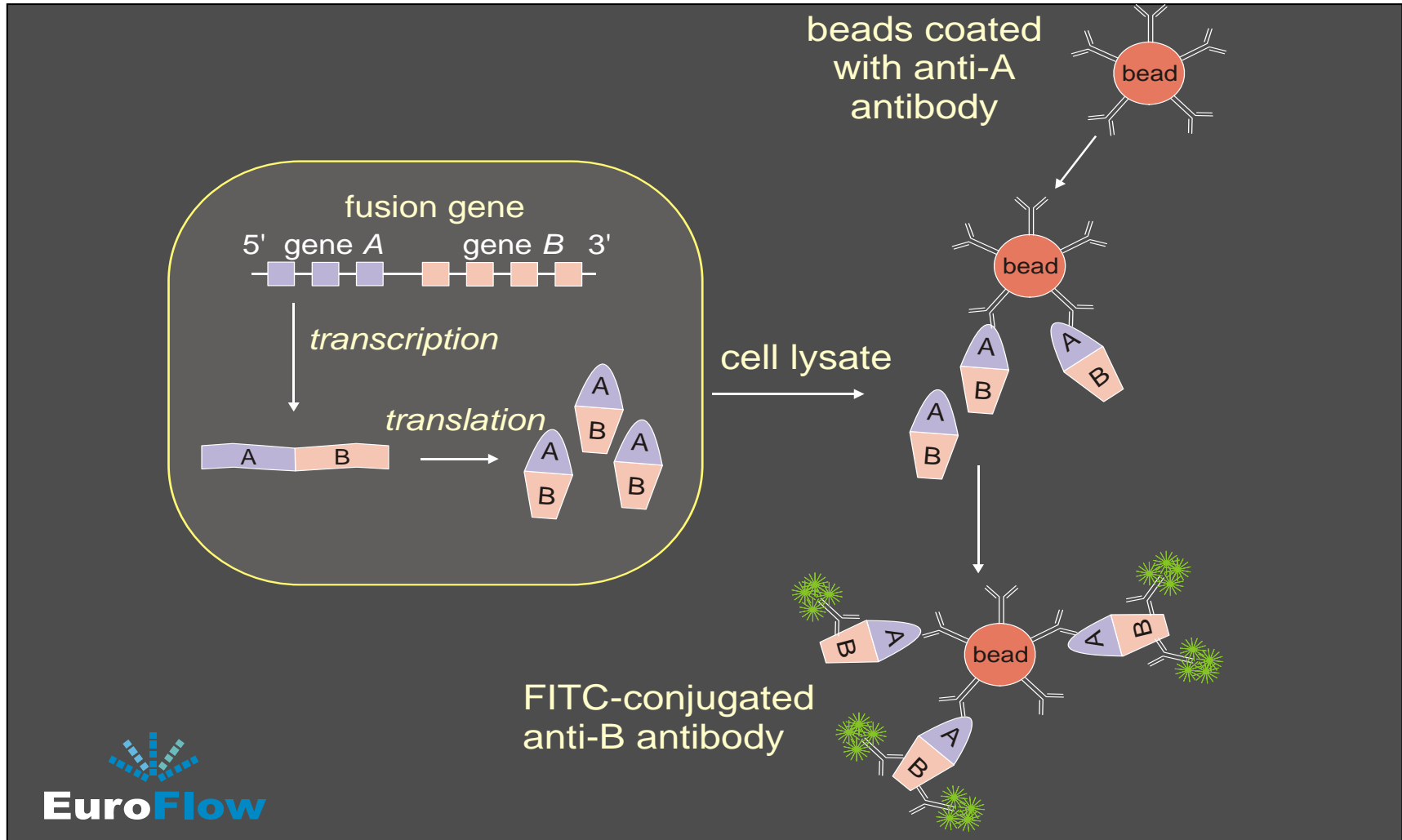
## *ABL* gene (# 9q34)



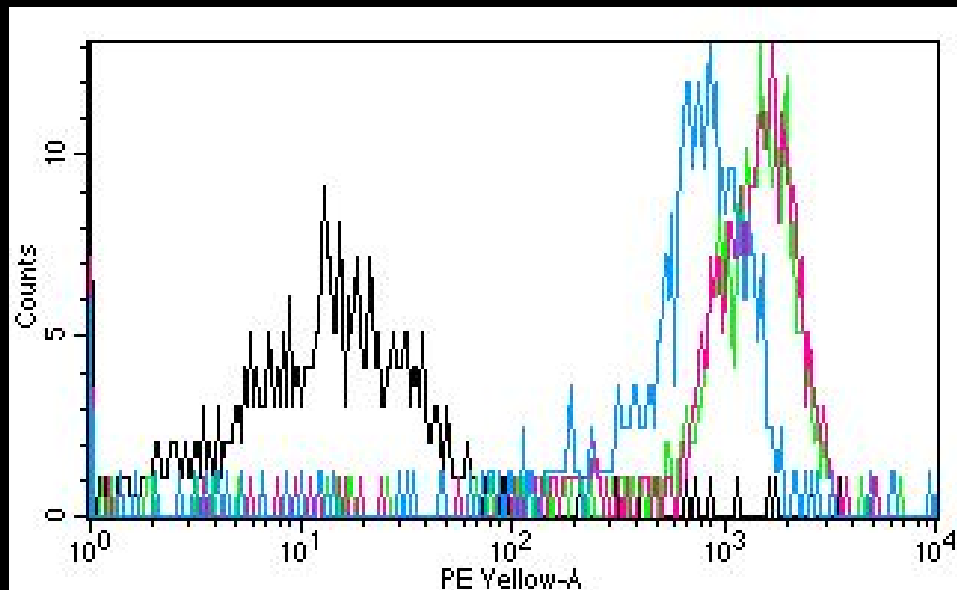
# DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS POR CMF

Patentes: US 6,610,498 B1 (26 de agosto de 2003)

US 6,686,165 B2 (3 de febrero de 2004)



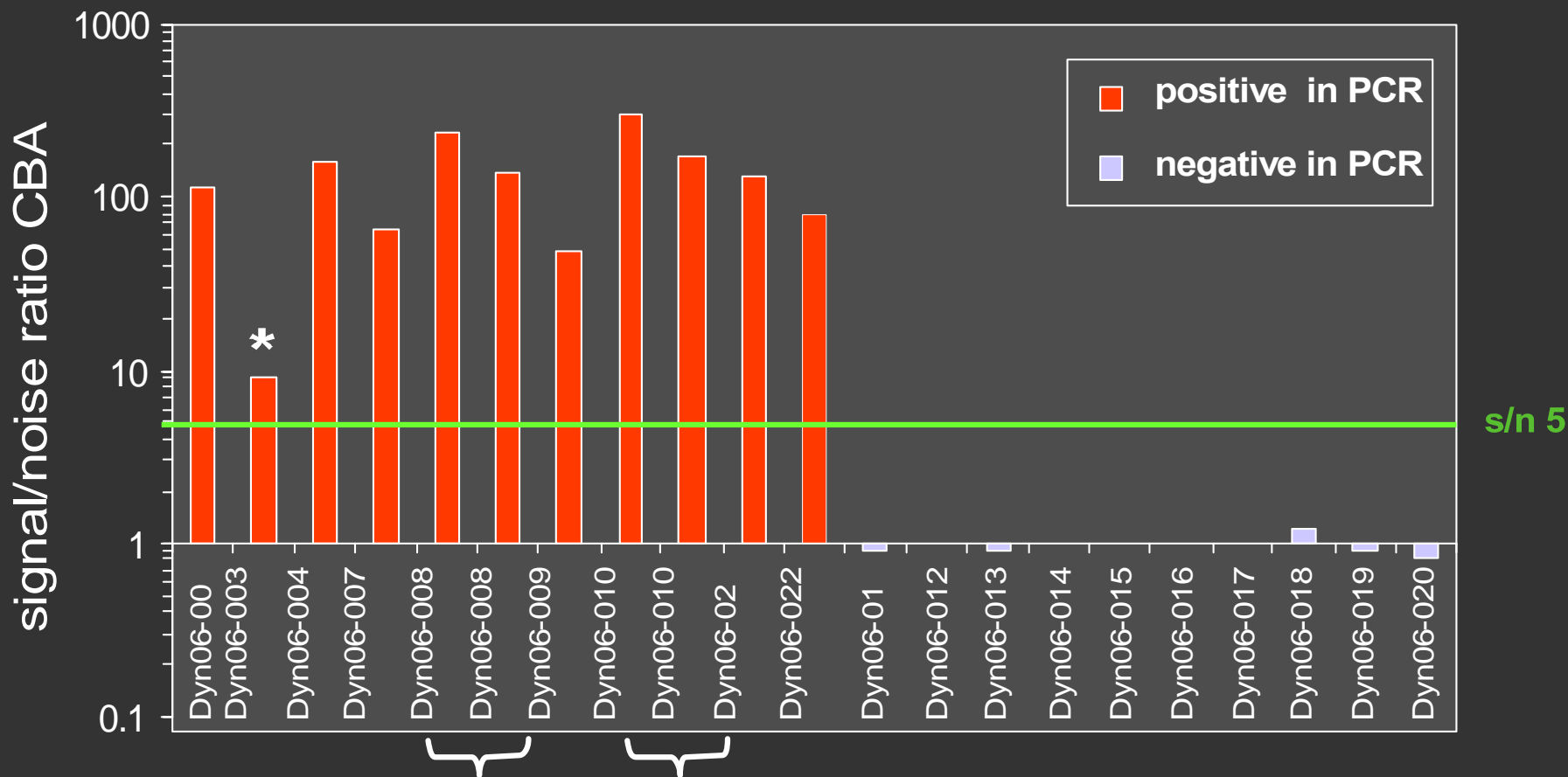
# Detección de la proteína de fusión BCR-ABL t(9;22) por CMF usando microesferas (BD™ CBA Flex beads): Especificidad



Black: 697 (t(1;19), neg. control)  
Blue: TOM-1, BCR-ABL<sup>+</sup> (p190)  
Green: LAMA-84 BCR-ABL<sup>+</sup> (p210)  
Purple: AR230, BCR-ABL<sup>+</sup> (p230)

Catching antibody: anti-BCR (clone 3E2C10)  
Bead: BD-Flex bead (A7)  
Detection antibody: biotinylated anti-ABL (clone 8E9) + SA-PE

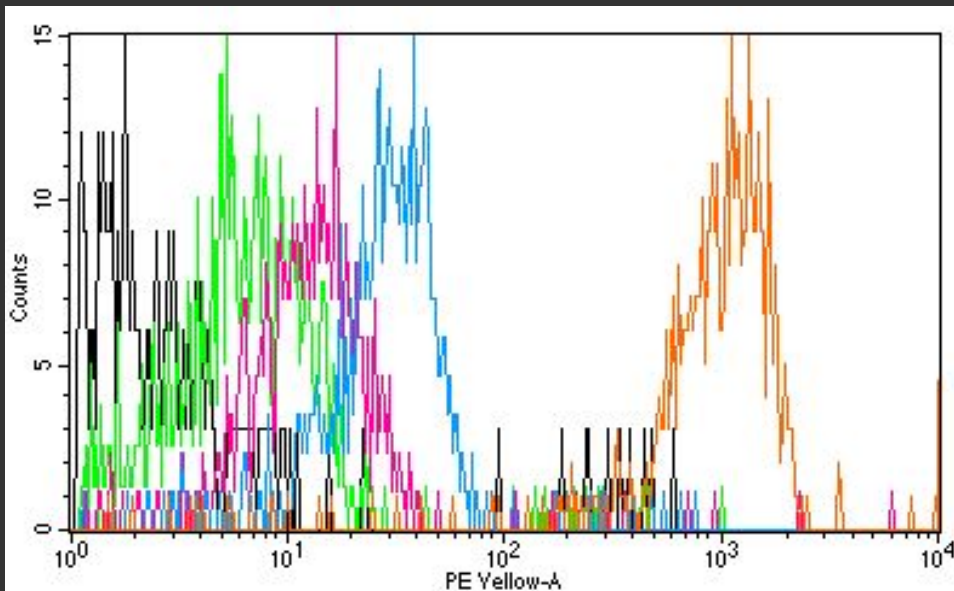
# Detección de BCR-ABL en LLA pB al diagnóstico usando CBA



} same sample tested in 2 separate experiments

\* patient with mutation close to a ABL-binding site

# Detección de microesferas con BD™ CBA Flex beads para la proteína de fusión BCR-ABL t(9;22) por citometría de flujo: Sensibilidad



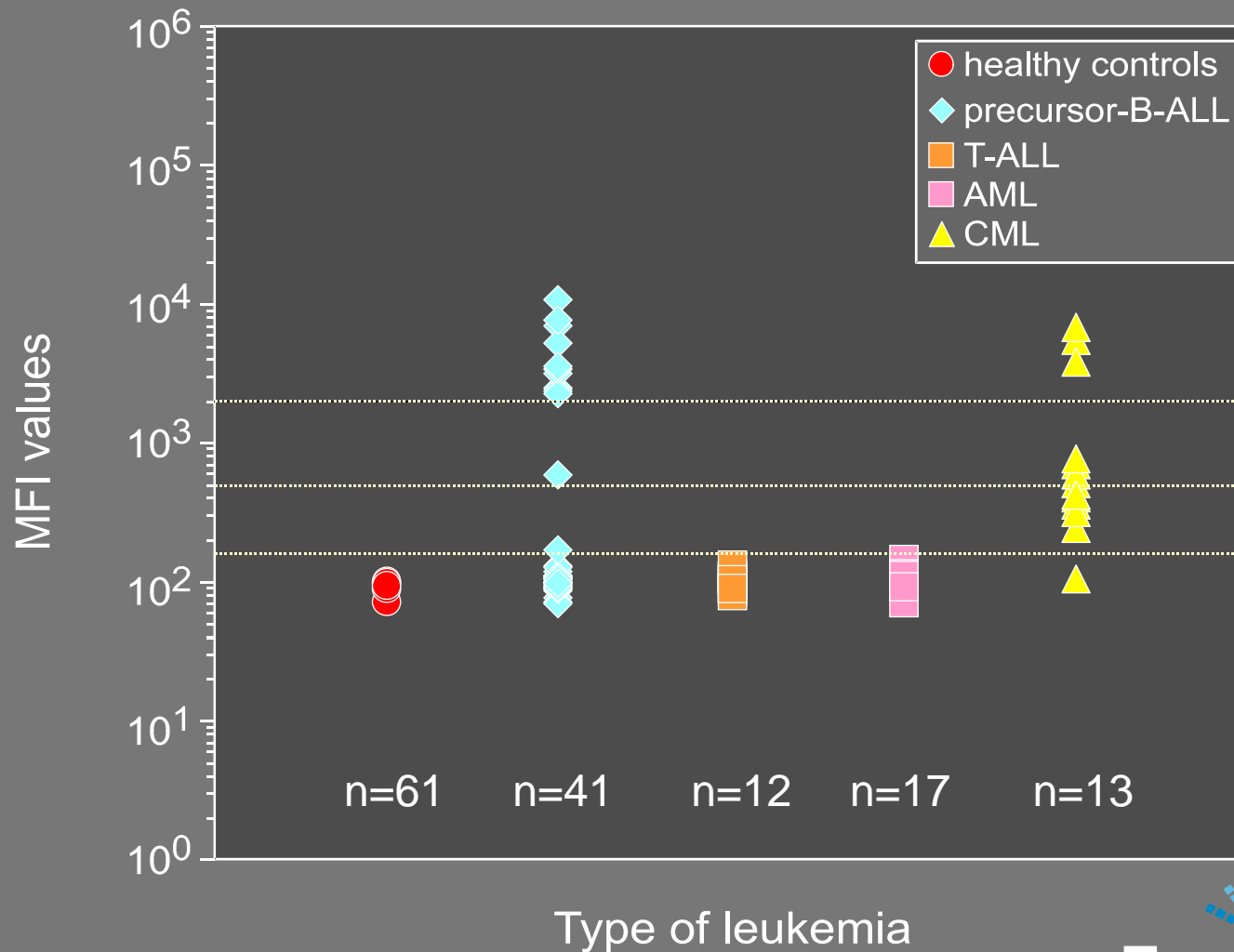
Black: PBMNC (100%)  
Green: 0.5% Lama-84  
Purple: 1% Lama-84  
Blue: 2% Lama-84  
Orange: 100% Lama-84

Catching antibody: anti-BCR (clone 3E2C10)

Bead: BD-Flex bead (A7)

Detection antibody: biotinylated anti-ABL (clone 8E9) + SA-PE

# EVALUACIÓN DEL KIT BCR-ABL RUO POR EL GRUPO EuroFlow (n=144)



# KIT BCR-ABL RUO: CONCLUSIONES PRELIMINARES

---

## .- Elevada sensibilidad y especificidad:

- **Concordancia absoluta** con los resultados de **PCR**:
  - 12/41 LLA-pB (todos adultos)
  - 12/12 LMC
  - 0/29 LMA y LLA-T

## .- Cantidad de proteína bcr/abl:

- Patrón heterogéneo con **dos grupos de casos positivos**:
  - Expresión elevada: IMF  $\geq 2.000$
  - Expresión relativamente baja: IMF  $\geq 500$  y  $< 2.000$
- IMF de las muestras negativas  $< 150$

## .- Diferente patrón de expresión en LLA-pB y LMC:

**LLA-pB**: 83% (10/12) mostraron expresión **elevada**

**LMC**: 75% (9/12) mostraron expresión **baja/intermedia\***

\*¿Expresión baja o actividad residual de proteasas?

# PANEL DE TUBOS DE ESFERAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LEUCEMIAS AGUDAS

Precursor-B-ALL

AML

'MLL'

T-ALL

BCR-ABL

PML-RARA

MLL-AF4

CALM-AF10

TEL-AML1

AML1-ETO

MLL-AF9

LMO2

E2A-PBX1

CBFB-MYH11

MLL-AF10

HOX11L2

( MLL-AF4)

MLL-ENL

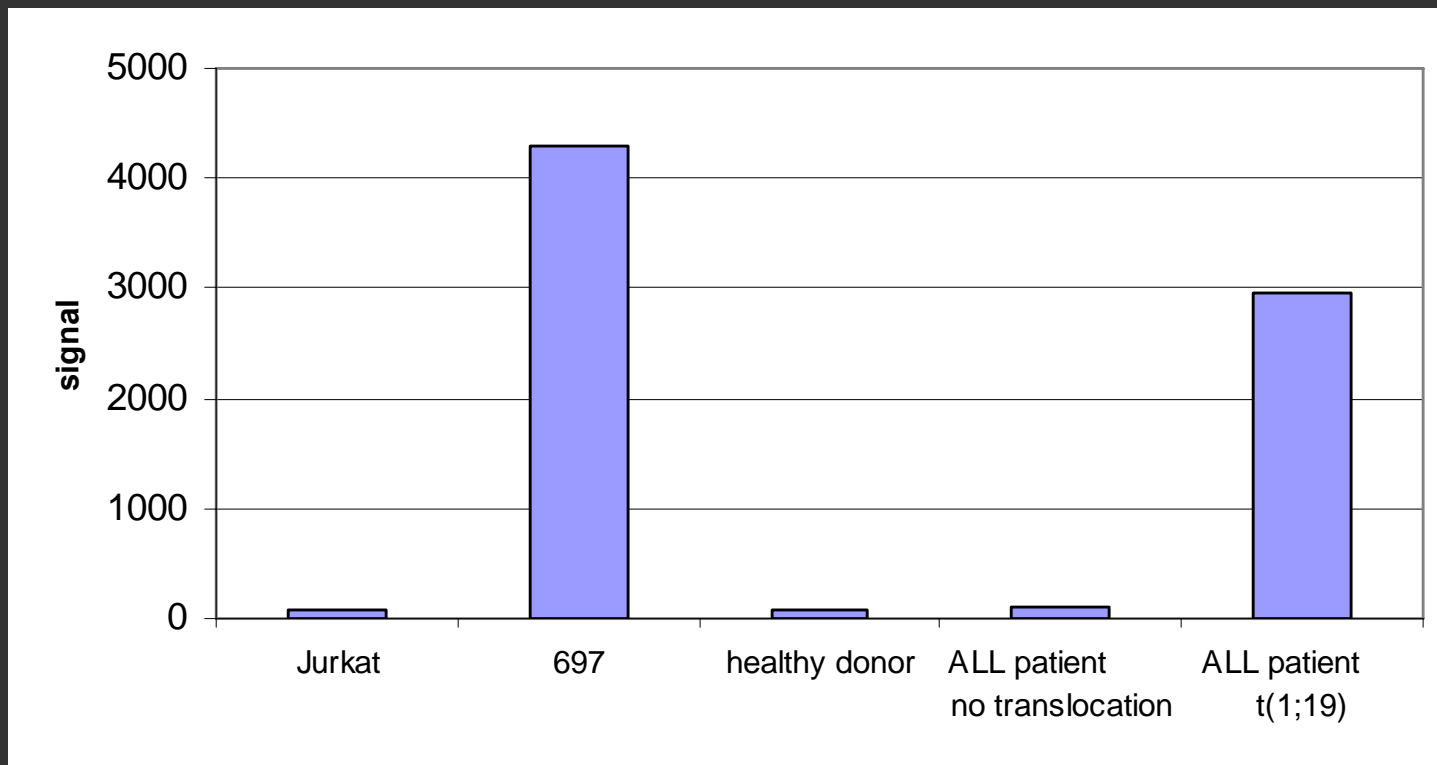
TAL1

MLL-AF6



**EuroFlow**

## E2A-PBX1: test en líneas celulares y muestras de pacientes

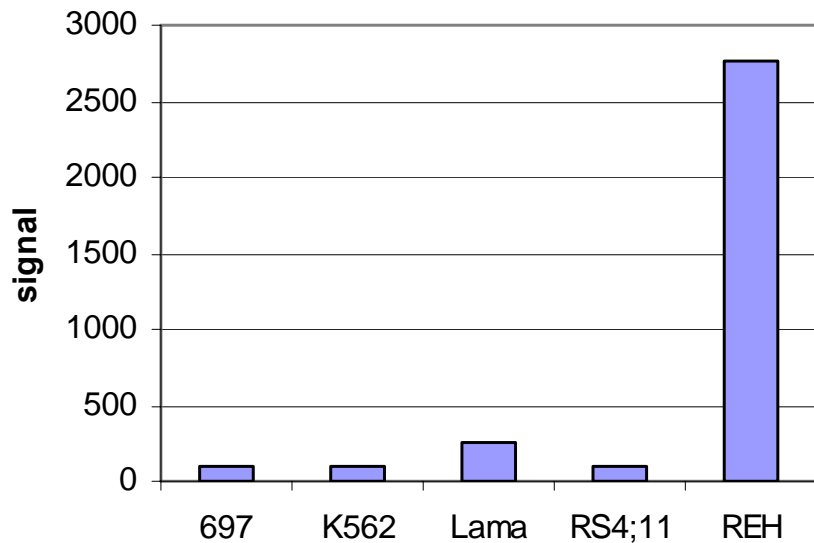


### Conclusión:

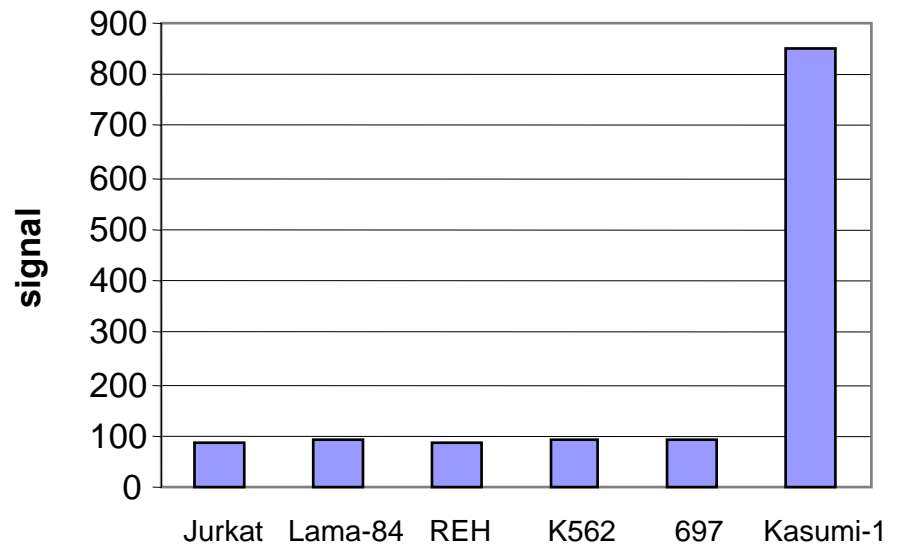
El CBA para E2A-PBX1 detecta la proteína E2A-PBX1 en lisados de líneas celulares y muestras de pacientes positivos para t(1;19)

# Microesferas: nuevos diseños

## TEL-AML1: especificidad



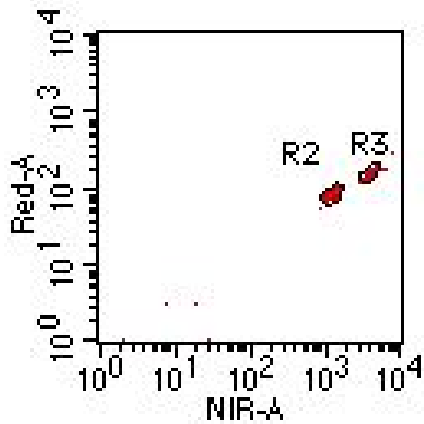
## AML1-ETO: especificidad



### Conclusión:

El CBA para la detección de TEL-AML1 y AML1-ETO es específico para las líneas celulares REH con t(12;21) y Kasumi t(8;21), respectivamente.

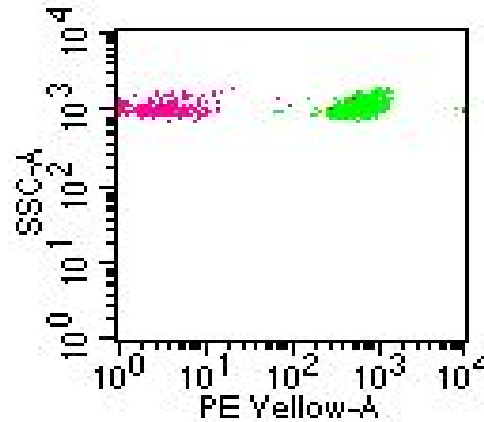
# DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN BCR-ABL Y E2A-PBX



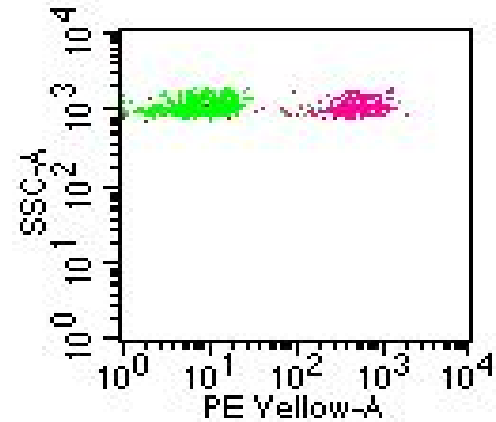
R2 = green = BCR beads

R3 = pink = E2A beads

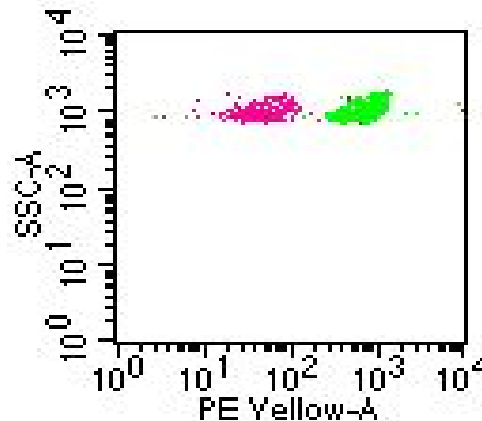
100% K562



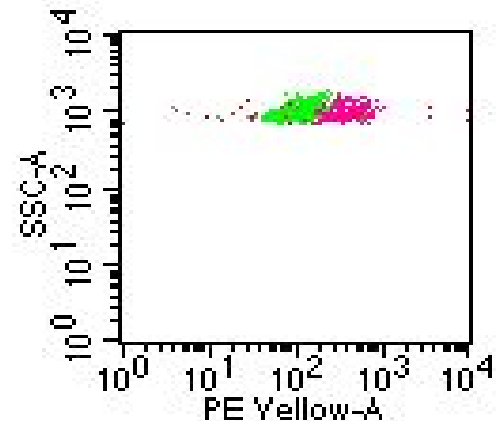
100% 697



10% 697/K562



10% K562/697



# Valor diagnóstico del sistema de microesferas para la detección de proteínas de fusión en leucemias

1. Por vez primera la citometría de flujo puede reemplazar técnicas moleculares
2. Primer ensayo diagnóstico clínicamente relevante usando microesferas
3. Herramienta novedosa directamente aplicable en el diagnóstico de leucemias
4. De aplicación rápida y sencilla en cualquier laboratorio diagnóstico con equipamiento para citometría de flujo → amplia diseminación en laboratorios médicos

## University Institutes / Medical Schools

Erasmus MC, Rotterdam, NL

USAL, Salamanca, ES

IMM, Lisbon, PT

UNIKIEL, Kiel, DE

AP-HP, Paris, FR

UNIVLEEDS, Leeds, GB

DPH/O, Prague, CZ

SAM, Zabrze, PL

J.J.M. van Dongen, V.H.J. van der Velden

A. Orfao, J.F. San Miguel

P. Lucio, A. Parreira

M. Kneba, M. Ritgen, S. Böttcher

E. Macintyre, V. Asnafi

S. Richards, A.C. Rawstron

O. Hrusak, J. Trka

T. Szczepanski

## Companies (SME's)

DYNAMICS, Rotterdam, NL



Peter Schoevers, Liesbeth Dekking, R. Noordijk. A. van der Linden

CYTOGNOS, Salamanca, ES

M. Martin, M. Castaño, A. Rodríguez Prieto, J. Bensadon