(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104471393 B
(45)授权公告日 2017.07.07

(21)申请号 201380037624.4

(22)申请日 2013.06.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104471393 A

(43)申请公布日 2015.03.25

(30)优先权数据
61/659,524 2012.06.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2013/050420 2013.06.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/187765 EN 2013.12.19

(73)专利权人 鹿特丹伊拉斯姆斯大学医疗中心
地址 荷兰鹿特丹

(72)发明人 雅各布斯·约翰内斯·玛丽亚·万东恩
何塞·阿尔贝托·奥尔方德马托斯克瑞亚埃韦尔
朱安·亚历杭德罗·弗洛雷斯蒙特罗
茱莉亚·玛丽亚·阿尔梅达帕拉
文森特·亨利库斯·约翰内斯·万德费尔登
塞巴斯蒂安·博埃特赫尔
朗托尼·威廉·朗格拉克
埃斯特尔·迈斯特日科娃
托马斯·什切潘斯基
马蒂亚斯·里特根
保罗·约根·蒙泰罗达席尔瓦卢西奥

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
G01N 33/50(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件
CN 102353793 A,2012.02.15,
WO 02073204 A2,2002.09.19,
EP 2259065 A1,2010.12.08,
WO 03085399 A1,2003.10.16,
JJM van Dongen et al..EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes.《Leukemia》.2012,第26卷(第9期),1908-1975.

审查员 胡晓佳

权利要求书2页 说明书11页 附图6页

(54)发明名称

用于检测微小残留病的方法、试剂以及试剂盒

(57)摘要

本发明涉及微小残留病(MRD)诊断领域,其越来越多地应用于评价患有血液恶性肿瘤患者的治疗效力,例如B细胞前体急性淋巴细胞白血病(BCP-ALL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)和多发性骨髓瘤(MM)。所提供的独特试剂组合物具有经仔细选择和彻底测试的抗体组合,对于≥8色流式细胞术染色以及对于10色和12色流式细胞术染色,其可达到至少10^{-4}甚至低至10^{-5}的灵敏度。本发明还提供了诊断试剂盒和用于检测MRD的方法。

CN 104471393 B

1.一种用于对人对象中的B细胞前体ALL进行流式细胞术检测的试剂组合物，其包含至少八种不同的荧光染料缀合抗体的组，所述组至少包含针对核心标志物CD10、CD19、CD20、CD34和CD45的抗体，并且其中所述组还包含选自针对CD38、CD81、CyIgμ和脱氧核苷酸转移酶之抗体的一种或更多种抗体，其中所述组还包含一个或更多个选自以下的抗体集：

(a)针对CD66c和CD123的抗体集；

(b)针对CD304和CD73的抗体集；以及

(c)针对SmIgκ和SmIgλ的抗体集，

其中每一个集内的抗体与相同的荧光染料缀合并且其中在不同的集之间所述荧光染料是不同的。

2.根据权利要求1所述的试剂组合物，其中所述组还包含两个或更多个选自以下的抗体集：

(a)针对CD66c和CD123的抗体集；

(b)针对CD304和CD73的抗体集；以及

(c)针对SmIgκ和SmIgλ的抗体集。

3.根据权利要求1或2所述的试剂组合物，其包含针对以下标志物组合之一的不同的荧光染料缀合抗体：

(i)CD20、CD45、CD81、CD66c、CD123、CD34、CD19、CD10和CD38，其中使针对CD66c和CD123的抗体与相同的荧光染料缀合；

(ii)CD20、CD45、CD81、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10和CD38，其中使针对CD304和CD73的抗体与相同的荧光染料缀合；

(iii)CD20、CD45、NuTdT、SmIgκ、SmIgλ、CyIgμ、CD19、CD34和CD10，其中使针对SmIgκ和SmIgλ的抗体与相同的荧光染料缀合。

4.根据权利要求1所述的试剂组合物，其包含针对标志物CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10和CD38的不同的荧光染料缀合抗体。

5.根据权利要求1所述的试剂组合物，其包含针对标志物CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、SmIgκ、SmIgλ、CyIgμ、CD34、CD19、CD10和CD38的不同的荧光染料缀合抗体。

6.一种用于对微小残留病进行流式细胞术检测的诊断试剂盒，其包含根据权利要求1至5中任一项所述的至少一种试剂组合物。

7.根据权利要求6所述的诊断试剂盒，其还包含使用说明书、缓冲剂和/或对照样品。

8.根据权利要求1至5中任一项所述的试剂组合物在制备用于检测含有细胞的生物样品中微小残留病的多色流式细胞术之试剂盒中的用途，所述检测包括以下步骤：

(i)用根据权利要求1至5中任一项所述的试剂组合物对样品进行染色，

(ii)对所述样品进行流式细胞术；

(iii)就由存在于所述试剂组合物中的抗体所检测的选定标志物的表达，对细胞设门；以及

(iv)基于所述多个标志物的表达谱来区分正常细胞和恶性细胞。

9.根据权利要求8所述的用途，其中步骤(iv)包括多变量分析。

10.根据权利要求8所述的用途，其中所述细胞为淋巴细胞。

11.根据权利要求8所述的用途,其中步骤(iv)包括主成分分析。

用于检测微小残留病的方法、试剂以及试剂盒

[0001] 本发明涉及癌症诊断领域，更特别地涉及用于在治疗期间和治疗后监测疾病发展或者用于检测微小播散性疾病的手段和方法。抑制细胞治疗或细胞毒剂治疗诱导大多数患有淋巴样恶性肿瘤患者中的缓解。然而，这些患者中的许多都会复发。显然，虽然根据细胞形态学标准它们达到了所谓的完全缓解，但是现有的抑制细胞治疗或细胞毒剂治疗方案不能杀伤这些复发患者中的所有恶性细胞。因为细胞形态学技术的检出限不低于1％至5％恶性细胞，所以显然该技术仅可提供关于治疗效力的表面信息，仍有多达10^{10}的肿瘤细胞潜在地留在体内。

[0002] 需要灵敏度更高的技术来检测“微小残留病(minimal residual disease)”或微小疾病(MRD)以获得对诱导治疗期间肿瘤块的减少以及维持治疗期间从一种或多于一种组织中进一步根除恶性细胞的更好理解。应用流式细胞术检测MRD通常基于经由与恶性肿瘤相关的表型特征来区别恶性细胞与正常白细胞，例如抗原的异常表达、过表达和跨系表达。

[0003] 现有的4色和6色流式细胞术在多数患有血液恶性肿瘤(hematological malignancy)的患者中达到了10^{-3}(至10^{-4})的良好灵敏度。然而，应注意在治疗期间和治疗后以及在造血干细胞移植后，高频正常再生细胞可妨碍血液、骨髓和其他体液(例如脑脊髓液)中低频恶性细胞的检测。每种治疗方案、每个治疗阶段、每段取样时间的再生的程度和模式存在差异，并且似乎取决于先前治疗的强度：治疗的强度越大，造血细胞的再生越显著。

[0004] 逻辑上，再生细胞的背景和药物诱导的免疫表型偏移两者均降低了现有4色和6色流式细胞术MRD方法的灵敏性和特异性。这主要导致了以下方法：其中使用多种标志物的组合来评价患者的MRD或者另外使用一种或数种患者特异性的标志物组合。认识到需要改进MRD的诊断方法，本发明人着手于鉴定可用来获得用于检测MRD的更灵敏和更可靠测定的另外的标志物，特别地基于其中经由多变量分析来组合多个标志物信息的完全整合方法。此外，该新方法不再限于个别患者，而是适用于特定疾病类别的每个患者，例如B细胞前体急性淋巴细胞白血病(B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia，BCP-ALL)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-cell chronic lymphocytic leukemia，B-CLL)和多发性骨髓瘤(multiple myeloma，MM)。

[0005] 在仔细地选择相关标志物后，设计多色管中抗体的适当组合并且选择合适的荧光染料(基于对亮度、补偿、稳定性等的需要)来开发抗体试剂集(set)。为了重塑(reshape)并实现最佳功效，采用共有组(consensus panel)的广泛多中心评价(extensive multicentric evaluation)对研究进行补充。本发明人仔细地选择并且彻底地测试抗体组合，设计了可达到10^{-4}至10^{-5}灵敏度的新的≥8色染色。基于设计-测试-再设计-再测试-再设计(等)，已经开发了针对每种疾病类别(例如BCP-ALL、B-CLL和MM)之荧光染料缀合抗体的特异性组合。每位患者的一种或两种≥8色组合将允许以至少10^{-4}的灵敏度仔细地进行MRD监测。所提供的10色和12色抗体组合甚至可更好地区别正常细胞和其恶性对应物，由此使得MRD检测的灵敏度能够低至10^{-5}。

[0006] 我们在此提供了新的8色、10色和12色抗体组合，其用于检测从患有以下疾病的患

者所分离样品(例如,血液或骨髓)中的MRD:

[0007] -B细胞前体急性淋巴细胞白血病(BCP-ALL)

[0008] -B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)或者

[0009] -多发性骨髓瘤(MM)和相关的浆细胞病(plasma cell disorder,PCD)。

[0010] 这些多色免疫染色可根据如Van Dongen等Leukemia 2012;26:1908-1075和由Kalina等Leukemia 2012;26:1986-2010所述的所谓的EuroFlow方案进行。

[0011] 因此,本发明提供了用于对MRD进行流式细胞术检测的独特试剂组合物,其包含至少八种不同的荧光染料缀合抗体的组合。特别地,所述试剂组合物用于检测患有BCP-ALL、B-CLL或MM/PCD患者的MRD。在一个优选实施方案中,所述组合物包含针对给定CD抗原的单克隆抗体。CD代表簇命名并且是用于鉴定由单克隆抗体限定的特定细胞表面抗原或细胞内抗原的术语。针对所指定标志物的(单克隆)抗体可购自许多公司,包括Becton/Dickinson(BD)Biosciences、Dako、Beckman Coulter,CYTOGNOS、Caltag、Pharmingen、Exbio、Sanquin、Invitrogen等。

[0012] 流式细胞术MRD检测BCP-ALL

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供了用于对人对象中的BCP-ALL细胞进行流式细胞术检测的试剂组合物,其包含至少八种不同的荧光染料缀合抗体的组。BCP-ALL组包含针对四种"核心标志物"CD10、CD19、CD20、CD34和CD45的抗体。优选地,所述组还包含选自针对CD38、CD81、CyIgμ和脱氧核苷酸转移酶(NuTdT)之抗体的一种或更多种抗体。如果所述组还包含一个或更多个选自以下的抗体集,则会获得非常好的结果:(a)针对CD66c和CD123的抗体集;(b)针对CD304和CD73的抗体集;以及(c)针对SmIgκ和SmIgλ的抗体集,其中使每一个集内的抗体与相同的荧光染料缀合。在一个特定方面中,所述BCP-ALL组包含针对CD10、CD19、CD20、CD34、CD45的抗体,选自针对CD38、CD81、CyIgμ、NuTdT之抗体的一种或更多种抗体以及选自以下的两个或更多个抗体集:(a)针对CD66c和CD123的抗体集;(b)针对CD304和CD73的抗体集;以及(c)针对SmIgκ和SmIgλ的抗体集,其中使每一个集内的抗体与相同的荧光染料缀合。

[0014] 例如,试剂组合物包含针对以下标志物组合之一的不同的荧光染料缀合抗体:

[0015] (i)CD20、CD45、CD81、CD66c、CD123、CD34、CD19、CD10和CD38,其中使针对CD66c和CD123的抗体与相同的荧光染料缀合;

[0016] (ii)CD20、CD45、CD81、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10和CD38,其中使针对CD304和CD73的抗体与相同的荧光染料缀合;

[0017] (iii)CD20、CD45、NuTdT、SmIgκ、SmIgλ、CyIgμ、CD19、CD34和CD10,其中使针对SmIgκ和SmIgλ的抗体与相同的荧光染料缀合。例如参见图1A的8色BCP-ALL MRD。

[0018] 作为另一个实例,其包含针对标志物CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD34、CD19、CD10和CD38的不同的荧光染料缀合抗体,以及选自以下的一个或更多个抗体集:(a)针对CD66c和CD123的抗体集;(b)针对CD304和CD73的抗体集;以及(c)针对SmIgκ和SmIgλ的抗体集,其中使每一个集内的抗体与相同的荧光染料缀合。例如参见图1B的10色管,其包含针对标志物CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10和CD38的抗体。

[0019] 在另一个特定方面中,所述组合物包含针对标志物CD20、CD45、CD81、NuTdT、CD66c、CD123、CD304、CD73、SmIgκ、SmIgλ、CyIgμ、CD34、CD19、CD10和CD38的荧光染料缀合抗

体的组合，其中使针对CD66c/CD123、CD304/CD73和SmIgκ/SmIgλ中每一个集的抗体与相同的荧光染料缀合。例如参见图1C的12色管。

[0020] 本发明所用的用来缀合针对所述标志物之抗体的适当荧光染料在本领域中是已知的。应当理解，试剂组合物内所用的荧光染料应当通过流式细胞术来彼此区分。针对亮度、有限的光谱重叠和有限的补偿需求、稳定性等来优先选择荧光染料(参见:Kalina等Leukemia 2012:26:1986-2010)。

[0021] 以下的荧光染料的组特别用于根据本发明的BCP-ALL试剂组合物:(1)pacific blue(PacB),brilliant violet 421(BV421)或Horizon V450,(2)pacific orange(PacO)、Horizon V500(HV500)、BV510、Khrome orange(KO)或OC515,(3)异硫氰酸荧光素(FITC)或Alexa488,(4)藻红蛋白(PE),(5)多甲藻素叶绿素蛋白/花菁5.5(PerCP-Cy5.5),PerCP或PE-TexasRed,(6)藻红蛋白/花菁7(PE-Cy7),(7)别藻蓝蛋白(APC)或Alexa647,以及(8)别藻蓝蛋白/hilite 7(APC-H7)、APC-Cy7、Alexa680、APC-A750、APC-C750或Alexa700。在多轮测试之后，本发明人观察到如果选择以下的荧光染料，则可获得非常好的结果:Pacific Blue、brilliant violet 421或Horizon V450、PacO或Horizon V500、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC和APC-H7或APC-A750或APC-C750。在一个特定方面中，本发明提供了在表1、图1A、图1B或图1C中示出的试剂组合物。

[0022] 表1用于BCP-ALL MRD检测的示例性试剂组合物

[0023] 图1A本发明8色BCP-ALL MRD组的标志物组合物

[0024]

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

[0025] 图1B本发明10色BCP-ALL MRD组的标志物组合物

[0026]

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

[0027] 图1C本发明12色BCP-ALL MRD组的标志物组合物

[0028]

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

[0029] 流式细胞术MRD检测B-CLL

[0030] 在另一个实施方案中，本发明提供了用于对人对象中的B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)进行流式细胞术检测的试剂组合物，其包含至少八种不同的荧光染料缀合抗体的组，所述组至少包含针对七种“核心标志物”CD5、CD27、CD79b、CD3、CD200、CD81和CD19的抗体。已经发现可将CD22和/或受体酪氨酸激酶样孤儿受体(ROR1)用作有价值的另外的标志物。与标志物CD43和CD38组合获得了非常好的结果。

[0031] 一些用于检测B-CLL的优选标志物组合如下：

[0032] (a)CD27、CD3、CD79b、CD5、CD22、CD19、CD200和CD81

[0033] (b)CD5、CD3、CD79b、ROR1、CD27、CD19、CD200和CD81

[0034] (c)CD27、CD3、CD79b、ROR1、CD5、CD22、CD19、CD20、CD200和CD81

[0035] (d)CD27、CD3、CD79b、ROR1、CD5、CD22、CD19、CD20、CD200、CD43、CD81和CD38。

[0036] 以下的荧光染料的组特别用于根据本发明的CLL试剂组合物：(1)pacific blue(PacB)、brilliant violet 421(BV421)或Horizon V450，(2)pacific orange(PacO)、Horizon V500(HV500)、BV510、Khrome orange(KO)或OC515，(3)异硫氰酸荧光素(FITC)或Alexa488，(4)藻红蛋白(PE)，(5)多甲藻素叶绿素蛋白/花菁5.5(PerCP-Cy5.5)、PerCP或PE-TexasRed，(6)藻红蛋白/花菁7(PE-Cy7)，(7)别藻蓝蛋白(APC)或Alexa647，以及(8)别藻蓝蛋白/hilite 7(APC-H7)、APC-Cy7、Alexa680、APC-A750、APC-C750或Alexa700。在多轮测试之后，本发明人观察到如果选择以下的荧光染料，则可获得非常好的结果：Pacific Blue、brilliant violet 421或Horizon V450、PacO或Horizon V500、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC和APC-H7或APC-A750或APC-C750。

[0037] 在一个特定方面中，本发明提供了在表2中示出的试剂组合物。

[0038] 表2用于B-CLL MRD检测的示例性试剂组合物

[0039] 图2A 8色CLL MRD组的组合物

[0040]

	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

[0041] 图2B 10色CLL MRD管的组合物

[0042]

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

[0043] 图2C 12色CLL MRD管的组合物

[0044]

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

[0045] 流式细胞术MRD检测多发性骨髓瘤/浆细胞病(MM/PCD)

[0046] 本发明的又一个方面涉及用于检测MM或PCD细胞的试剂组合物。所述组包含针对四种“核心标志物”CD138、CD38、CD56和CD19的抗体，其补充有选自CD27、CD117、CD81、CD229、CD45、CyIgκ和CyIgλ的至少四种另外的标志物。CD45是优选的第五标志物，优选与CD27、CD117和CD81或CD229、CyIgκ和CyIgλ组合。

[0047] 所提供的是具有针对任一以下标志物组的不同的荧光染料缀合抗体的试剂组合物：

[0048] (n) CD45 CD138 CD38 CD56 CD27 CD19 CD117 CD81

[0049] (o) CD45 CD138 CD38 CD56 CD229 CD19 CyIgκ CyIgλ

[0050] (p) CD138 CD27 CD38 CD56 CD45 CD19 CD117 CD81

[0051] (q) CD138 CD27 CD38 CD56 CD229 CD19 CyIgκ CyIgλ

[0052] (r) CD138 CD27 CD38 CD56 CD45 CD19 CyIgκ CyIgλ

[0053] 例如，所提供的试剂组合物用于对人对象中的MM或PCD进行流式细胞术检测，其包含至少八种不同的荧光染料缀合抗体的组，所述组至少包含针对核心标志物CD138、CD38、CD56和CD19的抗体，其补充有选自CD27、CD117、CD81、CD229、CD45、CyIgκ和CyIgλ的至少四种另外的标志物。优选地，CD45是第五标志物，更优选与标志物CD27、CD117和CD81组合，或与标志物CD229、CyIgκ和CyIgλ组合。优选的试剂组合物包含针对以下标志物的组合之一的不同的荧光染料缀合抗体：

[0054] (iv) CD45、CD138、CD38、CD56、CD27、CD19、CD117和CD81

[0055] (v) CD45、CD138、CD38、CD56、CD229、CD19、CyIgκ和CyIgλ

[0056] (vi) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117和CD81

[0057] (vii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD229、CD19、CyIgκ和CyIgλ

[0058] (viii) CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CyIgκ和CyIgλ例如参见图3A的8色PCD MRD。

[0059] 使用针对标志物CD138、CD27、CD38、CD56、CD45、CD19、CD117、CD81的荧光染料缀合抗体和选自以下的一个或两个抗体集，获得了非常好的结果：(a)针对CD229和CD28的抗体集；以及(b)针对CyIgκ和CyIgλ的抗体集。例如参见图3B的10色管和图3C的12色管。

[0060] 以下荧光染料的组特别用于根据本发明的MM/PCD试剂组合物：(1) pacific blue (PacB)、brilliant violet421 (BV421)或Horizon V450，(2) pacific orange (PacO)、Horizon V500 (HV500)、BV510、Khrome orange (KO)或OC515，(3)异硫氰酸荧光素(FITC)或Alexa488，(4)藻红蛋白(PE)，(5)多甲藻素叶绿素蛋白/花菁5.5 (PerCP-Cy5.5)、PerCP或PE-TexasRed，(6)藻红蛋白/花菁7 (PE-Cy7)，(7)别藻蓝蛋白(APC)或Alexa647，以及(8)别藻蓝蛋白/hilite 7 (APC-H7)、APC-Cy7、Alexa680、APC-A750、APC-C750或Alexa700。在多轮测试之后，本发明人观察到如果选择以下的荧光染料，则可获得非常好的结果：Pacific

Blue、brilliant violet 421或Horizon V450、PacO或Horizon V500、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC和APC-H7或APC-A750或APC-C750。

[0061] 表3用于MRD检测MM/PCD的示例性试剂组合物

[0062] 图3A PCD MRD组的组合物

[0063]

管	PacB或BV421或HV450	HV500或PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7或APCA750或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

[0064] 图3B 10色PCD MRD组的组合物

[0065]

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

[0066] 图3C 12色PCD MRD管的组合物

[0067]

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

[0068] 本发明的又一个方面涉及用于检测MRD(特别是BCP-ALL MRD、CLL MRD或MM/PCD MRD)的诊断试剂盒,其包含上文所述的一种或更多种试剂组合物,任选地带有使用说明书、缓冲剂和/或对照样品(参见:Kalina等Leukemia 2012:26:1986-2010)。在一个实施方案中,提供了包含一种或更多种表1的试剂组合物的BCP-ALL试剂盒。在另一个实施方案中,提供了包含一种或更多种表2的试剂组合物的CLL试剂盒。在又一个实施方案中,提供了包含一种或更多种表3的试剂组合物的PCD试剂盒。

[0069] 本发明还涉及用于对MRD进行流式细胞术检测的方法,其包括提供来自人对象的生物样品以及使至少部分(等分试样)样品与本文所提供的试剂组合物相接触的步骤。可直接使用,或在无核红细胞裂解之后或在密度离心之后或在细胞分选过程之后使用任意类型的已知含有白细胞的样品或疑似含有白细胞的样品。例如,所述样品是外周血、骨髓、组织样品(例如淋巴结、腺样、脾或肝)或者其他类型的体液(例如脑脊髓液、玻璃体液、滑液、胸腔积液或腹水)。优选外周血或骨髓。

[0070] 所提供的多色流式细胞术方法用于检测含有细胞(优选B谱系细胞(B细胞前体、B淋巴细胞和浆细胞))之生物样品中的微小残留病(MRD),其包括以下步骤:

[0071] (i)用根据本发明的试剂组合物对样品进行染色,

[0072] (ii)对所述样品进行流式细胞术;(iii)就存在于所述试剂组合物中的抗体所检测的选定标志物的表达,对细胞设门(gating);(iv)基于多个标志物的表达谱来区分正常细胞和恶性细胞。

[0073] 优选地,步骤(iv)的分析包括多变量分析,优选主成分分析(principal component analysis,PCA),其中各标志物在经由主成分分析的区分过程中具有增加值。有利地,使用自动群体分离(automated population separation)-APS图,其采用例如Infinicyt软件或多维尺度(multidimensional scaling,MDS)分析。

[0074] PCA是使用正交变换来将观测的可能相关变量集转换为称为主成分的不相关变量之值的集的数学过程。主成分的数目小于或等于原始变量的数目。该转换以这样的方式定义:第一主成分具有尽可能高的方差(即,说明数据的可变性尽可能大),并且在其与之前成分正交(与之不相关)的约束下,各后续成分继而可能具有最高方差。如果数据集共同为正态分布,则应确保主成分是独立的。PCA对于原始变量的相对尺度是敏感的。根据应用领域,其也被称为离散Karhunen-Loève变换(KLT)、Hotelling变换或本征正交分解(proper orthogonal decomposition,POD)。作为PCA的替代,可使用MDS或任意其他类型的广泛接受的多变量分析(参见:Pedreira等Trends Biotechnol 2013)。

[0075] 在一个实施方案中,提供了多色流式细胞术方法用于检测含有淋巴细胞之生物样品中的微小残留病(MRD),其中MRD是BCP-ALL,其包括以下步骤:

[0076] (i)用根据本发明的BCP-ALL试剂组合物对样品进行染色,优选地,组合物选自图1A、1B或1C中的任意一种;(ii)对所述样品进行流式细胞术;(iii)就存在于所述试剂组合物中的抗体所检测之标志物的表达,对成熟B细胞和BCP细胞设门;(iv)基于多个标志物的应用来区分正常BCP细胞和恶性BCP细胞,各标志物在经由主成分分析的区分过程中具有增加值。实例参见用于示例性分析的实施例1以及图1和图2,使得能够检测BCP-ALL患者中的MRD。

[0077] 在另一个实施方案中,提供了用于检测含有淋巴细胞之生物样品中的微小残留病(MRD)的多色流式细胞术方法,其中MRD是CLL,所述方法包括以下步骤:

[0078] (i)用根据本发明的CLL试剂组合物对样品进行染色,优选地,组合物选自图2A、2B或2C中的任意一种;(ii)对所述样品进行流式细胞术;(iii)就存在于所述试剂组合物中的抗体所检测之标志物的表达,对B淋巴细胞设门;(iv)基于多个标志物的应用来区分正常B细胞和恶性B细胞,各标志物在经由主成分分析的区分过程中具有增加值。

[0079] 实例参见用于示例性分析的实施例2以及图3和图4,使得能够检测CLL患者中的MRD。

[0080] 在又一个实施方案中,提供了用于检测含有淋巴细胞之生物样品中的微小残留病(MRD)的多色流式细胞术方法,其中MRD是MM/PCD,所述方法包括以下步骤:

[0081] (i)用根据本发明的MM/PCD试剂组合物对样品进行染色,优选地,组合物选自图3A、3B或3C中的任意一种;(ii)对所述样品进行流式细胞术;(iii)就存在于所述试剂组合物中的抗体所检测之标志物的表达,对浆细胞设门;(iv)基于多个标志物的应用来区分正

常浆细胞和恶性浆细胞，各标志物在经由主成分分析的区分过程中具有增加值。

[0082] 实例参见用于示例性分析的实施例3以及图5以及图6，使得能够检测MM/PCD患者中的MRD。

附图说明

[0083] 图1如何将CD19和CD45鉴定标志物与SSC组合使用(图A至图C)以区分来自治疗期间BCP-ALL患者之骨髓样品中的BCP细胞与其他有核细胞的典型实例。在各个图中，浅灰色事件对应于样品中的非B细胞，而深灰色事件是成熟B细胞且黑色事件是BCP细胞。在主成分1与主成分2的多变量分析表示(APS1)(图D)中，成熟B细胞和BCP细胞两者均基于所有信息参数(例如CD19、CD45、SSC)明显与所有其他事件相分离。

[0084] 图2如何将免疫表型特征标志物CD10、CD20、CD34、CD66c/CD123和CD38与SSC组合使用以区分来自治疗期间BCP-ALL患者之骨髓样品中的BCP-ALL细胞与正常残留B细胞的说明性实施例(图A至图D)。在如图1所述的设门/选择之后，仅显示了骨髓B细胞。在各个图中，黑点对应于样品中的BCP-ALL细胞，而灰点是正常B细胞。与正常B细胞相比，BCP-ALL细胞表现出CD81(图D)、CD10(图A和图D)和CD66c/CD123(图C)的过表达。在基于所有免疫表型标志物和所评价的散射特征的APS1(主成分1与主成分2)表示(图E)中，正常残留B细胞(灰色)明显区别于BCP-ALL细胞(黑色)。

[0085] 图3如何将CD19和CD3鉴定标志物与SSC组合使用(图A至图C)以区分来自CLL患者之外周血样品中的成熟B细胞与其他有核细胞的说明性实例。在各个图中，灰色事件对应于样品中的非B细胞，而黑色事件全都是外周血B细胞。在主成分1与主成分2的多变量分析表示(APS1)(图D)中，B细胞基于所有信息参数(例如CD19、CD3、SSC)明显与所有其他事件相分离。

[0086] 图4如何使用免疫表型特征标志物CD27、CD5、CD22、CD200和CD79b(图A至图C)以区分来自CLL患者之外周血样品中的CLL细胞与正常成熟B细胞的说明性实例。在如图3所述的设门/选择之后，仅显示了外周血B细胞。在各个图中，黑点对应于样品中的CLL细胞，而灰点是正常的外周血B细胞。与正常B细胞相比，CLL细胞表现出CD22(图B)和CD79b(图C)的表达不足以及CD200(图B)和CD5(图A和图C)的过表达。在基于所有免疫表型标志物和所评价的散射特征的APS1(主成分1与主成分2)表示(图D)中，CLL细胞明显区别于正常B细胞，然而基于个别标志物不能达到该区别程度。

[0087] 图5如何将CD38和CD138鉴定标志物与SSC组合使用以区分来自治疗后MM患者之骨髓样品中的浆细胞和其他有核细胞的说明性实例(图A至图C)。在各个图中，灰点对应于样品中的非浆细胞，而黑点全都是骨髓浆细胞。在主成分1与主成分2的多变量分析表示(APS1)(图D)中，浆细胞(黑点)基于所有信息参数(例如CD138、CD38、SSC)明显与所有其他事件(灰点)相分离。

[0088] 图6如何将免疫表型特征标志物CD81、CD19、CD45、CD56、CD27、CD117和CD38与SSC组合使用以区分来自治疗后MM患者之骨髓样品中的骨髓瘤/恶性浆细胞与正常残留浆细胞的说明性实例(图A至图D)。在如图5所述的设门/选择之后，仅显示了骨髓浆细胞。在各个图中，黑点对应于样品中的骨髓瘤/克隆浆细胞，而灰点是正常残留的骨髓浆细胞。与正常浆细胞相比，骨髓瘤/克隆浆细胞表现出CD81、CD19，CD45、CD27和CD38的表达不足和更高的

SSC以及CD56和CD117的过表达。在基于所有免疫表型标志物和所评价的散射特征的APS1(主成分1与主成分2)表示(图E)中,正常残留浆细胞(灰点)明显区别于骨髓瘤/恶性浆细胞(黑点),然而基于个别标志物不能达到该区别程度。

[0089] 实验部分

[0090] 本文所公开的EuroFlow方法的能力(power)基于标志物集的组合与多变量分析的使用,以用于鉴定正常细胞(例如,正常前体B细胞、正常B淋巴细胞和正常浆细胞)以及区分正常/反应性细胞与克隆/恶性细胞这两者。为此,根据组合中各标志物与所有其他标志物相比的贡献,进行单个标志物贡献的强大的多变量分析而进行组中各标志物的包含和排除。使用这样的策略来评价多轮顺序实验测试中最具鉴别力之标志物的所选组合。由于该最终建议的抗体组合在与主成分分析(特别是与Infinicyt软件的自动群体分离(APS)工具)组合使用时变得非常强,因此使得各标志物的增加(独立)值用在单步骤分析中。

[0091] 因此我们提供了对患有BCP-ALL(实施例1)、CLL(实施例2)和多发性骨髓瘤(实施例3)患者的血液和骨髓中MRD检测的大量实验性研究结果的总结。

[0092] 在以下实施例中,在BCP-ALL、CLL和MM/PCD的情况下,标志物的列表是与这些标志物最常见的表型畸变一起提供的。然而,应注意如实施例1至3的图中的主成分分析清楚可见,正常细胞和恶性细胞之间的实际区别能力基于相应n维空间中的标志物组合。事实上,数个标志物的轻微差异加合为主成分分析的较大差异。因此,本发明并非关于MRD检测的单一标志物研究,而是关于仔细选择的标志物集的研究,这使得能够极好地区分正常细胞和其恶性对应物,例如正常BCP细胞与BCP-ALL胚细胞,正常B淋巴细胞与B-CLL细胞以及正常浆细胞与MM/PCD浆细胞。

[0093] 实施例1.用于BCP-ALL患者中MRD检测的抗体组和诊断方法

[0094] 用于鉴定骨髓中总B细胞和B细胞前体的标志物

[0095] 相关鉴定标志物的列表:CD19、CD45

[0096] 如何使用它们:使用CD19标志物来预设门对于鉴定纯B细胞群是必要的。为了集中于正常B细胞前体(BCP),可使用CD45阴性或弱阳性来区分CD45阳性成熟B细胞与BCP。在针对CD19治疗的情况下,可用CD22代替CD19。还可将这些标志物与侧向光散射(SSC)或前向光散射(FSC)或者FSC和SSC两者组合使用来鉴定外周血或骨髓或其他类型样品(例如骨髓、组织活检、脊髓液)中的B细胞。值得注意的是,用于区分正常BCP细胞与BCP-ALL细胞的另一些标志物(如CD10、CD20、CD38和CD34)(见下文)还可有助于总BCP细胞群的设门(例如CD34+、CD10+、CD20-至不显著(dim)、CD38+)。

[0097] 用于区分正常与恶性B细胞前体细胞的标志物

[0098] 标志物和最常见的表型畸变的列表:

[0099] CD38:相对于正常B细胞前体细胞,在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中表达不足

[0100] CD10:在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中过表达或表达不足

[0101] CD45:相对于正常B细胞前体细胞,在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中表达不足(通常为阴性)

[0102] CD20:相对于正常B细胞前体细胞,在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中表达不足或过表达

[0103] CD81:相对于正常B细胞前体细胞,在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中过表达或表

达不足

[0104] CD66c：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞(特别是BCR-ABL阳性ALL；通常在TEL-AML1-阳性或MLL-AF4-阳性ALL中为阴性)中过表达

[0105] CD123：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞(尤其是超二倍体ALL)中过表达

[0106] CD304：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中过表达

[0107] CD73：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中过表达

[0108] CD34：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中表达不足或过表达

[0109] SSC：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中增大或减小强度。

[0110] FSC：相对于正常B细胞前体细胞，在BCP-ALL/恶性B细胞前体细胞中增大或减小强度。

[0111] 实施例2.用于CLL患者中MRD检测的抗体组和诊断方法

[0112] 用于鉴定外周血和骨髓中总B细胞的标志物：

[0113] 识别标志物的列表：CD19、CD3(排除标志物)

[0114] 如何使用它们：使用该标志物组合来预设门对于鉴定纯B细胞群以及移除T细胞/B细胞双联体是必要的。还可将这些标志物与侧向光散射(SSC)或前向光散射(FSC)或者FSC和SSC两者组合使用来鉴定外周血或骨髓或其他类型的样品(例如组织活检、脊髓液)中的B细胞。对于更好地富集CLL细胞的更精细的设门，可使用CD5和CD27两者。用于区分正常B细胞与CLL细胞的标志物：

[0115] 标志物和最常见的表型畸变的列表：

[0116] CD27：在CLL细胞和一小部分正常B细胞上为阳性

[0117] CD5：在CLL细胞和一小部分正常B细胞上为阳性

[0118] CD79b：与正常移行和成熟B淋巴细胞相比，在CLL细胞上表达不足

[0119] CD22：与正常移行和成熟B淋巴细胞相比，在CLL细胞上表达不足

[0120] CD20：与正常移行和成熟B淋巴细胞相比，在CLL细胞上表达不足

[0121] CD200：与正常移行和成熟B淋巴细胞相比，在CLL细胞上过表达

[0122] ROR1：与正常移行和成熟B淋巴细胞相比，在CLL细胞上过表达

[0123] CD43：与正常移行和成熟B淋巴细胞相比，在CLL细胞上过表达

[0124] CD81：与B细胞前体以及移行和成熟B淋巴细胞二者相比，在CLL细胞上表达不足

[0125] CD38：与B细胞前体相比，在CLL细胞上表达不足。

[0126] 实施例3.用于MM/PCD患者中MRD检测的抗体组和诊断方法

[0127] 用于鉴定骨髓中总浆细胞的标志物：

[0128] 识别标志物的列表：CD38、CD138和CD229

[0129] 如何使用它们：三种标志物的任意组合在任意荧光染料位置起作用；也可使用三种标志物中两种的任意组合或者在一些情况(并非所有)下可使用甚至单独的三种标志物之一。优选以如下顺序组合：1)CD138/CD38/CD229；2)CD138/CD38，3)CD138/CD229；4)CD38/CD229；5)CD138；6)CD38)；7)CD229。应当注意单独和组合的任意这些标志物还可与与侧向

光散射(SSC)或前向光散射(FSC)或者FSC和SSC两者组合使用以鉴定骨髓或其他类型的样品(例如外周血、组织活检、脊髓液)中的浆细胞。

[0130] 用于区分正常与克隆/恶性浆细胞的标志物

[0131] 标志物和最常见的表型畸变的列表：

[0132] CD38：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中表达不足

[0133] CD27：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中表达不足

[0134] CD45：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中表达不足

[0135] CD19：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中表达不足(通常为阴性)

[0136] CD81：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中表达不足

[0137] CD56：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中过表达

[0138] CD28：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中过表达

[0139] CD117：与正常浆细胞相比，在恶性浆细胞中过表达

[0140] CyIgκ和CyIgλ：表达受限于恶性浆细胞中一条或另一条Ig轻链同时示出均衡分布(在正常浆细胞中CyIgκ/CyIgλ的比通常为3至0.5的比)

[0141] SSC：与正常浆细胞相比，恶性浆细胞中的强度增大或减小

[0142] FSC：与正常浆细胞相比，恶性浆细胞中的强度增大或减小。

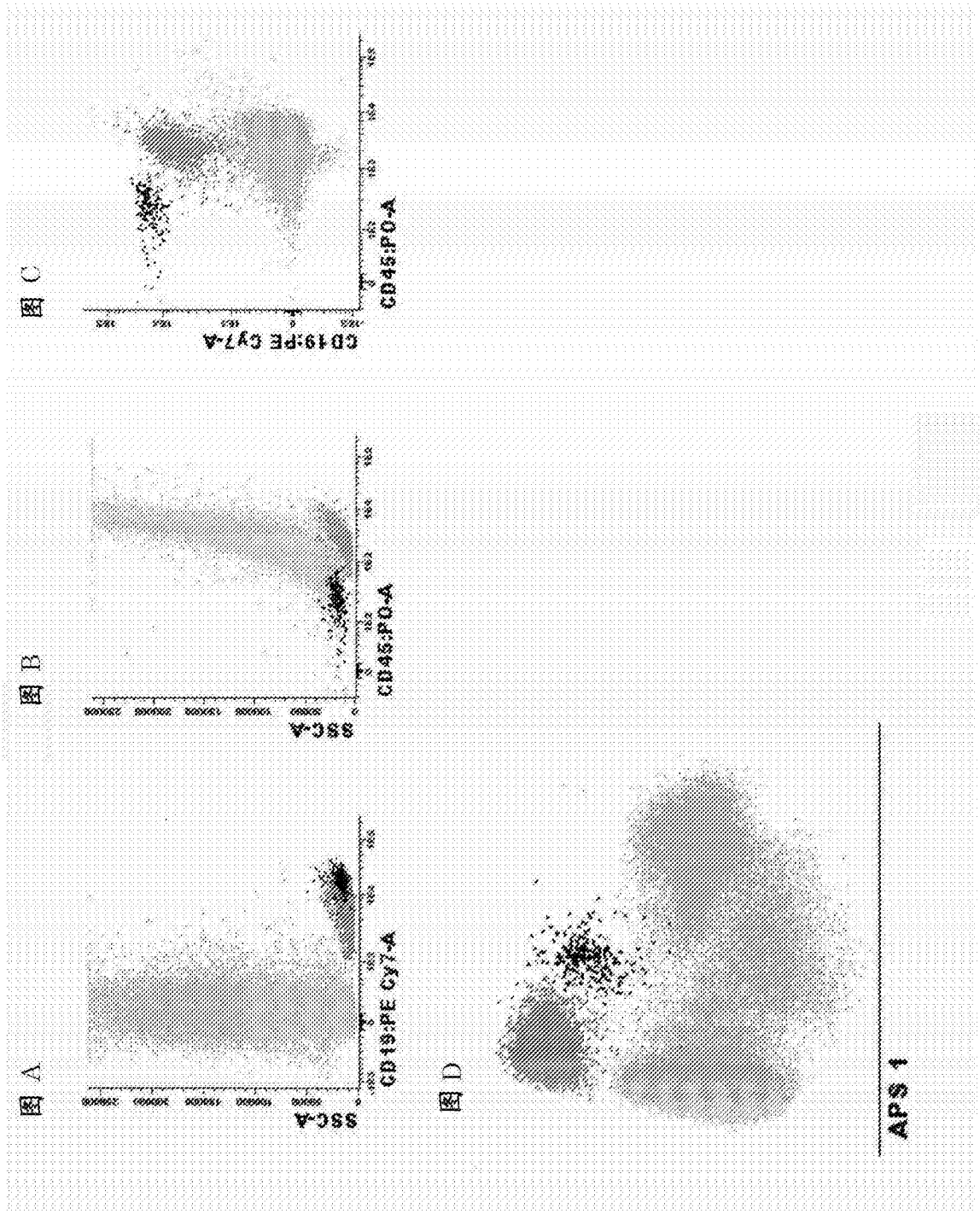

图 A
CD19:PE Cy7-A
SSC-A
图 B
CD45:PO-A
SSC-A
图 C
CD45:PO-A
CD19:PE Cy7-A
图 D
APS 1

图1

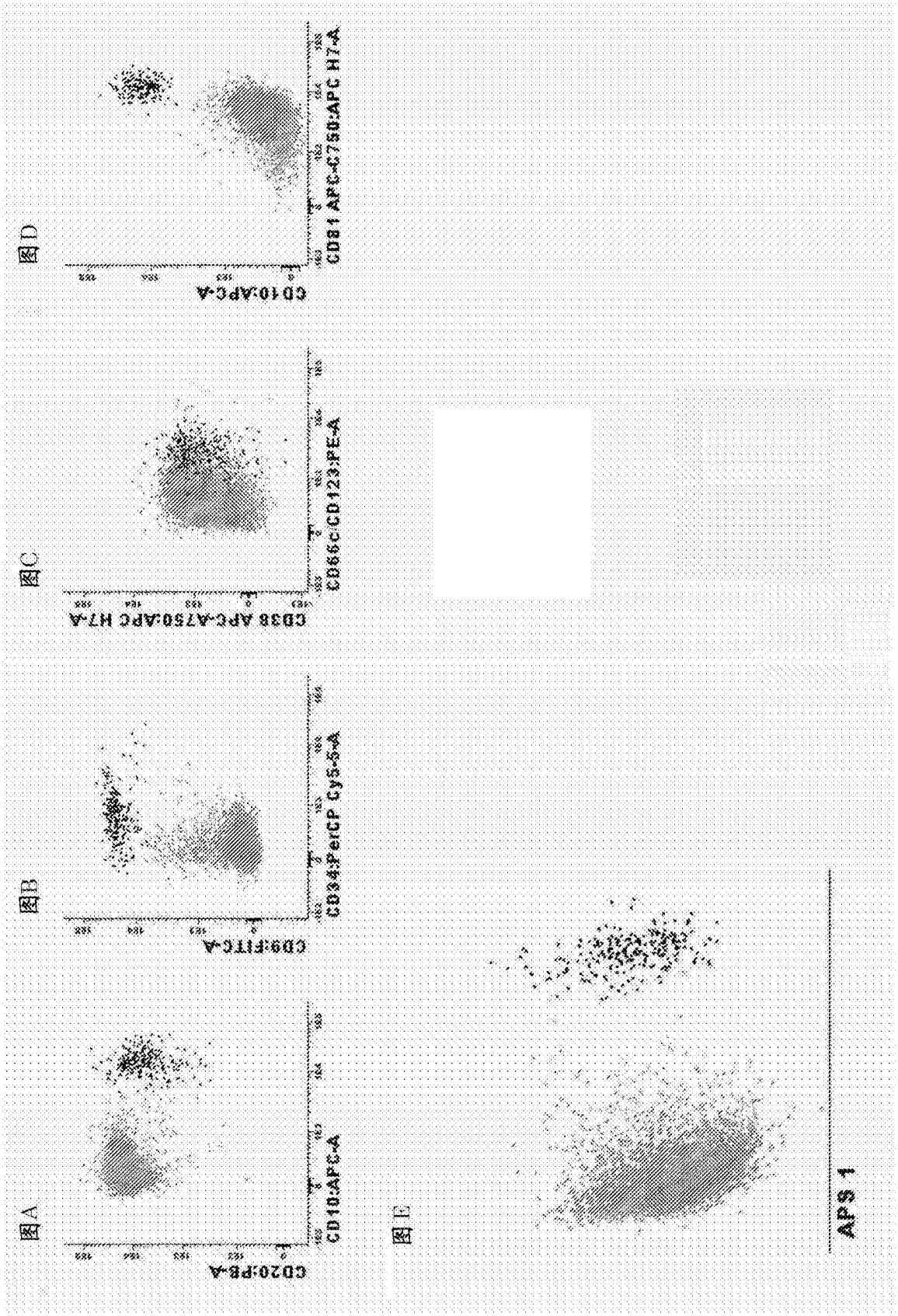

图A
CD10:APC-A
CD20:PB-A
图B
CD34:PerCP Cy5-5-A
CD9:FITC-A
图C
CD66c/CD123:PE-A
CD38 APC-A750:APC H7-A
图D
CD81 APC-C750:APC H7-A
CD10:APC-A
图E
APS 1

图2

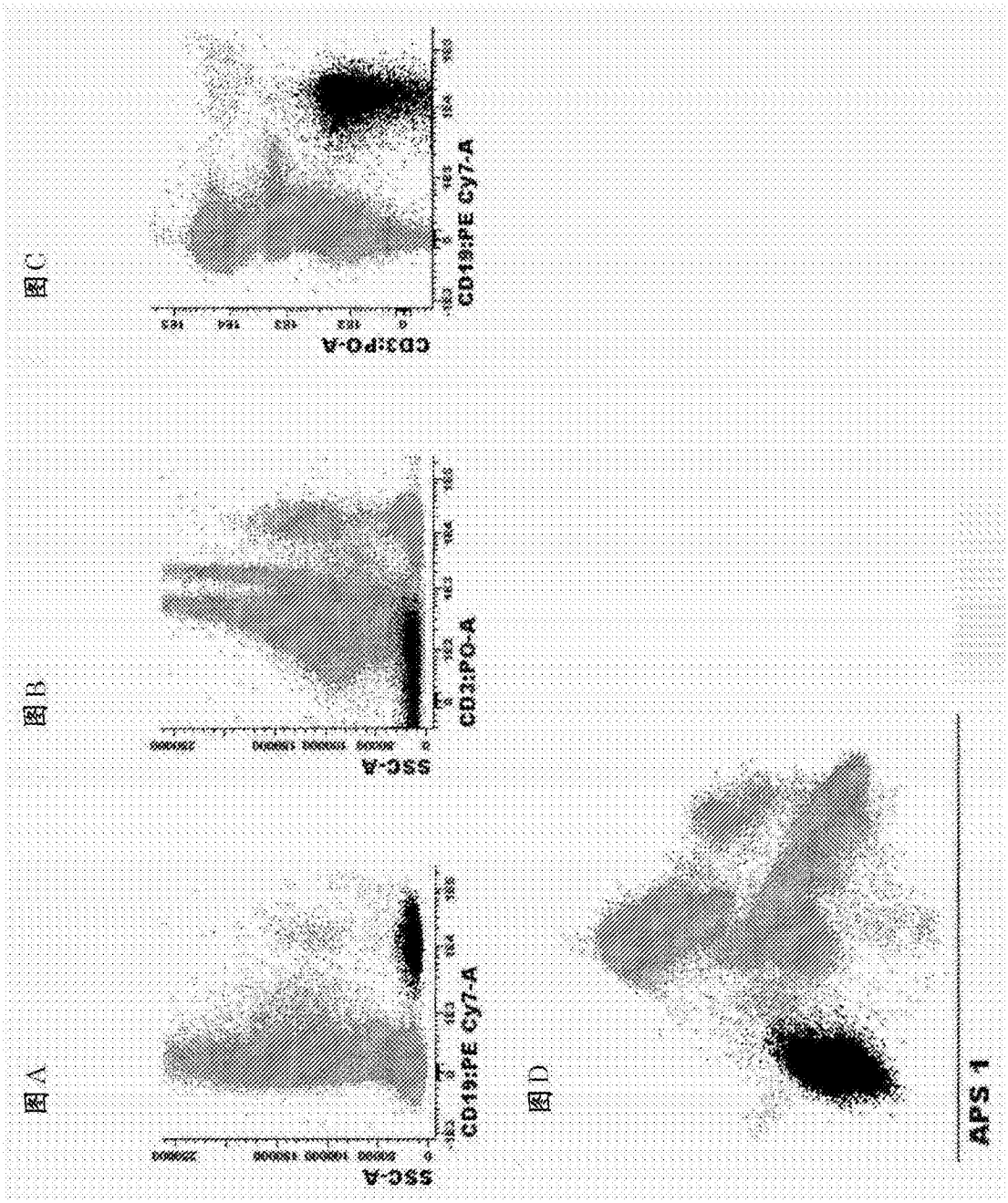

图A
SSC-A
CD19:PE Cy7-A
图B
SSC-A
CD3:PO-A
图C
CD3:PO-A
CD19:PE Cy7-A
图D
APS 1

图3

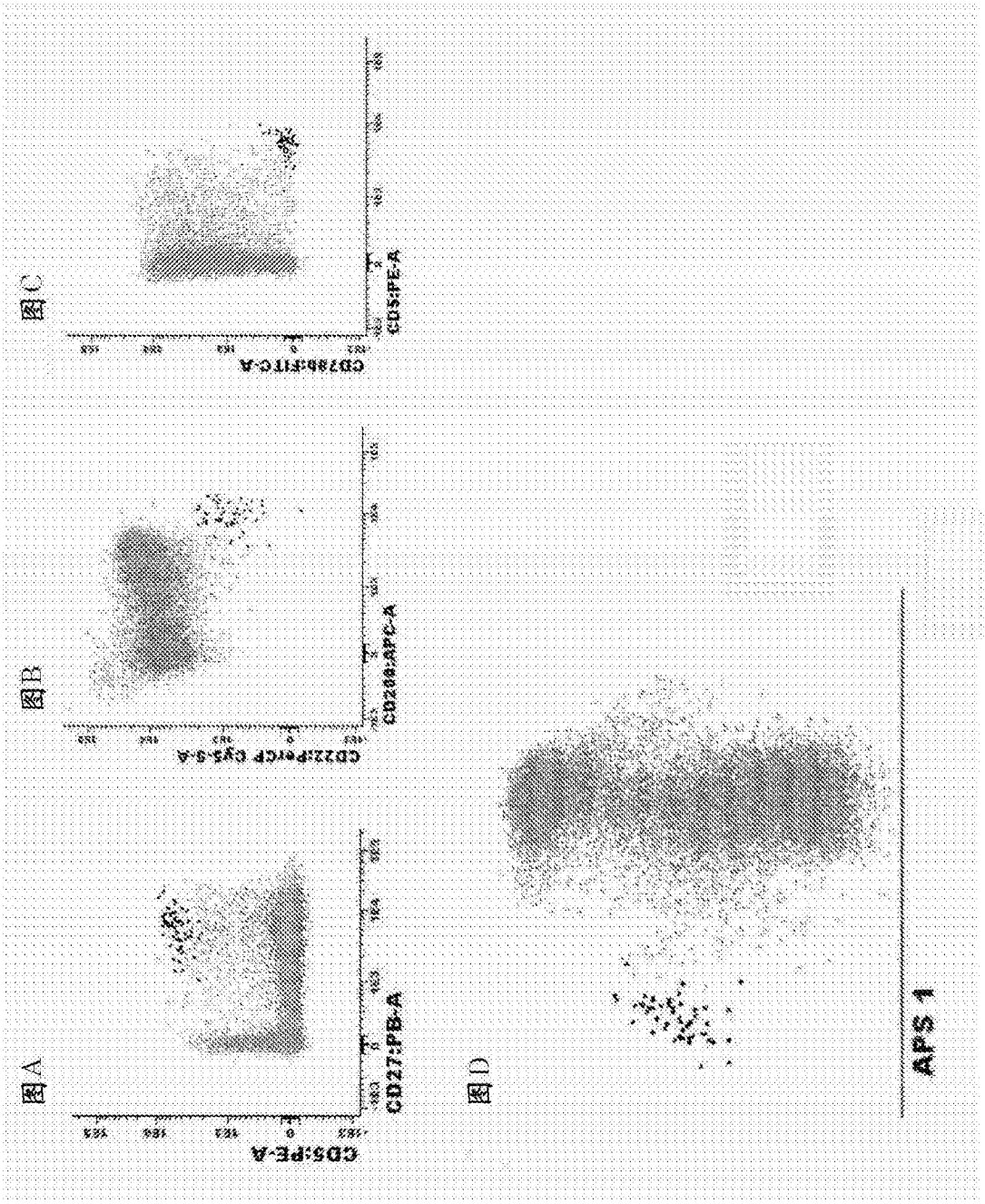

图A
CD5:PE-A
CD27:PB-A
图B
CD27:PerCP Cy5-5-A
CD268:APC-A
图C
CD38:FITC-A
CD5:PE-A
图D
APS 1

图4

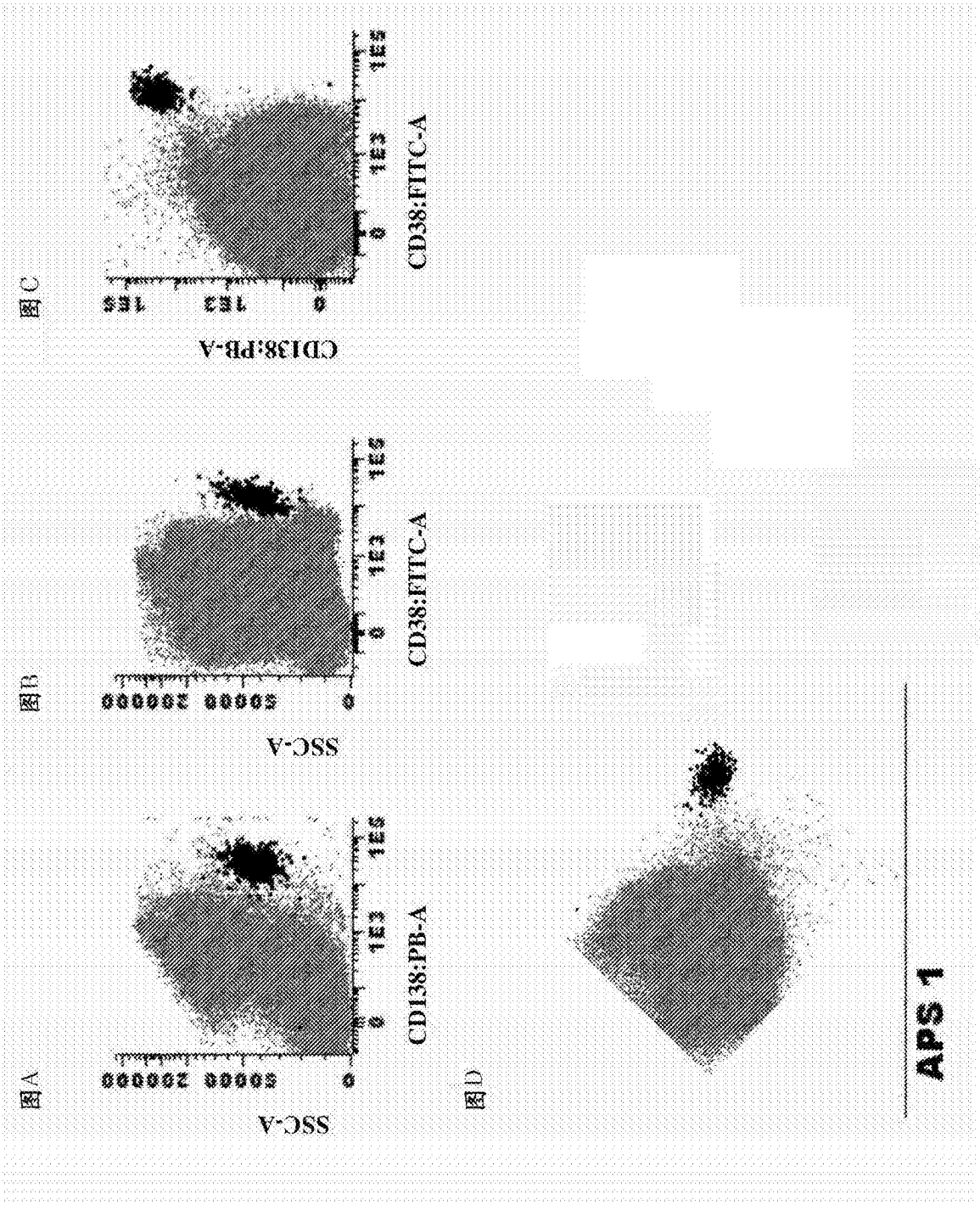

图A
SSC-A
CD138:PB-A
图B
SSC-A
CD38:FITC-A
图C
CD138:PB-A
CD38:FITC-A
图D
APS 1

图5

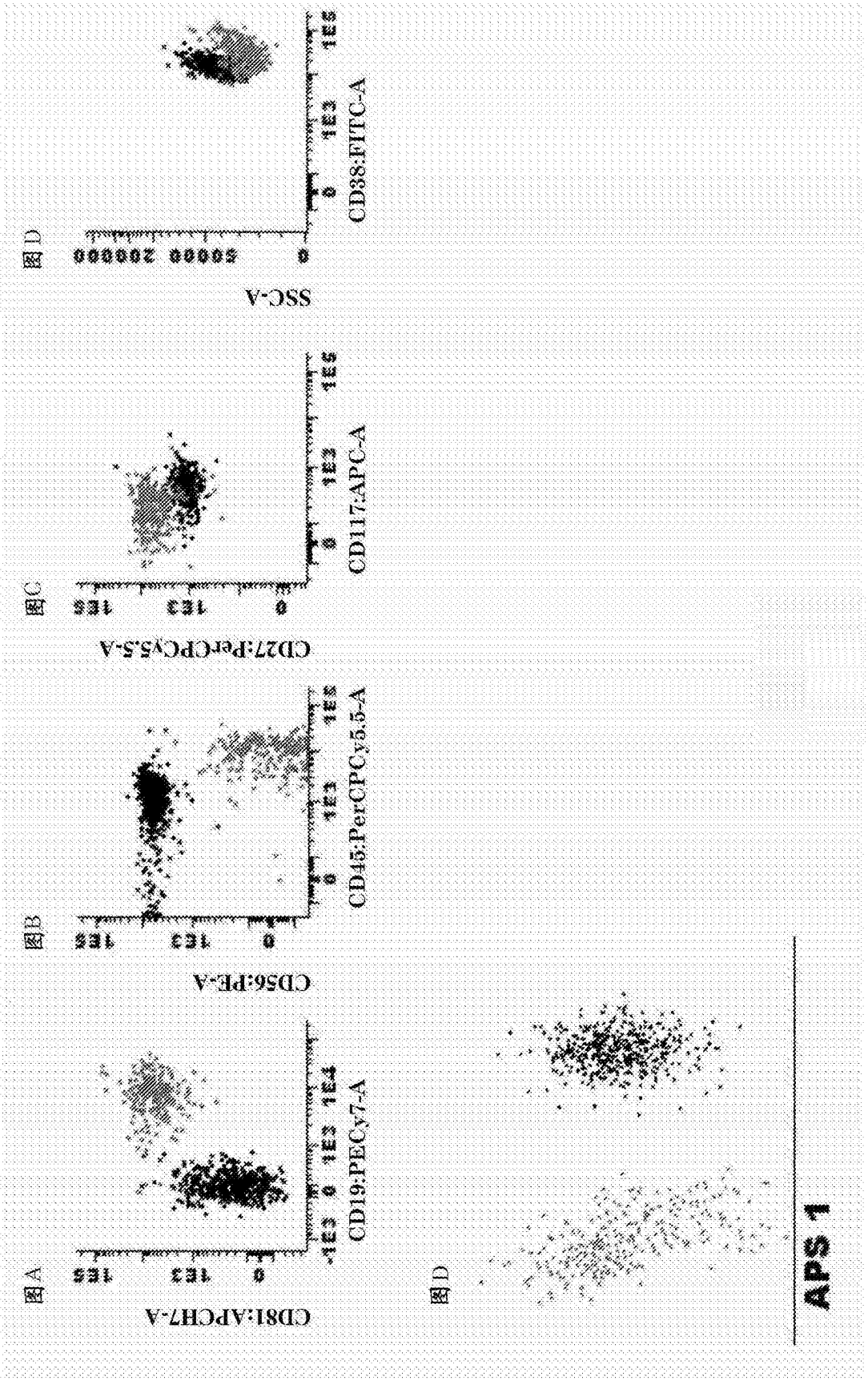

图A
CD81:APCH7-A
CD19:PECy7-A
图B
CD56:PE-A
CD45:PerCPCy5.5-A
图C
CD27:PerCPCy5.5-A
CD117:APC-A
图D
SSC-A
CD38:FITC-A
图D
APS 1

图6