

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-521733

(P2015-521733A)

(43) 公表日 平成27年7月30日(2015.7.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2015-517213 (P2015-517213)	(71) 出願人	315006920
(86) (22) 出願日	平成25年6月14日 (2013.6.14)		エラスムス ユニバーシティ メディカル センター ロッテルダム
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月11日 (2015.2.11)		Erasmus University Medical Center Rott erdam
(86) 国際出願番号	PCT/NL2013/050420		オランダ国、3015 ジーイー ロッテ ルダム、ドクター モルウォータープレイ ン 50
(87) 国際公開番号	W02013/187765		Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE Rotterd am The Netherlands
(87) 国際公開日	平成25年12月19日 (2013.12.19)	(74) 代理人	100101085
(31) 優先権主張番号	61/659,524		弁理士 横井 健至
(32) 優先日	平成24年6月14日 (2012.6.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小残存病変を検出するための方法、試薬およびキット。

(57) 【要約】

本発明は、微小残存病変 (MRD) 診断の分野に関し、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病 (BCP-ALL)、B細胞慢性リンパ球性白血病 (B-CLL) 及び多発性骨髄腫 (MM) のような、血液学的悪性腫瘍を有する患者における治療有効性の評価に継続的に適用される。少なくとも  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  にまでの感受性に到達することができる、10色及び12色フローサイトメトリー染色と同様の、8色以上フローサイトメトリー染色のための、厳選し徹底的にテストされた免疫抗体を組み合わせたユニークな試薬組成物が提供される。また、診断キットとMRDを発見するための方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト被験体におけるB細胞前駆体ALL (BCP-ALL) のフローサイトメトリー検出のための試薬組成物であって、少なくとも 8 種類の相異なる蛍光色素結合化抗体を含むパネルからなり、該パネルは、少なくとも中核となるマーカーであるCD10、CD19、CD20、CD34およびCD45に対する各抗体を含む、試薬組成物。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の試薬組成物であって、前記パネルが、CD38、CD81、Cylg $\mu$  およびデオキシトランスフェラーゼ (NuTdT) に対する抗体の群から選択された 1 またはそれ以上の抗体をさらに含む、試薬組成物。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の試薬組成物であって、前記パネルが、( a ) CD66c および CD123 に対する各抗体の組合せ ; ( b ) CD304 および CD73 に対する各抗体の組合せ ; および ( c ) Smlg および Smlg に対する各抗体の組合せから選択された 1 またはそれ以上の抗体の組合せをさらに含む、試薬組成物。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の試薬組成物であって、前記各組合せに含まれる各抗体が同じ蛍光色素を結合化したものである、試薬組成物。

## 【請求項 5】

請求項 1 - 4 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物であって、以下のマーカーの組合せのうちの一つに対するものである、相異なる蛍光色素結合化抗体を含む、試薬組成物 :

20

( i ) CD20、CD45、CD81、CD66c、CD123、CD34、CD19、CD10 および CD38、ただし CD66c および CD123 に対する各抗体は同じ蛍光色素が結合化されている ;

( ii ) CD20、CD45、CD81、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10 および CD38、ただし CD304 および CD73 に対する各抗体は同じ蛍光色素を結合化している ;

( iii ) CD20、CD45、NuTdT、Smlg 、 Smlg 、 Cylg $\mu$  、 CD19、CD34 および CD10、ただし Smlg および Smlg に対する各抗体は同じ蛍光色素が結合化されている。

## 【請求項 6】

請求項 5 に記載の試薬組成物であって、マーカーである CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10 および CD38 に直接対応する、相異なる蛍光色素結合化抗体と、以下に示された 1 つまたはそれ以上の抗体のセットと、を含むものである試薬組成物 :

30

( a ) CD66c および CD123 に対する各抗体のセット ;

( b ) CD304 および CD73 に対する各抗体のセット ; および

( c ) Smlg および Smlg に対する各抗体のセット

で、上記各セットに含まれる各抗体は全て同じ蛍光色素が結合化されている。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の試薬組成物であって、マーカーである CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、Smlg 、 Smlg 、 Cylg $\mu$  、 CD34、CD19、CD10 および CD38 に直接対応する、相異なる蛍光色素結合化抗体を含み、ただし、CD66c/CD123、CD304/CD73 および Smlg /Smlg の各組合せに対する抗体は、同じ蛍光色素が結合化されているものである、試薬組成物。

40

## 【請求項 8】

ヒト被験体における慢性リンパ球性白血病 (CLL) のフローサイトメトリー検出のための試薬組成物であって、少なくとも 8 種類の相異なる蛍光色素結合化抗体を含むパネルからなり、該パネルは、少なくとも中核となるマーカーである CD5、CD27、CD79b、CD3、CD200、CD81 および CD19 に対する各抗体を含む、試薬組成物。

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の試薬組成物であって、好ましくは CD43 と CD38 との組合せにおいて、CD22 および / または受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1 (ROR1) を追加マーカー

50

とした、試薬組成物。

【請求項 10】

ヒト被験体における多発性骨髄腫（MM）または形質細胞疾患（PCD）のフローサイトメトリー検出のための試薬組成物であって、少なくとも 8 種類の相異なる蛍光色素結合抗体を含むパネルからなり、該パネルは、少なくとも中核となるマーカーである CD138、CD38、CD56 および CD19 に、CD27、CD117、CD81、CD229、CD45、Cylg および Cylg の群から選択される 4 つの追加マーカーを補足的したものに対する各抗体を含む、試薬組成物。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の試薬組成物であって、好ましくは CD27、CD117 および CD81 との組合せ、または CD229、Cylg および Cylg との組合せにおいて、CD45 を第 5 のマーカーとした、試薬組成物。

10

【請求項 12】

請求項 10 または 11 に記載の試薬組成物であって、以下のマーカーの組合せのうちの 1 つに対するものである、相異なる蛍光色素結合抗体を含む、試薬組成物：

- (iv) CD45、CD138、CD38、CD56、CD27、CD19、CD117 および CD81
- (v) CD45、CD138、CD38、CD56、CD229、CD19、Cylg および Cylg
- (vi) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117 および CD81
- (vii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD229、CD19、Cylg および Cylg
- (viii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、Cylg および Cylg 。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の試薬組成物であって、マーカーである CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117、CD81 に直接対応する、相異なる蛍光色素結合抗体と、(a) CD229 および CD28 に対する抗体の組合せ；(b) Cylg および Cylg に対する抗体の組合せの、1 または両方の組合せとを含む、試薬組成物。

20

【請求項 14】

少なくとも請求項 1 - 13 に記載された 1 の試薬を含み、必要に応じて、使用説明書、緩衝液、および / または対照試料を含む、微小残存病変（MRD）のフローサイトメトリー検出のための診断キット。

【請求項 15】

以下の工程からなる、細胞、好ましくはリンパ球を含む、生物学的試料における微小残存病変（MRD）を検出するための多色フローサイトメトリーの方法：

30

- (i) 請求項 1 - 13 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物で試料を染色し、
- (ii) 前記試料をフローサイトメトリーに供し、
- (iii) 選択マーカーの発現を前記試薬組成物中に含まれる抗体によって検出し細胞をゲーティングし、
- (iv) 複数のマーカーの発現プロファイルに基づき、正常及び悪性細胞を区別する。

【請求項 16】

工程 (iv) が多変量解析、好ましくは主成分分析（PCA）を含むものである請求項 15 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の診断の分野に関するものであり、より具体的には、治療中及び治療後における病態進行の監視のため、または、微小な播種性病変の検出のための、手段および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞増殖抑制性または細胞毒性治療は、リンパ性悪性疾患を有する患者の大部分に寛解をもたらす。それにもかかわらず、患者の大半は疾患を再発する。現在の細胞増殖抑制性または細胞毒性治療のプロトコルは、そのような再発患者においては、全ての悪性細胞を

50

殺すことができているように見受けられる。それがたとえ細胞形態学的基準におけるいわゆる完全寛解に達していたとしてもである。細胞形態学的手法の検出限界値が悪性細胞の1~5%という値よりも小さくなることはないという事実がある以上、そのような手法は、治療の有効性に関し表面的な情報を提供しているに過ぎないことは明らかであり、 $10^{10}$ 個以上もの腫瘍細胞が、患者体内には依然として潜在的に残存しているのである。

#### 【0003】

「微小残存病変」または最小限の病変(MRD)を検出するより高感度の技法は、誘導治療中の腫瘍塊の減少および1つまたは複数の組織からの維持療法中の悪性細胞のさらなる撲滅に関するより良い洞察を得るために、必要とされている。フローサイトメトリーを適用したMRDの検出の方法は、伝統的には、抗原の異常発現、過剰発現、および相互系列発現などの悪性腫瘍に関連する表現型特徴を介し、悪性細胞と正常な白血球とを識別ことに基づいている。

10

#### 【0004】

現在の4色と6色フローサイトメトリー法は、血液学的悪性腫瘍患者のほとんどにおいて、 $10^{-3}$ (から $10^{-4}$ )の公正感度に達する。しかし、治療中及び治療後、及び、造血幹細胞移植後における、血液、骨髄及び脳脊髄液のような他の体液中における低頻度の腫瘍細胞の存在の検出は、高頻度に存在する正常に再生する細胞により妨害され得ることに留意すべきである。細胞再生の程度及びパターンは、治療プロトコルごと、治療の段階ごと、サンプリングの時間ごとに異なっていて、治療をより集中的に行ったり、造血細胞の再生をより顕著に行わせるという、先行して行われた治療に、より強く依存する。

20

#### 【0005】

論理的には、再生し続ける細胞によるバックグラウンドおよび薬剤誘発性免疫表現型の変化という二つの要因によって、従来4色又は6色フローサイトメトリーを用いたMRDの検出法は、感度と特異性が減少している。このことは主に、マーカーの複数の組み合わせを、患者におけるMRDの評価に使用するか、あるいは、1または少数の患者固有マーカーの組み合わせを使用するという、取り組みにつながった。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

MRDのための改良された診断法の必要性を認識し、本発明者らは、特に、複数のマーカーの情報に多変量解析を組み合わせる完全に統合された手法に基づき、MRDを検出するためのより高感度で信頼性の高い検出法を得るために使用することができる追加のマーカーの同定に着手した。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

そして、この新しいアプローチは、もはや、個々の患者に限定されるものではなく、B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病(BCP-ALL)、B細胞慢性リンパ球性白血病(B-CLL)及び多発性骨髄腫(MM)といった、特定の疾患カテゴリーに属するすべての患者にも適用可能である。

#### 【0008】

関連するマーカーの慎重な選択、多色チューブにおける抗体の適切な組み合わせの設計、および(輝度、補正、安定性などの必要性に基づき)適した蛍光色素の選択の後、抗体試薬の組合せが開発された。研究は、再修正し、最適な効率を達成するために、コンセンサスパネルの大規模多施設評価によって補完された。本発明者らは、厳選された徹底的にテスト済みの抗体の組合せを用い、設計-試験-再設計-再試験-再設計(など)により、 $10^{-4}$ から $10^{-5}$ の感度に達することのできる新規な8色以上の染色法を設計し、BCP-ALL、B-CLL及びMMといった疾患の種別毎に、蛍光色素標識抗体の特定の組合せを開発した。

40

#### 【発明の効果】

#### 【0009】

50

患者ごとに1または2種の、8色以上の組合せを用いることで、少なくとも $10^{-4}$ の感度にて慎重なMRDのモニタリングを行うことが可能となる。10色及び12色の抗体による組合せによって、正常細胞とそれらが悪性化した細胞とを、より適切に区別することができ、その結果、MRDを $10^{-5}$ 以下の感度にて検出することが出来るようになる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】CD19およびCD45とを識別するそれぞれのマーカーと側方光散乱とを組み合わせ（パネルA～C）、治療中のBCP-ALL患者から得られた骨髄サンプル中のBCP細胞と他の有核細胞との区別を使用する方法の代表的な例。各プロットにおいて、ライトグレーで示すイベントはサンプル中の非B細胞に対応し、濃い灰色で示すイベントは成熟B細胞に対応し、黒で示すイベントはBCP細胞に対応する。主成分1対主成分2の多変量解析結果（APS1）において（パネルD）、成熟B細胞およびBCP細胞はいずれも、すべての有益なパラメータ（例えばCD19、CD45、側方光散乱）に基づく他のすべてのイベントから明確に分離されている。

10

【図2】治療中のBCP-ALL患者から得られた骨髄試料中のBCP-ALL細胞および正常残留B細胞との区別において、CD10、CD20、CD34、CD66c/CD123およびCD38の免疫表現型特性化マーカーと側方光散乱とを組み合わせ使用する方法の例を示す（パネルA～D）。図1で記載したようにゲートされ、選択された後、骨髄中のB細胞のみが示される。各プロットにおいて、黒点は、試料中のBCP-ALL細胞に対応し、灰色の点は正常のB細胞に対応する。正常B細胞と比べると、BCP-ALL細胞は、CD81（パネルD）、CD10（パネルA及びD）およびCD66c/CD123（パネルC）が過剰発現を示す。全ての免疫表現型マーカーと散乱特性に基づいたAPS1（主成分1対主成分2）の表示（パネルE）において、正常残留B細胞（灰色）はBCP-ALL細胞（黒）から明確に区別される。

20

【図3】CLL患者からの末梢血試料中の成熟B細胞と他の有核細胞とを区別するための、CD19およびCD3識別マーカーを側方光散乱と組み合わせ（パネルA～C）使用する方法の例を示す。各プロットでは、灰色のイベントが、試料中の非B細胞に対応し、黒のイベントは全末梢血B細胞に対応する。主成分1対主成分2の多変量解析結果（APS1）において（パネルD）、B細胞は、すべての有益なパラメータ（例えばCD19、CD3、側方光散乱）に基づく他のすべてのイベントから明確に分離されている。

【図4】CLL患者からの末梢血試料中のCLL細胞と正常な成熟B細胞とを区別するための、CD27、CD5、CD22、CD200およびCD79bの免疫表現型特性化マーカー（パネルA～C）を使用する方法の例を示す。図3で記載したようにゲートされ、選択された後、末梢血B細胞のみが示される。各プロットでは、灰色の点は正常末梢血B細胞に対応し、黒の点は、試料中のCLL細胞に対応する。正常B細胞と比較して、CLL細胞は、CD200（パネルB）およびCD5（パネルAおよびC）が過剰発現を示すとともに、CD22（パネルB）およびCD79b（パネルC）が低発現を示す。全ての免疫表現型マーカーと散乱特性に基づいたAPS1（主成分1対主成分2）の表示（パネルD）において、CLL細胞は正常なB細胞から明確に区別されるが、個々のマーカーに基づいて区別することはできなかった。

30

【図5】MM患者からの骨髄サンプル中の形質細胞と他の有核細胞とを区別するための、CD38およびCD138識別マーカーを側方光散乱と組み合わせ（パネルA～C）使用する方法の例を示す。各プロットでは、灰色のイベントが、試料中の非形質細胞に対応し、黒のイベントは全骨髄中の形質細胞に対応する。主成分1対主成分2の多変量解析結果（APS1）において（パネルD）、B細胞は、すべての有益なパラメータ（例えばCD138、CD38、側方光散乱）に基づく他のすべてのイベントから明確に分離されている。

40

【図6】治療後のMM患者から得られた骨髄試料中の骨髄腫/悪性形質細胞と正常残留形質細胞との区別において、CD81、CD19、CD45、CD56、CD27、CD117及びCD38の免疫表現型特性化マーカーと側方光散乱とを組み合わせ使用する方法の例を示す（パネルA～D）。図5で記載したようにゲートされ、選択された後、骨髄形質細胞のみが示される。各プロットでは、灰色の点は正常残留骨髄形質細胞に対応し、黒の点は、試料中の骨髄腫/クローン性形質細胞に対応する。正常形質細胞と比較して、骨髄腫/クローン性形質細胞は、C

50

D81、CD19、CD45、CD27およびCD38が低発現を示すとともに、高い側方光散乱とCD56 and CD117の過剰発現が示された。主成分1対主成分2の(APS1)として示された(パネルEの)多変量解析結果において、正常残留形質細胞(灰色)は骨髄腫/悪性形質細胞(黒)から明確に区別されるが、個々のマーカーに基づいて区別することはできなかった。

【発明を実施するための形態】

【0011】

ここでは、サンプル中のMRDを検出するための新たな8色、10色および12色の抗体の組合せを提示する。

サンプルは、例えば血液または骨髄であって、以下の患者から単離される。

- B細胞前駆体急性リンパ芽球性白血病(BCP-ALL)、
- B細胞慢性リンパ球性白血病(B-CLL)、又は、
- 多発性骨髄腫(MM)及び形質細胞疾患(PCD)。

10

【0012】

これらの多色免疫染色は、Van Dongenら, Leukemia 2012; 26: 1908-1075、および、Kallinaら, Leukemia 2012; 26: 1986-2010に記載される、いわゆるEuroFlowプロトコルに従って行うことができる。

【0013】

したがって、本発明は、MRDのフローサイトメトリー検出のため、少なくとも8種類の相異なる蛍光色素結合化抗体の組合せを含む、独自の試薬組成物を提供する。具体的には、それら試薬組成物は、BCP-ALL、B-CLL又はMM/PCDを有する患者におけるMRDを検出するために使用されるものとなる。好ましい実施形態において、組成物は、特定のCD抗原に対するモノクローナル抗体を含む。CDは分化抗原群(cluster designation)の略であり、特定の細胞表面抗原またはモノクローナル抗体によって定義される細胞内抗原を同定するための名称である。個々のマーカーに対する(モノクローナル)抗体は、ベクトン/ディキンソン(BD)バイオサイエンス、ダコ、ベックマン・コールター、サイトグノス、カルタグ、ファーミンゲン、エクスパイオ、サンクイン、インビトロジェンなどを含む様々な企業から商業的に得ることができる。

20

【0014】

フローサイトメトリーによるBCP-ALLにおけるMRDの検出

30

一実施形態において、本発明は、少なくとも8つの異なる蛍光色素結合化抗体のパネルを含む、ヒト被験体におけるBCP-ALL細胞のフローサイトメトリー検出のための試薬組成物を提供する。BCP-ALLパネルは、4つの「中核となるマーカー」であるCD10、CD19、CD20、CD34と、CD45とに対する各抗体を含む。好ましくは、パネルはさらに、CD38、CD81、Cylgμ、及びデオキシヌクレオチド転移酵素(NuTdT)に対する抗体の群から選択される1つまたはそれ以上の抗体を含む。パネルはさらに、(a)CD66cおよびCD123に対する各抗体のセット、(b)CD304及びCD73に対する各抗体のセット、及び、(c)Smlg とSmlg に対する各抗体のセットであって、各セット内の各抗体は同じ蛍光色素が結合化されている、該抗体のセットを1つまたは複数を含む場合、非常に良好な結果が得られる。特定の態様では、BCP-ALLパネルは、CD10、CD19、CD20、CD34、CD45に対する各抗体と、CD38、CD81、Cylgμ、NuTdTに対する各抗体の群から選択される一つまたは複数の抗体と、(a)CD66cおよびCD123に対する各抗体のセット、(b)CD304及びCD73に対する各抗体のセット、および、(c)Smlg とSmlg に対する各抗体のセットであって、各セット内の抗体が同じ蛍光色素に結合化されている、該抗体のセットを、2またはそれ以上と、を含む。例えば、試薬組成物は、以下のマーカーの組合せのうちの1つに対するものである、相異なる蛍光色素結合化抗体を含む：

40

(i) CD20、CD45、CD81、CD66c、CD123、CD34、CD19、CD10およびCD38、ただしCD66cおよびCD123に対する各抗体は同じ蛍光色素が結合化されている；

(ii) CD20、CD45、CD81、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10及びCD38、ただしCD304およびCD73に対する各抗体は同じ蛍光色素が結合化されている；

50

(iii) CD20、CD45、NuTdT、Smlg、Smlg、Cylg $\mu$ 、CD19、CD34およびCD10、ただしSmlgとSmlgに対する各抗体は同じ蛍光色素が結合されている。8色BCP-ALL MRDのパネル1Aを参照のこと。

【0015】

別の例としては、異なる種類の蛍光色素を結合した、マーカーであるCD20、CD45、CD81、NuTdT、CD34、CD19、CD10及びCD38に対する各抗体と、(a)CD66cおよびCD123に対する各抗体のセット、(b)CD304及びCD73に対する各抗体のセット、及び、(c)SmlgとSmlgに対する各抗体のセットであって、上記各セットに含まれる各抗体は全て同じ蛍光色素が結合化されている、該抗体のセットを、1またはそれ以上と、を含む。マーカーのCD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10及びCD38に対する各抗体を含むパネル1Bにおける10色チューブを参照のこと。

10

【0016】

更なる特定の態様では、組成物は、マーカーであるCD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、Smlg、Smlg、Cylg $\mu$ 、CD34、CD19、CD10およびCD38に直接対応する、相異なる蛍光色素結合化抗体を含み、ただし、CD66c/CD123、CD304/CD73とSmlg/Smlgの各組合せに対する抗体は、同じ蛍光色素が結合化されているものである、前記各蛍光標識化抗体の組み合わせを含むものである。パネル1Cの12色のチューブを参照。

【0017】

本発明において使用するための、列挙された各マーカーに対する抗体に結合化させるために適した各蛍光色素は、当該分野で公知である。当然のことながら、試薬組成物内で使用される各蛍光色素は、フローサイトメトリーによって相互に区別され得るべきである。各蛍光色素は、好ましくは、明るさ、制限されたスペクトルの重なり、および、補償、安定性、他の、制限された必要性に応じて、選ばれる(カーリーナら、Leukemia 2012: 26: 1986-2010を参照)。

20

【0018】

次に示す蛍光色素のパネルは、本発明のBCP-ALL試薬組成物において特に有用である：(1) pacific blue (PacB)、brilliant violet 421 (BV421)またはHorizon V450、(2) pacific orange (PacO)、Horizon V500 (HV500)、BV510、Khrome orange (KO)またはOC515、(3) フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはAlexa488、(4) フィコエリトリン(PE)、(5) ペリジニククロロフィルタンパク質/シアニン5.5 (PerCP-Cy5.5)、PerCPまたはPE-TexasRed、(6) フィコエリトリン/シアニン7 (PE-Cy7)、(7) アロフィコシアニン(APC)またはAlexa647、および(8) アロフィコシアニン/ハイライト7 (APC-H7)、APC-Cy7、Alexa680、APC-A750、APC-C750またはAlexa700。複数回の試験の結果、本発明者らは、以下の蛍光色素が選択される場合に非常に良好な結果が得られることを見出した：Pacific Blue、brilliant violet 421またはHorizon V450、PacOまたはHorizon V500、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC、およびAPC-H7またはAPC-A750またはAPC-C750。特定の態様において、本発明は、表1のパネル1A、パネル1Bまたはパネル1Cに示す試薬組成物を提供する。

30

【0019】

表1. BCP-ALLにおけるMRD検出のための代表的な試薬組成物

40

パネル1A. 本発明の8色BCP-ALL MRDパネルのマーカー構成

tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCC750
1	CD20	CD45	CD81	CD66c and CD123	CD34	CD19	CD10	CD38
2	CD20	CD45	CD81	CD304 and CD73	CD34	CD19	CD10	CD38
2	CD20	CD45	NuTdT	SmIgκ and SmIgλ	CyIgμ	CD19	CD34	CD10

10

## 【 0 0 2 0 】

パネル 1 B . 本発明の 1 0 色のBCP-ALL MRDパネルのマーカ－構成

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
CD20	CD45	CD81	NuTdT	CD66c and CD123	CD304 and CD73	CD34	CD19	CD10	CD38

20

## 【 0 0 2 1 】

パネル 1 C . 本発明の 1 2 色のBCP-ALL MRDパネルのマーカ－構成

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
CD20	CD45	CD81	NuTdT	CD66c and CD123	CD304 and CD73	SmIgκ and SmIgλ	CyIg μ	CD34	CD19	CD10	CD38

30

## 【 0 0 2 2 】

フローサイトメトリーによるB-CLLにおけるMRDの検出

別の実施形態において、本発明は、少なくとも 8 種類の相異なる蛍光色素結合化抗体を含むパネルからなる、ヒト被験体におけるB細胞慢性リンパ球性白血病（B-CLL）フローサイトメトリー検出のための試薬組成物を提供し、BCP-ALLパネルは、少なくとも 7 つの「中核となるマーカ－」であるCD5、CD27、CD79b、CD3、CD200、CD81およびCD19に対する各抗体を含む。CD22および/または受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1（ROR1）が有用な追加のマーカ－（複数のマーカ－）として使用できることが見出された。非常に良好な結果が、マーカ－CD43とCD38との組み合わせで得られた。

40

## 【 0 0 2 3 】

B-CLLを検出するための好ましいマーカ－の組み合わせは以下のとおりである：

- (a) CD27、CD3、CD79b、CD5、CD22、CD19、CD200およびCD81
- (b) CD5、CD3、CD79b、ROR1、CD27、CD19、CD200およびCD81
- (c) CD27、CD3、CD79b、ROR1、CD5、CD22、CD19、CD20、CD200およびCD81
- (d) CD27、CD3、CD79b、ROR1、CD5、CD22、CD19、CD20、CD200、CD43、CD81およびCD38

## 【 0 0 2 4 】

次に示す蛍光色素のパネルは、本発明のBCP-ALL試薬組成物において特に有用である：（

50

1) pacific blue (PacB), brilliant violet 421 (BV421)またはHorizon V450、(2) pacific orange (PacO)、Horizon V500 (HV500)、BV510、Khrome orange (KO)またはOC515、(3) フルオレセインイソチオシアネート (FITC)またはAlexa488、(4) フィコエリトリン (PE)、(5) ペリジニククロフィルタンパク質/シアニン5.5 (PerCP-Cy5.5)、PerCPまたはPE-TexasRed、(6) フィコエリトリン/シアニン7 (PE-Cy7)、(7) アロフィコシアニン (APC)またはAlexa647、および(8) アロフィコシアニン/ハイライト7 (APC-H7)、APC-Cy7、Alexa680、APC-A750、APC-C750またはAlexa700。複数回の試験の結果、本発明者らは、以下の蛍光色素が選択される場合に非常に良好な結果が得られることを見出した：Pacific Blue、brilliant violet 421またはHorizon V450、PacOまたはHorizon V500、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC、およびAPC-H7またはAPC-A750またはAPC-C750。

10

## 【 0 0 2 5 】

特定の態様において、本発明は、表 2 に示す試薬組成物を提供する。

## 【 0 0 2 6 】

表 2 : B-CLLにおけるMRD検出のための代表的な試薬組成物

パネル 2 A . 8 色CLL MRDパネルの構成

BV421	BV510	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCC750
CD27	CD3	CD79b	CD5	CD22	CD19	CD200	CD81
CD5	CD3	CD79b	ROR1	CD27	CD19	CD200	CD81

20

## 【 0 0 2 7 】

パネル 2 B . 1 0 色CLL MRDパネルの構成

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
CD27	CD3	CD79b	ROR1	CD5	CD22	CD19	CD20	CD200	CD81

30

## 【 0 0 2 8 】

パネル 2 C . 1 2 色CLL MRDパネルの構成

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
CD27	CD3	CD79b	ROR1	CD5	CD22	CD19	CD20	CD200	CD43	CD81	CD38

## 【 0 0 2 9 】

フローサイトメトリーによる多発性骨髄腫/形質細胞疾患 (MM/PCD) におけるMRDの検出

40

本発明のさらなる態様は、MMまたはPCD細胞を検出するための試薬組成物に関する。パネルは、少なくとも4つの「中核となるマーカー」であるCD138、CD38、CD56およびCD19に対する各抗体と、CD27、CD117、CD81、CD229、CD45、Cylg およびCylg からなる群から選択される少なくとも4つの追加のマーカーとを含む。CD45は、好適な第5のマーカーであり、CD27、CD117およびCD81またはCD229、Cylg およびCylg と組み合わせるのに好ましい。

## 【 0 0 3 0 】

マーカーに関する以下のパネルのいずれか1つに対する、相異なる蛍光色素結合化抗体を用いた試薬組成物が提供される：

50

(n)	CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81
(o)	CD45	CD138	CD38	CD56	CD229	CD19	Cy1g	Cy1g
(p)	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
(q)	CD138	CD27	CD38	CD56	CD229	CD19	Cy1g	Cy1g
(r)	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	Cy1g	Cy1g

## 【 0 0 3 1 】

例えば、ヒト被験体におけるMMまたはPCDのフローサイトメトリー検出のための試薬組成物は、少なくとも8種類の相異なる蛍光色素結合化抗体を含むパネルからなり、該パネルは、少なくとも中核となるマーカーであるCD138、CD38、CD56およびCD19に対する各抗体と、CD27、CD117、CD81、CD229、CD45、Cy1g およびCy1g の群から選択される少なくとも4つの追加のマーカーとを含む。好ましくは、CD45を第5のマーカーとし、より好ましくは、さらに、CD27、CD117およびCD81を組み合わせるか、または、CD229、Cy1g およびCy1g を組み合わせる。好ましい試薬組成物は、以下のマーカーの組合せのうちの1つに対するものである、相異なる蛍光色素結合化抗体を含むものである：

10

- (iv) CD45、CD138、CD38、CD56、CD27、CD19、CD117およびCD81
- (v) CD45、CD138、CD38、CD56、CD229、CD19、Cy1g およびCy1g
- (vi) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117およびCD81
- (vii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD229、CD19、Cy1g およびCy1g
- (viii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、Cy1g およびCy1g 。

例として、8色BCP-ALL MRDパネル3 Aを参照。

20

## 【 0 0 3 2 】

非常に良好な結果が、CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117、CD81に対する蛍光標識抗体、および、(a)CD229およびCD28に対する抗体のセット；および(b)Cy1g およびCy1g に対する抗体のセットから選択された1または両方の抗体のセットとを用いることで得られた。パネル3 Bの10色のチューブとパネル3 Cの12色のチューブを参照。

## 【 0 0 3 3 】

次に示す蛍光色素のパネルは、本発明のMM/PCD試薬組成物において特に有用である：(1) pacific blue (PacB)、brilliant violet 421 (BV421)またはHorizon V450、(2) pacific orange (PacO)、Horizon V500 (HV500)、BV510、Khrome orange (KO)またはOC515、(3) フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはAlexa488、(4) フィコエリトリン(PE)、(5) ペリジニクロロフィルタンパク質/シアニン5.5 (PerCP-Cy5.5)、PerCPまたはPE-TexasRed、(6) フィコエリトリン/シアニン7 (PE-Cy7)、(7) アロフィコシアニン(APC)またはAlexa647、および(8) アロフィコシアニン/ハイライト7 (APC-H7)、APC-Cy7、Alexa680、APC-A750、APC-C750またはAlexa700。複数回の試験の結果、本発明者らは、以下の蛍光色素が選択される場合に非常に良好な結果が得られることを見出した：Pacific Blue、brilliant violet 421またはHorizon V450、PacOまたはHorizon V500、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC、およびAPC-H7またはAPC-A750またはAPC-C750。

30

## 【 0 0 3 4 】

表3：MM/PCDにおけるMRD検出のための代表的な試薬組成物

40

パネル3 A . PCD MRDパネルの構成

Tube	PacB or BV421 or HV450	HV500 or PacO	FITC	PE	PerCPCy5. 5	PECy7	APC	APCH7 or APCA750 or APCC750
1	CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CD117	CD81
2	CD45	CD138	CD38	CD56	CD229	CD19	CyIgκ	CyIgλ
3	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
4	CD138	CD27	CD38	CD56	CD229	CD19	CyIgκ	CyIgλ
5	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CyIgκ	CyIgλ

10

## 【 0 0 3 5 】

パネル 3 B . 1 0 色PCD MRDパネルの構成

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD229	CD28
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CyIgκ	CyIgλ

20

## 【 0 0 3 6 】

パネル 3 C . 1 2 色PCD MRDパネルの構成

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81	CD229	CD28	CyIgκ	CyIgλ

30

## 【 0 0 3 7 】

本発明の更なる態様は、特にBCP-ALL MRD、CLL MRDまたはMM/PCD MRDなどの、MRDを検出するための診断キットに関し、本明細書の先に記載の試薬組成物の1つ以上を含み、必要に応じて、使用説明書、緩衝液、および/または対照試料を含む（カーリーナら、Leukemia 2012: 26: 1986-2010を参照）。一実施形態では、表1の一つ以上の試薬組成物を含むBCP-ALLキットが提供される。別の実施形態では、表2の一つ以上の試薬組成物を含むCLLのキットが提供される。さらに別の実施形態では、表3の一つ以上の試薬組成物を含むPCDのキットが提供される。

## 【 0 0 3 8 】

また、本発明は、また、MRDのフローサイトメトリーによる検出のための方法に関し、ヒト被験体由来の生物学的サンプルを用意し、本明細書に記載される試薬組成物と該サンプルの少なくとも一部（一定分量）とを接触させる工程を含む。白血球を含むことが判明しているか、含むことが想定されるどのようなサンプルであっても、直接、または無核赤血球を溶血した後、または密度勾配遠心分離を行った後、またはセルソーティングを行った後に利用できる。例えば、試料は、末梢血、骨髄、リンパ節、アデノイド、脾臓または肝臓などの組織、または脳脊髄液、硝子体液、滑液、胸水や腹水などの他のタイプの体液である。末梢血または骨髄が好ましい。好ましくはB系統細胞（B細胞前駆体、Bリンパ球、および形質細胞）である細胞からなる生物学的サンプル中の微小残存病変（MRD）を検出するための多色フローサイトメトリー法が提供され、以下の工程を含む：

40

50

- (i) 試料を本発明の試薬組成物で染色し、
- (ii) フローサイトメトリーに試料を供する；
- (iii) 選択マーカーの発現を試薬組成物中に含まれる抗体によって検出し細胞をゲーティングする；

(iv) 複数のマーカーの発現プロファイルに基づき、正常および悪性細胞を区別する。

好ましくは、工程(iv)における分析は多変量解析、好ましくは、主成分分析(PCA)を含み、各マーカーには、主成分分析により判別される値が付与される。有利には、例えばInfinicytソフトウェア、または多次元スケーリング(MDS)分析を用い、自動化された集団の分離法 - APS view - が適用される。PCAは、直交変換を使用して、おそらく相関がある観測値の集合を主成分と呼ばれる非相関変数の値の集合に変換する、数学的な手順である。主成分の数は、元の変数の数かそれ以下である。この変換は、最初の主要な成分はできるだけ高い分散を有し(つまり、可能な限りデータが変動し)、続くの各構成成分は、可能な限り最高の分散を有するように、先の成分と(無相関に)直交するよう、定義されている。主成分は、データセットが共同で正規分布している場合にのみ依存しないように保証されている。主成分は、連帯して正規分布している場合に限り独立であることが保証されている。PCAは、元の変数の相対的なスケーリングに敏感である。アプリケーションの分野に応じて、それはまた、離散カルーネン - レーブ変換(KLT)、ホテリング変換または固有直交分解(POD)と命名されている。PCAの代わりに、MDSまたは十分に確立された任意の他の多変量解析を使用することができる(ペドレイラら, Trends Biotechnol 2013参照)

10

20

#### 【0039】

一実施形態では、リンパ球を含む生物学的サンプル中に存在する微小残存病変(MRD)を検出するための多色フローサイトメトリー法が提供され、該MRDがBCP-ALLであることを特徴とし、以下の段階を含む：

(i) 好ましくは、パネル1A、1Bまたは1Cのいずれか1つから選択される本発明のBCP-ALL試薬組成物により試料を染色し；

(ii) フローサイトメトリーに試料を供し；

(iii) 試薬組成物中の抗体によって検出された各マーカーの発現により成熟したB細胞及びBCP細胞をゲートし；

(iv) それぞれが主成分分析により判別処理において値を付加した複数のマーカーを用いた分析法に基づき、正常および悪性BCP細胞を区別する。

30

BCP-ALL患者におけるMRDの検出を可能にする分析の例として、実施例1と、図1および2を参照のこと。

#### 【0040】

別の実施形態において、リンパ球を含む生物学的サンプル中に存在する微小残存病変(MRD)を検出するための多色フローサイトメトリー法が提供され、該MRDがCLLであることを特徴とし、以下の段階を含む：

(i) 好ましくは、パネル2A、2Bまたは2Cのいずれか1つから選択される本発明のCLL試薬組成物により試料を染色し；

(ii) フローサイトメトリーに試料を供し；

40

(iii) 試薬組成物中の抗体によって検出された各マーカーの発現によりBリンパ球をゲートし；

(iv) それぞれが主成分分析により判別処理において値を付加した複数のマーカーを用いた分析法に基づき、正常および悪性B細胞を区別する。

CLL患者におけるMRDの検出を可能にする分析の例として、実施例2と、図3および4を参照のこと。

#### 【0041】

さらに別の実施形態では、リンパ球を含む生物学的サンプル中に存在する微小残存病変(MRD)を検出するための多色フローサイトメトリー法が提供され、該MRDがMM/PCDであることを特徴とし、以下の段階を含む：

50

(i) 好ましくは、パネル 3 A、3 B または 3 C のいずれか 1 つから選択される本発明の MM/PCD 試薬組成物により試料を染色し；

(ii) フローサイトメトリーに試料を供し；

(iii) 試薬組成物中の抗体によって検出された各マーカーの発現により形質細胞をゲートし；

(iv) それぞれが主成分分析により判別処理において値を付加した複数のマーカーを用いた分析法に基づき、正常および悪性形質細胞を区別する。

MM/PCD 患者における MRD の検出を可能にする分析の例として、実施例 3 と、図 5 および 6 を参照のこと。

#### 【実施例】

##### 【0042】

本明細書に開示され EuroFlow アプローチの力は、正常細胞（例えば、正常な前駆 B 細胞、正常な B リンパ球及び正常な血漿細胞）を同定し、かつ、正常/反応性細胞とクローン/悪性細胞とを区別するための、各マーカーのセットの組み合わせと多変量解析の使用に基づいている。この目的のため、全ての他のマーカーとの組み合わせにおいて、その貢献度に応じて、各マーカーをパネルへ組み込んだり除外したりするよう、個々のマーカーの寄与度が強力に多変量解析される。実験的な試験を複数回、連続して繰り返し、最も特異的なマーカーの選択された組み合わせを評価するために、このような戦略がとられた。最終的に提案された抗体の組み合わせは、主成分分析と組み合わせで使用される場合、特に Infinicyt ソフトウェアの自動集団分別 (APS) ツールと組み合わせで使用される場合に、非

##### 【0043】

ここに、我々は、BCP-ALL（実施例 1）、CLL（実施例 2）及び多発性骨髄腫（実施例 3）患者の血液および骨髄中の MRD を検出するための大規模な実験的研究の結果の要約を提供する。

##### 【0044】

以下の実施例では、マーカーのリストが、BCP-ALL、CLL、および MM/PCD の場合における最も頻度の高い表現型の異常とともに、示される。しかし、それは、実施例 1 から 3 に関する各図に示す主成分分析においても明確に示されているように、正常および悪性細胞との間の実際の識別力は、対応する n 次元空間内のマーカーの組み合わせに基づいていることに留意すべきである。実際には、いくつかのマーカーにおける小さな違いは、合計され主成分分析における大きな違いとなる。したがって、本発明は、MRD 検出のための単一のマーカーの研究に関するものではなく、正常な BCP 細胞と BCP-ALL 芽細胞、正常な B リンパ球と B-CLL 細胞、及び、正常な形質細胞と MM/PCD というような、正常細胞とそれらが悪性化したものとの間の優れた識別を可能とするよう、慎重に選択がなされたマーカーのセットに関するものである。

##### 【0045】

#### 実施例 1 . BCP-ALL 患者における MRD 検出のための抗体パネルと診断方法

骨髄中の全 B 細胞及び B 細胞前駆体を同定するためのマーカー

関連する識別マーカーのリスト : CD19、CD45

それらを使用する方法 : CD19 マーカーを用いた予備的なゲーティングは、純粋な B 細胞集団を同定するために不可欠である。正常 B 細胞前駆体 (BCP) に照準を合わせるには、CD45 陽性の成熟 B 細胞の中から BCP を識別するよう、CD45-陰性または弱陽性を使用することができる。CD19 指向療法の場合には、CD19 は CD22 に置き換えることがある。これらのマーカーは、末梢血または骨髄または他のタイプの試料（例えば、骨髄、組織生検、髄液）における B 細胞を同定するため、側方光散乱 (SSC)、前方光散乱 (FSC)、または、FSC と SSC の両方に、組み合わせで使用することもできる。注目すべきは、正常 BCP 細胞から BCP-ALL 細胞を識別するために使用される CD10、CD20、CD38 および CD34 のような他のマーカー (

10

20

30

40

50

下記参照)は、総BCP細胞集団(例えばCD34+、CD10+、CD20-から僅かに発現、CD38+)のゲーティングに寄与し得る点である。

【0046】

B細胞前駆細胞を正常と悪性とに区別するためのマーカー

各マーカーと、最も頻度の高い表現型異常の一覧:

CD38: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で低発現

CD10: BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で高発現または低発現

CD45: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で低発現(通常は発現せず)

CD20: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で低発現または高発現

CD81: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で高発現または低発現

CD66c: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で高発現(特にBCR-ABL陽性ALL; TEL-AML1-陽性またはMLL-AF4-陽性ALLでは一般に陰性)

CD123: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で(特に高二倍体ALLにおいて)高発現

CD304: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で高発現

CD73: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で高発現

CD34: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で低発現または高発現

SSC: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で強度が増加または減少。

FSC: 正常B細胞前駆細胞に対し、BCP-ALL/悪性B細胞前駆細胞で強度が増加または減少。

【0047】

実施例2. CLL患者におけるMRD検出のための抗体パネルと診断方法

末梢血および骨髄中の全B細胞を同定するためのマーカー:

識別マーカーのリスト: CD19, CD3(除外マーカー)

それらを使用する方法: このマーカーの組み合わせを用いたプレゲーティングは、純粋なB細胞の集団を同定し、T細胞/B細胞のダブレットを除去するために不可欠である。これらのマーカーは、末梢血または骨髄または他のタイプの試料(例えば、組織生検、髄液)においてB細胞を同定するため、側方光散乱(SSC)、前方光散乱(FSC)、または、FSCとSSCの両方に、組み合わせで使用することもできる。CLL細胞をさらに濃縮するより洗練されたゲーティングのためには、CD5とCD27の両方を使用し得る。

【0048】

CLL細胞から正常B細胞を区別するためのマーカー:

各マーカーと、最も頻度の高い表現型異常の一覧:

CD27: CLL細胞と正常B細胞の小分画において陽性

CD5: CLL細胞と正常B細胞の小分画において陽性

CD79b: 正常の未成熟および成熟Bリンパ球に比べ、CLL細胞において低発現

CD22: 正常の未成熟および成熟Bリンパ球に比べ、CLL細胞において低発現

CD20: 正常の未成熟および成熟Bリンパ球に比べ、CLL細胞において低発現

CD200: 正常の未成熟および成熟Bリンパ球に比べ、CLL細胞において高発現

ROR1: 正常の未成熟および成熟Bリンパ球に比べ、CLL細胞において高発現

CD43: 正常の未成熟および成熟Bリンパ球に比べ、CLL細胞において高発現

CD81: B細胞前駆細胞および、未成熟および成熟した両Bリンパ球に比べ、CLL細胞において低発現

CD38: B細胞前駆細胞に比べ、CLL細胞において低発現

【0049】

実施例3. MM/PCD患者におけるMRD検出のための抗体パネルと診断方法

10

20

30

40

50

骨髄中の全ての形質細胞を同定するためのマーカー：

識別マーカーのリスト：CD38、CD138およびCD229

それらを使用する方法：3つのマーカーの任意の組み合わせを、任意の蛍光色素の位置付けにおいて使用する；そしてまた、3つのマーカーのうちの2つの任意の組み合わせを使用するか、または、(全てではないが)各症例におけるサブセットにおける3つのマーカーのうちの1つのみであっても、使用することが可能である。好ましい組み合わせは、以下に示すようにする：1) CD138/CD38/CD229；2) CD138/CD38，3) CD138/CD229；4) CD38/CD229；5) CD138；6) CD38)；7) CD229。これらのマーカーのそれぞれ及びその組み合わせのいずれかが、骨髄中の形質細胞または他のタイプの試料(例えば末梢血、組織生検、髄液)を識別するために、側方光散乱(SSC)、前方光散乱(FSC)、または、FSCとSSCの両方に、組み合わせて使用することもできることに留意されたい。

10

【0050】

正常形質細胞と、クローン性/悪性形質細胞を区別するためのマーカー：

各マーカーと、最も頻度の高い表現型異常の一覧：

CD38：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において低発現

CD27：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において低発現

CD45：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において低発現

CD19：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において低発現(通常は発現せず)

CD81：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において低発現

CD56：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において高発現

CD28：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において高発現

CD117：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において高発現

20

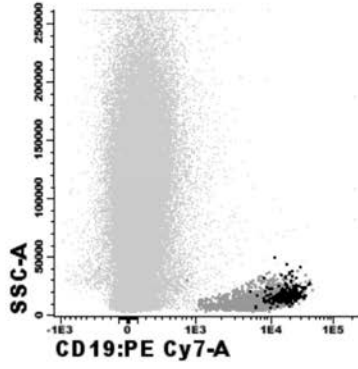
CyIgkおよびCyIglambda：悪性の形質細胞における発現は、1つまたは他のIg軽鎖のいずれかに限定されるがバランスのとれた分布を示す(正常な形質細胞中におけるCyIgk/CyIglambdaの比は通常は3と0.5の間の範囲)

SSC：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において強度が増加または減少。

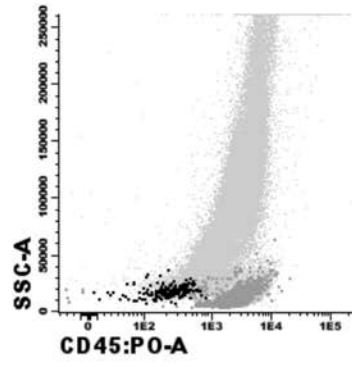
FSC：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において強度が増加または減少。

【図1】

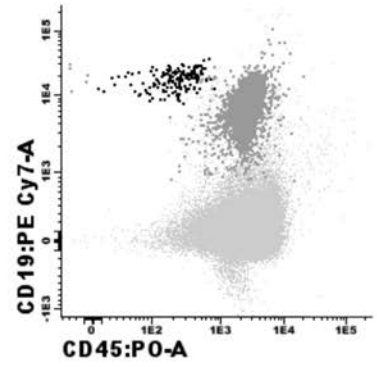
パネルA



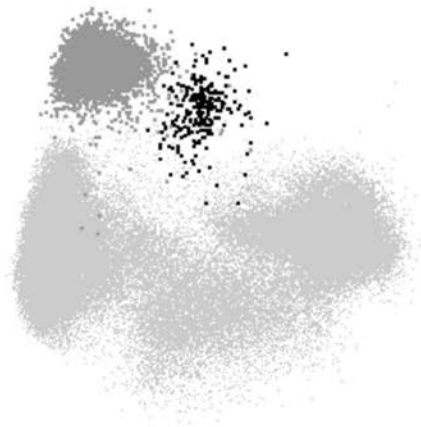
パネルB



パネルC



パネルD

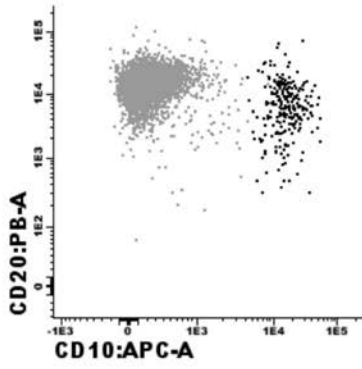


---

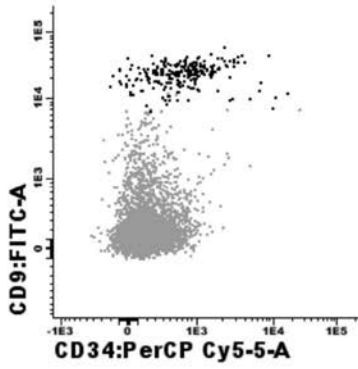
APS 1

【 図 2 】

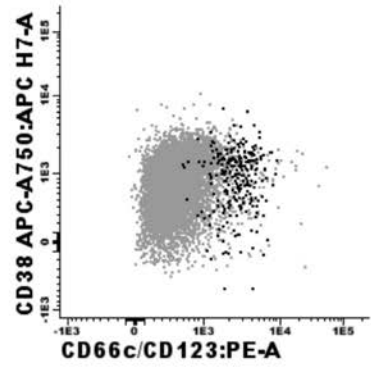
パネルA



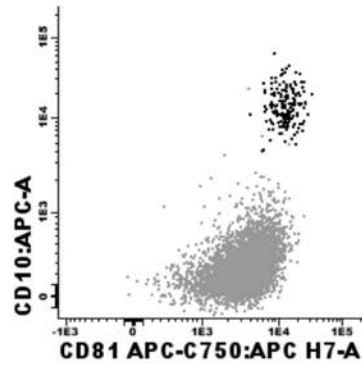
パネルB



パネルC



パネルD

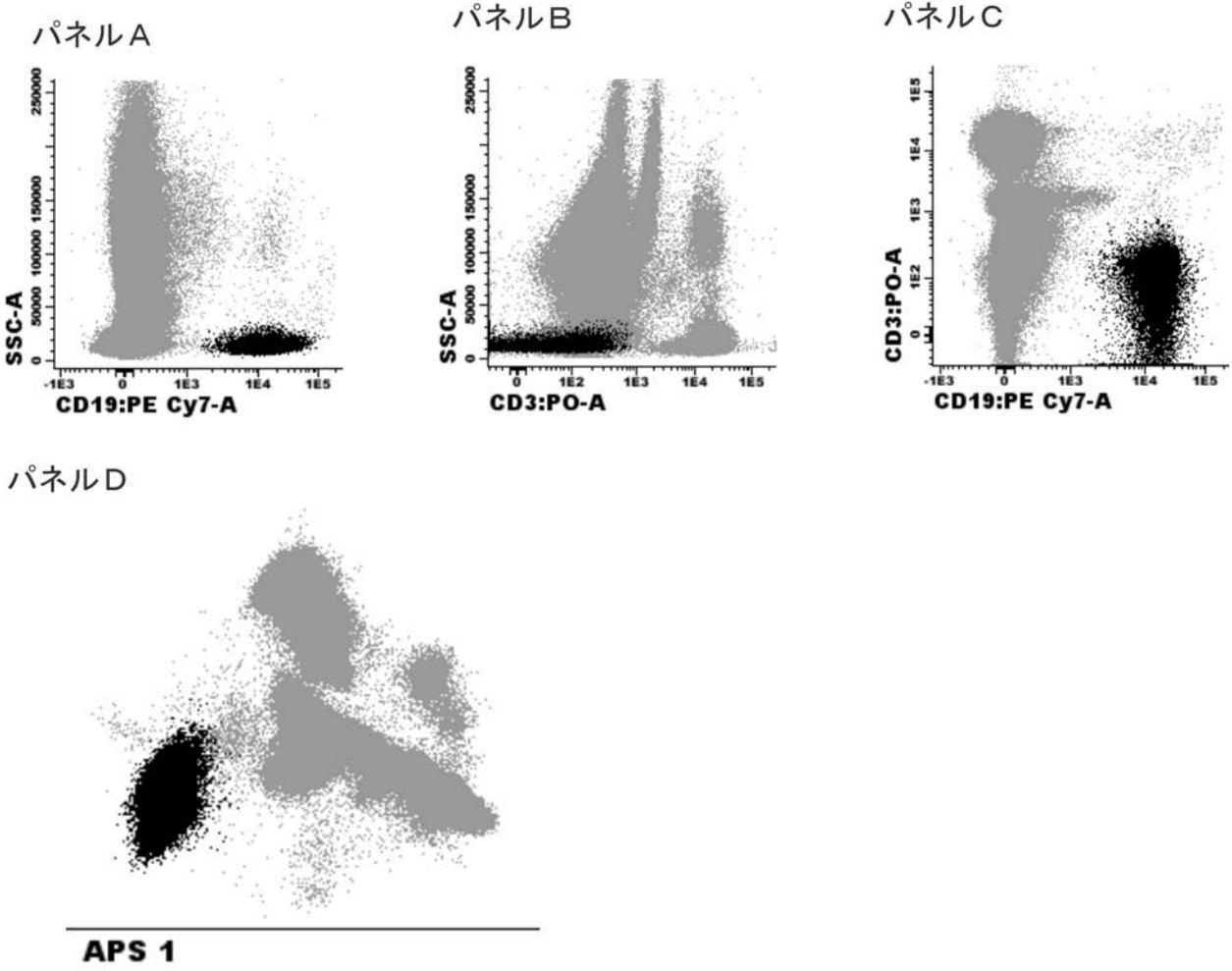


パネルE



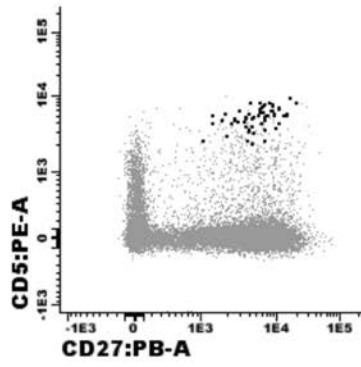
APS 1

【 図 3 】

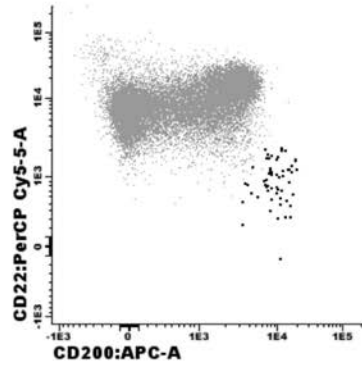


【 図 4 】

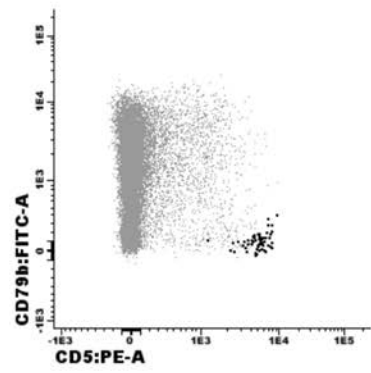
パネルA



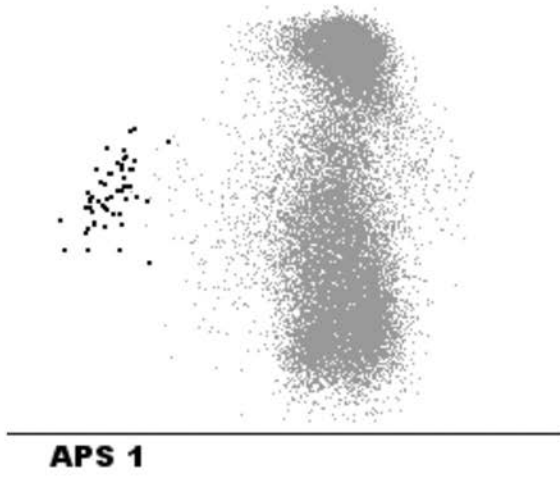
パネルB



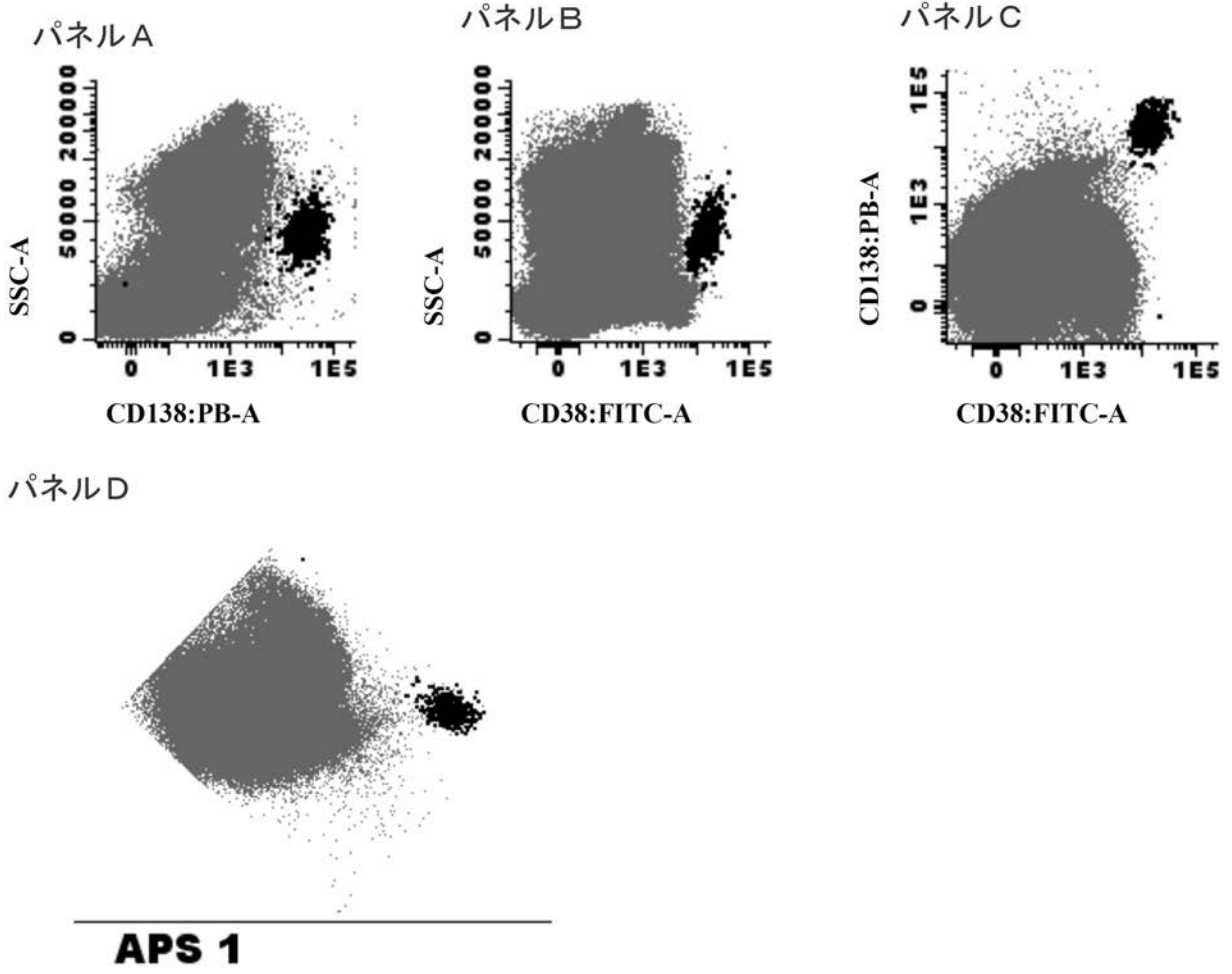
パネルC



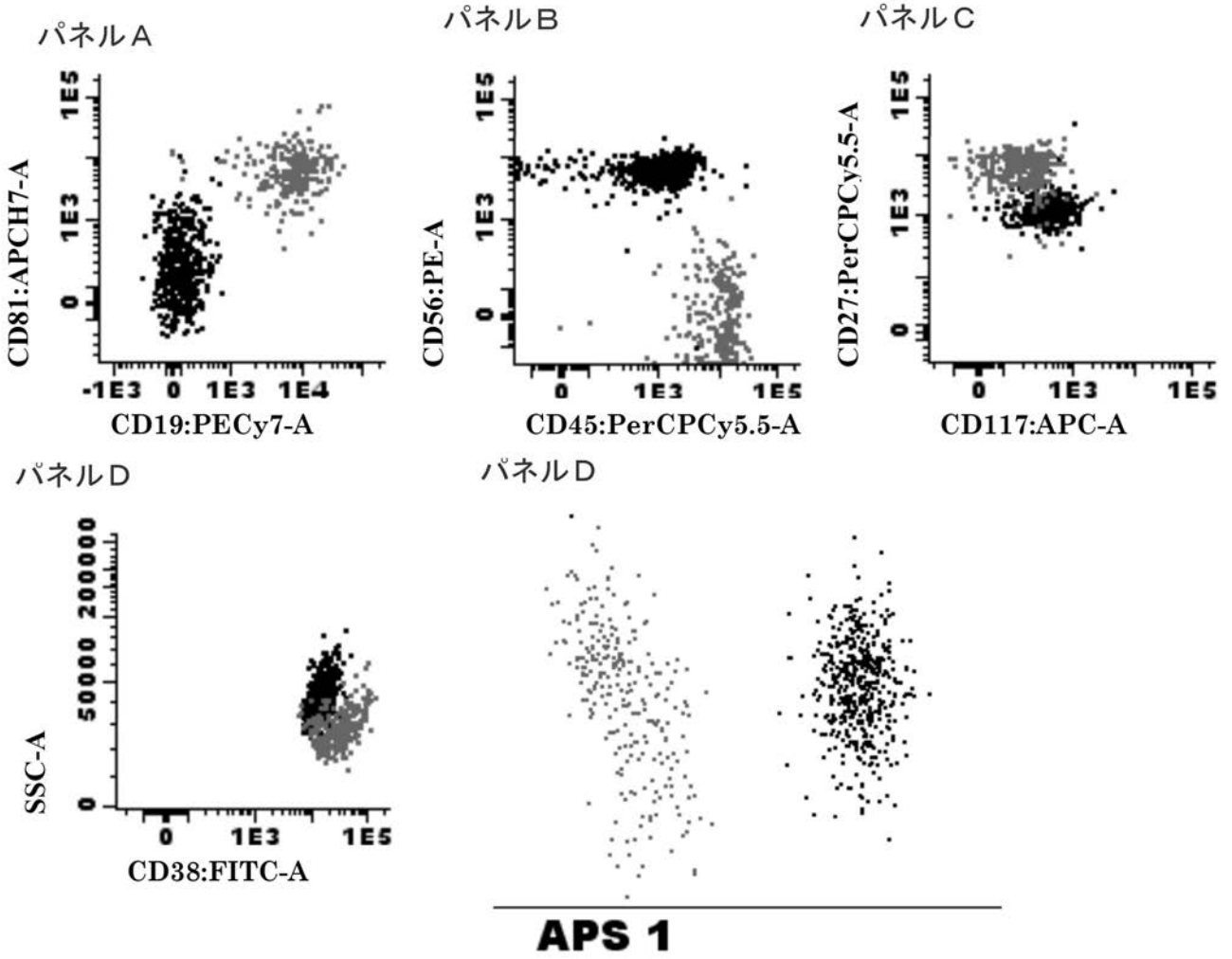
パネルD



【 図 5 】



【 図 6 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/NL2013/050420
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/574 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUCIO P ET AL: "Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: A frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL", LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 13, no. 3, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 419-427, XP002364964, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/SJ/LEU/2401279 abstract page 420, right-hand column; table 1 ----- -/--	1,2, 14-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 September 2013		Date of mailing of the international search report 11/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2013/050420

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRAYLAN R C ET AL: "OPTIMAL NUMBER OF REAGENTS REQUIRED TO EVALUATE HEMATOLYMPHOID NEOPLASIAS: RESULTS OF AN INTERNATIONAL CONSENSUS MEETING", CYTOMETRY, ALAN LISS, NEW YORK, US, vol. 46, no. 1, 15 February 2001 (2001-02-15), pages 23-27, XP009050615, ISSN: 0196-4763, DOI: 10.1002/1097-0320(20010215)46:1<23::AID-CYT01033>3.0.CO;2-Z abstract page 26, left-hand column, paragraph 2; figure 1	1,2
Y	OWAIDAH TAREK M ET AL: "Expression of CD66c and CD25 in acute lymphoblastic leukemia as a predictor of the presence of BCR/ABL rearrangement.", HEMATOLOGY/ONCOLOGY AND STEM CELL THERAPY 2008 JAN-MAR, vol. 1, no. 1, January 2008 (2008-01), pages 34-37, XP009172900, ISSN: 1658-3876 abstract	1-7, 14-16
X	US 2004/224371 A1 (DE MATOS CORREIA E VALLE ALBER [ES] ET AL) 11 November 2004 (2004-11-11) the whole document	1,2, 14-16
Y	POPOV ALEXANDER ET AL: "Immunological Shift On Day 15 of Remission Induction in Children with CD10-Positive B-Cell Precursor ALL Treated by ALL-MB 2008 Protocol", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 114, no. 22, 20 November 2009 (2009-11-20), XP009172816, ISSN: 0006-4971 the whole document	1-7, 14-16
	----- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2013/050420

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VAN DONGEN J J M ET AL: "EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophotyping of normal, reactive and malignant leukocytes", INTERNET CITATION, 4 June 2009 (2009-06-04), pages 1-18, XP002555901, Retrieved from the Internet: URL:http://www.euroflow.org/imagenes/news/euroflow_handout_on_antibody_panels.pdf [retrieved on 2009-11-17] pages 2, 3, 8</p> <p>-----</p>	1-4, 14-16
X	<p>EP 2 259 065 A1 (UNIV ERASMUS MEDICAL CT [NL]) 8 December 2010 (2010-12-08) claims 1-13; table 7</p> <p>-----</p>	1-4, 14-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/NL2013/050420**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-7(completely); 14-16(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/NL2013/050420

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7(completely); 14-16(partially)

Reagent composition for flow cytometric detection of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) comprising a panel of at least eight distinct fluorochrome-conjugated antibodies, the panel comprising at least antibodies against the core markers CD10, CD19, CD20, CD34 and CD45. Diagnostic kit comprising said composition. Multi-color flow cytometric method for detecting minimal residual disease (MRD) in a sample, comprising staining the sample with said reagent composition.

---

2. claims: 8, 9(completely); 14-16(partially)

Reagent composition for flow cytometric detection of chronic lymphocytic leukemia (CLL) comprising a panel of at least eight distinct fluorochrome-conjugated antibodies, the panel comprising at least antibodies against the core markers CD5, CD27, CD79b, CD3, CD200, CD81 and CD19. Diagnostic kit comprising said composition. Multi-color flow cytometric method for detecting minimal residual disease (MRD) in a sample, comprising staining the sample with said reagent composition.

---

3. claims: 10-13(completely); 14-16(partially)

Reagent composition for flow cytometric detection of multiple myeloma (MM) or related plasma cell disorders (PCD) comprising a panel of at least eight distinct fluorochrome-conjugated antibodies, the panel comprising at least antibodies against the core markers CD138, CD38, CD56 and CD19, supplemented with at least four additional markers selected from the group consisting of CD27, CD117, CD81, CD229, CD45, CyIg? and CyIg?. Diagnostic kit comprising said composition. Multi-color flow cytometric method for detecting minimal residual disease (MRD) in a sample, comprising staining the sample with said reagent composition.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2013/050420

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004224371	A1	11-11-2004	NONE
-----			
EP 2259065	A1	08-12-2010	AU 2010254680 A1 12-01-2012
			CA 2764670 A1 09-12-2010
			EP 2259065 A1 08-12-2010
			EP 2438446 A1 11-04-2012
			JP 2012529046 A 15-11-2012
			US 2012165213 A1 28-06-2012
			WO 2010140885 A1 09-12-2010
-----			

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74) 代理人 100134131

弁理士 横井 知理

(74) 代理人 100185258

弁理士 横井 宏理

(72) 発明者 ファン ドンゲン, ヤコブス ヨハネス マリア

オランダ国、3015 ジーイー ロッテルダム、ドクター モルウォータープレイン 50、エ  
ラスムス ユニバーシティ メディカルセンター ロッテルダム内

(72) 発明者 オルファオ デ マトス コレイア エ ヴアレ, ホセ アルベルト

スペイン国、37007 サラマンカ、キャンパス ミゲル デ ウナムーノ、パセオ デ ラ  
ユニベルシダ デ コインブラ 無番地、サラマンカ ユニバーシティ内

(72) 発明者 フロレス モンテロ, ファン アレハンドロ

スペイン国、37007 サラマンカ、キャンパス ミゲル デ ウナムーノ、パセオ デ ラ  
ユニベルシダ デ コインブラ 無番地、サラマンカ ユニバーシティ内

(72) 発明者 アルメイダ パラ, フリア マリア

スペイン国、37007 サラマンカ、キャンパス ミゲル デ ウナムーノ、パセオ デ ラ  
ユニベルシダ デ コインブラ 無番地、サラマンカ ユニバーシティ内

(72) 発明者 ファン デル ヴェルデン, ヴィンセント ヘンリクス ヨハネス

オランダ国、3015 ジーイー ロッテルダム、ドクター モルウォータープレイン 50、エ  
ラスムス ユニバーシティ メディカルセンター ロッテルダム内

(72) 発明者 ベッチャー, セバスチャン

ドイツ国、24105 キール、アーノルト ヘラー シュトラッセ 3, ハウス 11、ユニバ  
ーシティ ホスピタル オブ シュレースヴィヒ - ホルシュタイン内

(72) 発明者 ランゲラック, アントニー ウィレム

オランダ国、3015 ジーイー ロッテルダム、ドクター モルウォータープレイン 50、エ  
ラスムス ユニバーシティ メディカルセンター ロッテルダム内

(72) 発明者 メジストリコヴァ, エスター

チェコ共和国、3015 ジーイー 15006 プラハ 5、ヴィ ウヴァリユ 84、チャー  
ルズ ユニバーシティ内

(72) 発明者 ステパンスキー, トマシュ

ポーランド国、41-800 ザブジェ、ウル. 3 マヤ 13/15、メディカル ユニバーシ  
ティ オブ シレジア内

(72) 発明者 リトゲン, マティアス

ドイツ国、24105 キール、アーノルト ヘラー シュトラッセ 3, ハウス 11、ユニバ  
ーシティ ホスピタル オブ シュレースヴィヒ - ホルシュタイン内

(72) 発明者 モンテイロ ダ シルヴァ ルシオ, パウロ ジョルジ

ポルトガル国、1093 リズボア コデックス、ル. プロフ. リマ バスト、4°アンダー/パ  
ヴィリヤオ デ メディシナ、インスティテュート ポルトゲース デ オンコロジア内

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015521733A5</a>	公开(公告)日	2016-07-21
申请号	JP2015517213	申请日	2013-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	鹿特丹伊拉斯谟大学医疗中心		
申请(专利权)人(译)	伊拉斯姆斯大学医学中心鹿特丹		
[标]发明人	ファンドンゲンヤコブスヨハネスマリア オルファオデマトスコレイアエヴァレホセアルベルト フロレスモンテロファンアレハンドロ アルメイダパラフリアマリア ファンデルヴェルデンヴィンセントヘンリクスヨハネス ベッチャーセバスチャン ラングラックアントニーウィレム メジストリコヴァエスター スチエパンスキートマシュ リトゲンマティアス モンテイロダシルヴァルシオパウロジョルジ		
发明人	ファン ドンゲン, ヤコブス ヨハネス マリア オルファオ デ マトス コレイア エ ヴアレ, ホセ アルベルト フロレス モンテロ, ファン アレハンドロ アルメイダ パラ, フリア マリア ファン デル ヴェルデン, ヴィンセント ヘンリクス ヨハネス ベッチャー, セバスチャン ラングラック, アントニー ウィレム メジストリコヴァ, エスター スチエパンスキー, トマシュ リトゲン, マティアス モンテイロ ダ シルヴァ ルシオ, パウロ ジョルジ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/533		
CPC分类号	G01N15/14 G01N33/57426 G01N33/57484 G01N2015/1006 A61K38/164 A61K38/1716 A61K39/025 A61K39/09		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/53.D G01N33/533		
代理人(译)	横井HiroshiMakoto		
优先权	61/659524 2012-06-14 US		
其他公开文献	JP2015521733A JP6262218B2		

#### 摘要(译)

本发明涉及微小残留病 (MRD) 诊断领域, 其逐渐更多地应用于评估血液恶性肿瘤患者 (例如B细胞前体急性淋巴细胞白血病 (BCP-ALL), B-) 的治疗效果。细胞慢性淋巴细胞白血病 (B-CLL) 和多发性骨髓瘤 (MM)。提供独特的试剂组合物, 经过精心挑选和彻底测试的抗体组合, 用于≥8色流式细胞染色以及10色和12色流式细胞染色, 可达到至少10<sup>-4</sup>的灵敏度, 甚至降至10<sup>-5</sup>。还提供了用于检测MRD的诊断试剂盒和方法。

