

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6524197号
(P6524197)

(45) 発行日 令和1年6月5日(2019.6.5)

(24) 登録日 令和1年5月10日(2019.5.10)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/574 (2006.01) GO 1 N 33/574 D
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Y

請求項の数 8 (全 17 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2017-238962 (P2017-238962) (22) 出願日 平成29年12月13日 (2017.12.13) (62) 分割の表示 特願2015-517213 (P2015-517213) の分割 原出願日 平成25年6月14日 (2013.6.14) (65) 公開番号 特開2018-66752 (P2018-66752A) (43) 公開日 平成30年4月26日 (2018.4.26) 審査請求日 平成29年12月13日 (2017.12.13) (31) 優先権主張番号 61/659,524 (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)</p>	<p>(73) 特許権者 315006920 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 Erasmus University Medical Center Rott erdam 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 Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE Rotterd am The Netherlands (74) 代理人 100101085 弁理士 横井 健至</p>
---	--

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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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 2 つの 8 色試薬組成物を含む診断キットであって、
 以下のものに特異的な蛍光色素結合抗体を含む 8 色試薬組成物 マーカーの組み合わせ：
 (i) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117 および CD81；そして
 (ii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、Cylg 及び Cylg である、診断キット。

【請求項 2】

(1) pacific blue (PacB)、brilliant violet 421 (BV421) または Horizon V450、(2) p
 acific orange (PacO)、Horizon V500 (HV500)、BV510、Khrome orange (KO) または OC51
 5、(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 である蛍光色素の組み合わせを使用す
 る、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

PacB、BV421 または HV450 が結合化されている CD138 に対する抗体；HV500 または PacO が結
 合化された CD27 に対する抗体；FITC 結合の CD38 に対する抗体；PerCPCy5.5 結合の CD45 に対
 する抗体；PECy7 結合の CD19 に対する抗体；APC 結合の、CD117 に対する抗体および Cylg

に対する抗体；そして、APCH7、APCA750またはAPCC750結合の、CD81に対する抗体およびCylg に対する抗体である、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 4】

CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117、CD81、Cylg およびCylg に対して指向された別個の蛍光色素結合抗体を含む、ヒト対象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 10 色試薬組成物。

【請求項 5】

CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117、CD81、Cylg 、Cylg 、CD229およびCD28に対する特異的蛍光色素結合抗体を含む、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 12 色試薬組成物。

10

【請求項 6】

以下の工程からなる、リンパ球である細胞を含む生体試料中の、多発性骨髄腫（MM）または形質細胞疾患（PCD）を検出するための多色フローサイトメトリーの方法：

(i) 請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の 2 つの 8 色MM/PCD試薬組成物または請求項 4 または 5 に記載の試薬組成物で試料を染色し、

(ii) 該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) CD38、CD27、CD45、CD19およびCD81は正常細胞と比較して悪性細胞において低発現し、CD56、CD28およびCD117は正常細胞と比較して悪性細胞において過剰発現し、そしてCylg およびCylg の発現は、悪性細胞中の一方または他方のIg軽鎖に限定されるという、複数のマーカーの発現プロファイルに基づき、正常と悪性の細胞とを区別する。

20

【請求項 7】

工程 (iv) が多変量解析が主成分分析（PCA）を含むものである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

生体試料が末梢血試料または骨髄試料である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

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。

40

【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。

50

【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。

【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、従来の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。

10

【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。

20

【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。

30

【発明の効果】

【0009】

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。

40

【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

50

(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。

【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て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。

10

【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て(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。

20

【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て(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。

30

【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て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、CD81、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。

40

【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)。

50

【 0 0 1 2 】

これらの多色免疫染色は、Van Dongenら , Leukemia 2012; 26: 1908-1075、および、Kalinina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。

【 0 0 1 3 】

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、ファーミングエン、エクスパイオ、サンクイン、インピ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。

【 0 0 1 4 】

フローサイトメトリーによるBCP-ALLにおけるMRDの検出

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：

(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されている；

(iii) CD20、CD45、NuTdT、Smlg、Smlg、Cylgμ、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。

【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

10

20

30

40

50

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 α 、Smlg β 、Cylg μ 、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 α / Smlg β 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）。

10

【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。

20

【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

パネル1A . 本発明の8色BCP-ALL MRDパネルのマーカー構成

30

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	SmIg κ and SmIg λ	CyIg μ	CD19	CD34	CD10

40

【0020】

パネル1B . 本発明の10色のBCP-ALL MRDパネルのマーカー構成

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

【 0 0 2 1 】

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

10

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

【 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「中核となるマーカー」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ー (複数のマーカー) 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、マーカーCD43とCD38との組み合わせで得られた。

20

【 0 0 2 3 】

B-CLLを検出するための好ましいマーカー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

30

【 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：(1) pacific blue (PacB), brilliant violet 421 (BV421)またはHorizon V450、(2) pacific orange (PacO)、Horizon V500 (HV500)、BV510、Khrome orange (K0)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。

40

【 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

50

パネル 2 A . 8 色CLL MRDパネルの構成

BV421	BV510	FITC	PE	PerCPCy5. 5	PECy 7	APC	APCC750
CD27	CD3	CD79b	CD5	CD22	CD19	CD200	CD81
CD5	CD3	CD79b	ROR1	CD27	CD19	CD200	CD81

【 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

【 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

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：

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

【 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、Cylg およびCylg 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、Cylg およびCylg 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：

- (iv) CD45、CD138、CD38、CD56、CD27、CD19、CD117およびCD81

10

20

30

40

50

- (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 。

例として、8色BCP-ALL MRDパネル3Aを参照。

【0032】

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)Cylg およびCylg 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3Bの10色のチューブとパネル3Cの12色のチューブを参照。

10

【0033】

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、Alexa80、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。

20

【0034】

表3：MM/PCDにおけるMRD検出のための代表的な試薬組成物

パネル3A . 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	CyIgk	CyIgA
3	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
4	CD138	CD27	CD38	CD56	CD229	CD19	CyIgk	CyIgA
5	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CyIgk	CyIgA

30

40

【0035】

パネル3B . 10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	CyIgk	CyIgA

【0036】

50

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

【 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（カリナーら, *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：

(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）直交するように、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)、ホテル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）。

【 0 0 3 9 】

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1 A、1 Bまたは1 C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。

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；

(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：

(i) 好ましくは、パネル3A、3Bまたは3C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、非常に強力なものとなったため、各マーカーの(独立した)追加値は、分析の単一の工程で使用される。

【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

10

20

30

40

50

提供する。

【 0 0 4 4 】

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

10

【 0 0 4 5 】

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

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、組み合わせて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 (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。

20

【 0 0 4 6 】

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

40

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。

【 0 0 4 7 】

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

50

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：

10

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

20

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

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、組み合わせで使用することもできることに留意されたい。

30

【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

40

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

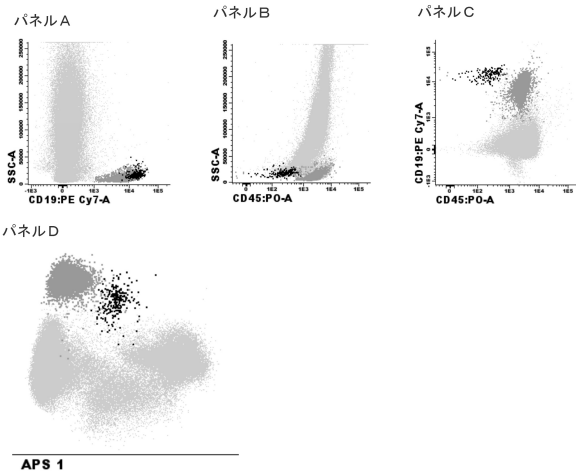
CD117：正常な形質細胞に比べ、悪性形質細胞において高発現

CyIgkおよびCylambda：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/Cylambdaの比は通常は3と0.5の間の範囲）

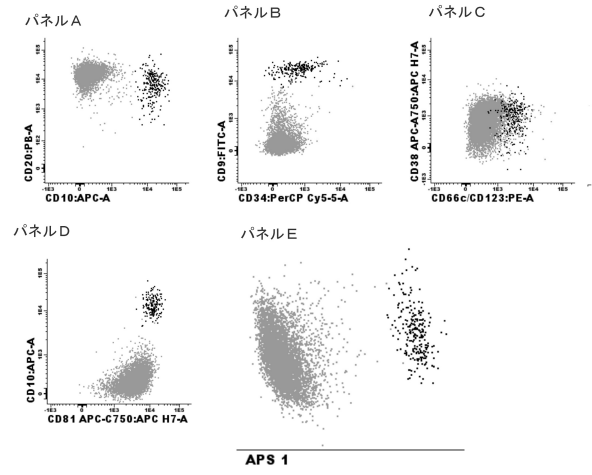
50

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。

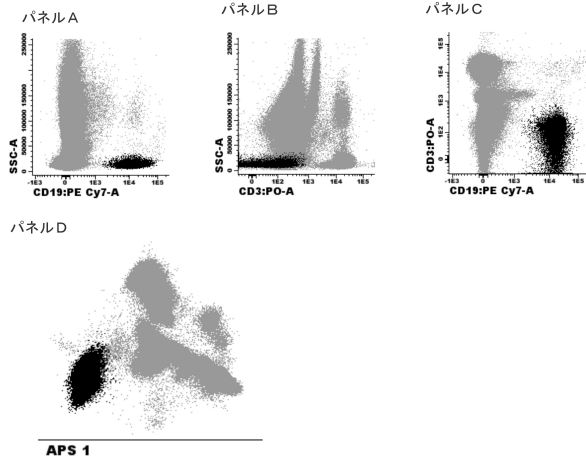
【図 1】



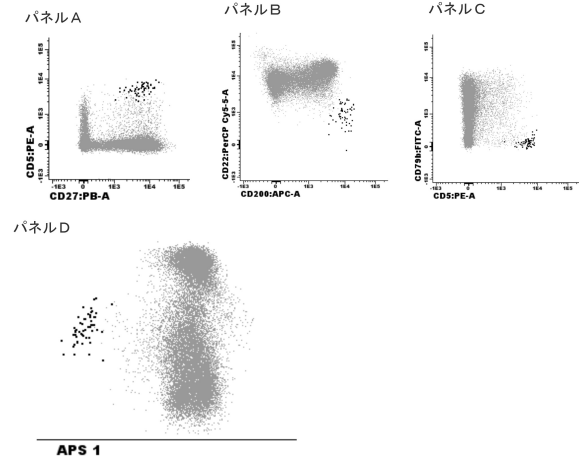
【図 2】



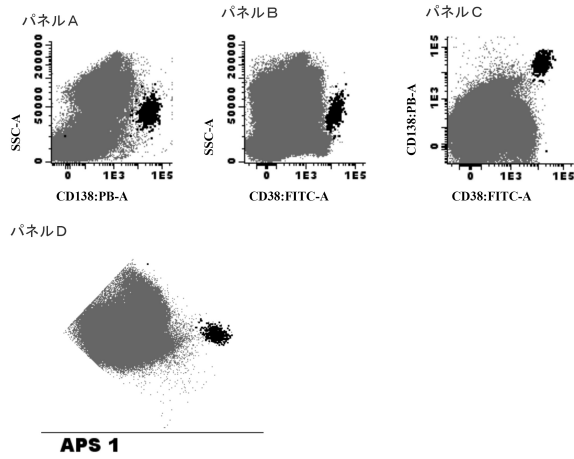
【 図 3 】



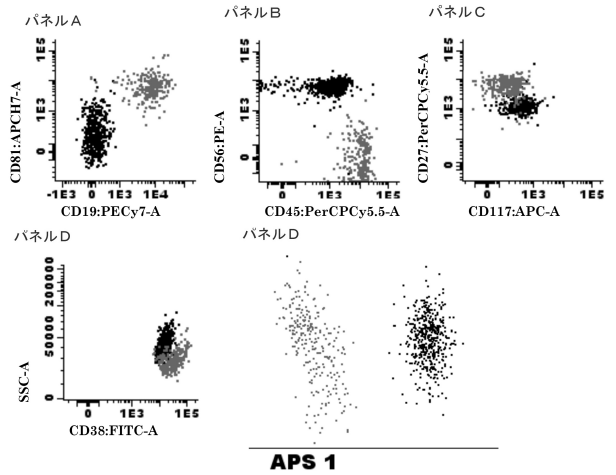
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

- (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 モルウォーターブレイン 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 ヴァレ, 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 モルウォーターブレイン 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 シュレーズヴィヒ - ホルシュタイン内
- (72)発明者 ラングラック, 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 モルウォーターブレイン 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 ブラハ 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 スチェバンスキー, 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 シュレーズヴィヒ - 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°アンダーノバ
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

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 国際公開第2010/140885 (WO, A1)
ELISA CANNIZZO ET AL., The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of multiple myeloma
by flow cytometry, American journal of clinical pathology, 2012年 3月 1日, vol
.137, no.3, PP.377-386
DP Ng et al., Assessing minimal disease in plasma cell neoplasms: a comparison between
multicolor flow cytometry and immunohistochemistry, modern pathology, 2012年 2
月 1日, Vol.25, No.supple.2, P.357A

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	用于检测微小残留病的方法，试剂和试剂盒。		
公开(公告)号	JP6524197B2	公开(公告)日	2019-06-05
申请号	JP2017238962	申请日	2017-12-13
[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		
当前申请(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		
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.D G01N33/53.Y		
代理人(译)	横井HiroshiMakoto		
优先权	61/659524 2012-06-14 US		
其他公开文献	JP2018066752A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供诊断微小残留病（MRD）的诊断试剂盒和发现MRD的方法。一种诊断试剂盒，包括两种八色试剂组合物，用于流式细胞术检测人受试者中的多发性骨髓瘤（MM）或浆细胞病（PCD），该试剂盒特异于：含有特异性荧光染料结合抗体的八种颜色试剂组合物标记物：（i）CD138，CD27，CD38，CD56，CD45，CD19，CD117和CD81；和（ii）CD138，CD27，CD38，CD56，CD45，CD19，Cylgk和Cylgl，诊断试剂盒。【选择图表】无

(5) Int. Cl.	F I	
GO I N 33/574 (2006. 01)	GO I N 33/574	D
GO I N 33/53 (2006. 01)	GO I N 33/53	Y

請求項の数 8 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2017-238962 (P2017-238962)	(73) 特許権者	315006920
(22) 出願日	平成29年12月13日 (2017. 12. 13)		エラスムス ユニバーシティ メディカル
(62) 分割の表示	特願2015-517213 (P2015-517213)		センター ロッテルダム
	の分割		Erasmus University
原出願日	平成25年6月14日 (2013. 6. 14)		Medical Center Rott
(65) 公開番号	特開2018-66752 (P2018-66752A)		erdam
(43) 公開日	平成30年4月26日 (2018. 4. 26)		オランダ国、3015 ジーイー ロッテ
審査請求日	平成29年12月13日 (2017. 12. 13)		ルダム、ドクター モルウォーターブレ
(31) 優先権主張番号	61/659, 524		ン 50
(32) 優先日	平成24年6月14日 (2012. 6. 14)		Dr. Molewaterplein
(33) 優先権主張国	米国 (US)		50, 3015 GE Rott
			erdam The Netherl
		(74) 代理人	100101085
			弁理士 横井 健至

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。