



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103826750 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 28

(21) 申请号 201280046226. 4

G01N 33/49 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 07. 20

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/58 (2006. 01)

61/510, 170 2011. 07. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 03. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/047747 2012. 07. 20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/013222 EN 2013. 01. 24

(71) 申请人 詹森诊断器材有限责任公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 S. 格罗斯 M. C. 康内利 G. C. 劳

M. 马塔 C. 莫拉诺

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 林毅斌 梁谋

(51) Int. Cl.

B03C 1/01 (2006. 01)

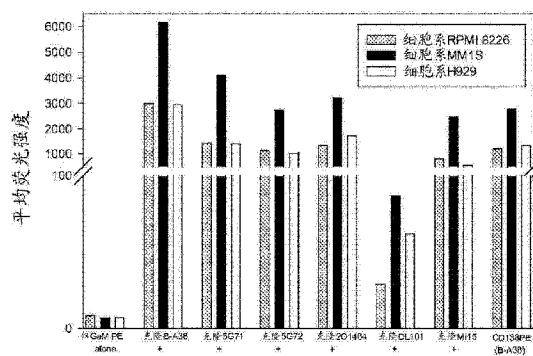
权利要求书2页 说明书14页 附图7页

(54) 发明名称

从血液中捕获和检测循环多发性骨髓瘤的测定法

(57) 摘要

本发明包括分离循环多发性骨髓瘤细胞的方法以及治疗被怀疑患有异常血浆细胞疾病的患者的方法。



CD138对细胞系H929、MM. 1S和RPMI 8226染色

1. 一种捕获、分离和分析循环多发性骨髓瘤细胞的方法,包括
 - (a) 从测试受试者中获得血液的样品
 - (b) 使所述样品与缀合至第一配体的胶态磁性颗粒接触
 - (c) 使步骤(b)的样品经受磁场,以生产结合磁性颗粒的循环多发性骨髓瘤细胞的分离级分
 - (d) 用第一附加标记物处理步骤(c)的样品
 - (e) 分析循环多发性骨髓瘤细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品具有约 2mL 至约 10mL 的体积。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品具有约 3mL 至约 7.5mL 的体积。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品具有约 4mL 的体积。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一配体选自抗 -CD138、抗 -CD38、和抗 -CD56。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一配体选自抗 -CD138、和抗 -CD38。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一配体选自抗 -CD138。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一配体选自抗 -56。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述胶态磁性颗粒被缀合至第二配体,其中所述第一配体选自抗 CD138、和抗 -CD56 并且所述第二配体为 CD38。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述第一配体为 CD138 并且所述第二配体为 CD38。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述胶态磁性颗粒被缀合至多于两个的配体。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述胶态磁性颗粒被缀合至抗 -CD138、抗 -CD38、和抗 -CD56。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一附加标记物选自 DAPI、抗 -CD38 抗 CD19、和抗 CD45 抗 CD138、抗 CD56、抗 λ 、抗 κ 抗 CD200、抗 Ki67。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一附加标记物为抗 CD38。
15. 根据权利要求1所述的方法,还包括使步骤(c)的样品与第二附加标记物接触。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述第二附加标记物选自抗 -CD19、抗 -CD45、和 DAPI。
17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述第二附加标记物为 DAPI。
18. 根据权利要求15所述的方法,还包括使步骤(c)的样品与第三附加标记物接触。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述第三附加标记物选自抗 -CD19、抗 -CD45、和 DAPI。
20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述第三附加标记物为抗 -CD19。
21. 根据权利要求18所述的方法,还包括使步骤(c)的样品与第四附加标记物接触。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述第四附加标记物为抗 -CD45。
23. 根据权利要求1所述的方法,还包括使步骤(c)的样品与四个或更多个附加标记物接触。
24. 一种确定患者的血液是否是异常浆细胞相关联的疾病的干预的可能候选者的方法

- (a) 处理所述患者的血液以确定样品中有多少 CMMC
 - (b) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围。
25. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中所述处理包括
- (a) 从测试受试者中获得血液的样品
 - (b) 使所述样品与缀合至第一配体的胶态磁性颗粒接触
 - (c) 使步骤(b) 的样品经受磁场, 以生产结合磁性颗粒的循环多发性骨髓瘤细胞的分离级分
 - (d) 用第一附加标记物处理步骤(c) 的样品
 - (e) 分析循环多发性骨髓瘤细胞。
26. 根据权利要求 21 所述的方法, 其中患者样品中 CMMC 的正常范围在约 2mL 至 10mL 的血液中小于 7 个 CMMC。
27. 根据权利要求 21 所述的方法, 还包括如果 CMMC 数在约 2mL 至约 10mL 的血液中大 于 8 个, 则推荐治疗干预。
28. 一种确定经历治疗干预的患者是否减少 CMMC 数的方法, 包括
- (a) 处理所述患者的血液以确定在第一时间点在样品中有多少 CMMC
 - (b) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围
 - (c) 处理所述患者的血液以确定在第二时间点样品中有多少 CMMC
 - (d) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围
 - (e) 比较步骤(b) 和(d) 中的数目。
29. 一种确定患有异常血浆细胞疾病并已成功治疗此类疾病的患者是否停留在缓解期 的方法, 包括
- (a) 处理所述患者的血液以确定在第一时间点在样品中有多少 CMMC
 - (b) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围
 - (c) 处理所述患者的血液以确定在第二时间点样品中有多少 CMMC
 - (d) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围
 - (e) 比较步骤(b) 和(d) 中的数目。
30. 一种试剂, 其用于捕获包含胶态磁性颗粒和至少一种配体的循环多发性骨髓瘤细 胞。
31. 根据权利要求 30 所述的试剂, 其中所述配体选自抗 CD138、抗 -CD38、和抗 -CD。
31. 根据权利要求 30 所述的试剂, 还包含至少两个配体。
32. 根据权利要求 30 所述的试剂, 还包含至少三个配体。

从血液捕获和检测循环多发性骨髓瘤的测定法

[0001] 相关申请

[0002] 这个非临时性申请要求于 2011 年 7 月 21 日提交的美国专利申请序列号 61/510,170 的临时专利申请的优先权。

背景技术

[0003] 多发性骨髓瘤(也已知为骨髓瘤或浆细胞骨髓瘤)是浆细胞的渐进血液癌症。该病症特征在于骨髓中过量数目的浆细胞和未受损的单克隆免疫球蛋白或游离的单克隆轻链的生产过剩。

[0004] 临床上,该疾病是根据多种参数诊断、分阶、和治疗的,所述参数包括基于血清和/或尿液中单克隆(或骨髓瘤)蛋白(M 蛋白)的量的骨髓瘤肿瘤细胞群,和血红蛋白和血清钙浓度,基于骨肌检查和肾衰竭的存在或缺乏的溶骨性病变的数量。表征该病症的附加方法包括对骨髓检查的大于百分之十(10%)的浆细胞检测,软组织浆细胞瘤的存在及游离 κ 和 λ 血清免疫球蛋白轻链的检测。骨髓检查是使用标准的组织学和免疫组织化学技术进行的。还进行骨髓样品的细胞遗传学检查以确定预后。接下来,由于骨髓评价是侵入式性的,如果临床需要,监测由化学和骨髓评价组成。

[0005] 目前,骨髓流式细胞分析(flow cytometric analysis)被评价为疾病表征的工具并用来区分正常浆细胞和增生性浆细胞病症和用来检测微量残留病(minimal residual disease)。尽管如此,这种方法仍然依赖于一种侵入式程序。显著需要开发微创技术(less invasive technique),以贯穿疾病过程检测、监视和表征疾病,并且血液中这些细胞的存在可提供这样的机会。

[0006] 此外,需要开发更灵敏的工具用于风险的更精确评估和监视疾病前期阶段中疾病的进展,该疾病包括未明确诊断意义的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)和郁积型多发性骨髓瘤(Smoldering Multiple Myeloma)。一些研究数据表明,循环浆细胞在疾病的前期阶段可被检测到并且可与预后关联,这支持标准化方法的使用以在疾病的早期阶段中捕获、列举和表征这些细胞。

[0007] 在异常浆细胞的识别,尤其是通过流式细胞术识别的文献(Report of the European Myeloma Network on Multiparametric Flow Cytometry in Multiple Myeloma and Related Disorders, Andy C. Rawstron 等人, Haematologica, 2008 ;93(3)。)中普遍共识已包括多个主要由 CD138、CD38 和 CD45 组成的关键生物标记物。附加的生物标记物诸如 CD19 和 CD56 也已被证明在诊断中的实用性。

[0008] 本发明研究了循环骨髓瘤细胞,以评价这些特定生物标记物单独或与一个或多个附加生物标记物或与 FISH 组合是否可用于异常循环浆细胞的捕获和检测,包括微量残留病的检测。FISH 可用于检测已在多发性骨髓瘤中描述的许多细胞遗传学异常性。在 IGH 基因座 t(4;14) 处的易位和在 p53 基因座 del(17p) 处的缺失,已被证明具有对于多发性骨髓瘤中无事件(event free)生存率和总生存率的预后价值。(Genetic Abnormalities and Survival in Multiple Myeloma: The Experience of the InterGroupe Francophone du

Myelome. Herve Avet-Loiseau 等人, Blood, 2007 ;109 :3489-3495) 在 Poseidon 目录中这些探针和多个其它多发性骨髓瘤标记物是可利用的, 并可使其适合用于 **CellTracks[®]** 平台。

[0009] 商业上存在使用 CD138 磁性颗粒的免疫磁珠选择试剂盒 (immunomagnetic selection kits)。干细胞技术具有可从骨髓和外周血单核细胞 (PBMC) 中选择 CD138 阳性细胞的 **EasySep[®]** 人类 CD138 阳性选择试剂盒, 而 Miltenyi Biotech 具有用于从骨髓、PBMC 和全血中选择 CD138 阳性细胞的 CD138 微珠 (Microbeads)。通常使用流式细胞术进行采集样本的分析。

发明内容

[0010] 这里描述的本发明由循环血浆细胞 (CPC) 和异常浆细胞或多发性骨髓瘤细胞 (“CMMC”) 的捕获和检测的方法组成, 该检测包括从外周血中检测微量残留病。本发明提供一种检测毫升体积的血样中非常低数目的 CMMC 的非侵入式方法以贯穿疾病的整个过程检测、监视和表征疾病, 以及提供用于风险的更精确评价的更灵敏的工具, 和在疾病的前期阶段监视疾病的进展, 该监视包括在疾病的前期阶段检测循环血浆细胞, 该疾病包括未明确诊断意义的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS) 和郁积型多发性骨髓瘤。来自外周血的这些循环血浆细胞的捕获和表征可提供用于管理多发性骨髓瘤患者的新型生物标记物。

[0011] 血液被收集于细胞安全 (CellSave) 管中, 该细胞安全管包含允许血液运输和存储同时使细胞降解最小化的防腐剂。细胞是使用缀合到存在于浆细胞上的细胞表面标记物 Syndecan-1 或 CD138 的胶体磁性颗粒捕获的。为了从污染了白细胞 (白血细胞) 的背景中区分多发性骨髓瘤细胞, 一旦被捕获, 用附加的细胞标记物 CD38-PE (藻红蛋白)、CD19 和 CD45-APC (别藻蓝蛋白), 以及 CD56-FITC (荧光素异硫氰酸酯) 标记细胞。铁磁流体和细胞标记物试剂都是新的 **CellSearch[®]** CMMC 服务试剂盒的成员。该试剂盒由 7 种组分组成, 其中 4 种与存在于 **Cellsearch[®]** 上皮细胞试剂盒中的试剂相同。这 4 种常用的试剂是捕获增强试剂、Perm 试剂、核酸染料和 CellFix。3 种新的试剂由 CD138 铁磁流体、染色试剂和单独的标记物染色试剂组成, 染色试剂由 CD38-PE、CD19 和 CD45-APC 组成, 单独的标记物染色试剂由 CD56-FITC 组成的。

附图说明

- [0012] 图 1 示出了 CD138 抗体与某些细胞系的反应性
- [0013] 图 2 示出了 CD38 抗体与某些细胞系的反应性
- [0014] 图 3 示出了对 PBMC 测试的不同 CD19APC 抗体的反应性
- [0015] 图 4 示出了在不同稀释度下 CD19APC 的染色
- [0016] 图 5 示出了 CD56 抗体对 PBMC 的染色
- [0017] 图 6 示出了 CD56 对各种细胞系的染色
- [0018] 图 7 示出了无 CD56 的染色
- [0019] 图 8 示出了在一种稀释度下 CD56FITC 染色细胞系
- [0020] 图 9 示出了在一种稀释度下 CD56FITC 染色细胞系
- [0021] 图 10 示出了在一种稀释度下 CD56FITC 染色细胞系

- [0022] 图 11 示出了来自 MM1S 细胞的代表性图像
- [0023] 图 12 示出了来自 H929 细胞的代表性图像
- [0024] 图 13 示出了遗留 (carry-over) 白血细胞的代表性图像
- [0025] 图 14 示出了一个患者样品的图像
- [0026] 图 15 示出了一个患者样品的图像
- [0027] 图 16 示出了一个患者样品的图像
- [0028] 图 17 示出了一个患者样品的图像
- [0029] 图 18 示出了来自正常供体的图像

具体实施方式

[0030] 本发明包括捕获、分离和分析循环多发性骨髓瘤细胞的方法,所述方法包括

[0031] (a) 从测试受试者获得血液的样品

[0032] (b) 使所述样品与缀合至第一配体的胶态磁性颗粒接触

[0033] (c) 使步骤(b)的样品经受磁场,以生产结合磁性颗粒的循环多发性骨髓瘤细胞的分离级分

[0034] (d) 用第一附加标记物处理步骤(c)的样品

[0035] (e) 分析循环多发性骨髓瘤细胞。

[0036] 如本文所用,术语“样品”是指一定量的血液,优选表示为体积测量。优选的血液样品体积为约 2mL 至 10mL,更优选地 3-7.5mL,最优选地 4mL。术语“胶态磁性颗粒”是指金属或有机金属颗粒。美国专利 No. 5,597,531 ;5,698,271 ;5,698,271 ;6,365,662 中公开了此类颗粒的实例,据此全文引入以供参考,尤其对于此类胶态磁性颗粒的描述。它们可用聚合物,优选生物来源诸如牛血清白蛋白和酪蛋白的聚合物任选地涂覆。

[0037] 术语“配体”是指结合到 CMMC 的或循环血浆细胞 (“CPC”) 的细胞相关联的标记物的蛋白质。优选的蛋白质是抗体,优选抗 CD138、抗 -CD38、和抗 -CD56,更优选地抗 CD138、和抗 -CD38,甚至更优选地抗 CD-138。此类配体可通过基本上类似于所公开的 6,365,662 的方法来缀合至胶态磁性颗粒。两个或两个以上配体可用于本发明的步骤(b),且优选至少两个配体用于该步骤。

[0038] 术语“磁场”可由许多方法中的任何一种,尤其是由基本上如美国专利 No7,901,950 中描述的两个磁性分离器产生,该专利全文以引用方式并入。术语“附加的标记物”意味着细胞相关联的蛋白,其对于 CMMC 或排除 CMMC 是特异的。此类蛋白质包括但不限于选自抗 -CD38 抗 CD19、和抗 CD45 抗 CD138、抗 CD56、抗 λ 、抗 κ 抗 CD200、抗 Ki67 的抗体。此类抗体可用指示剂诸如藻红蛋白、荧光素异硫氰酸酯、和别藻蓝蛋白标记并且优选一种或多种标记物标记。附加标记物可包括核酸染料诸如 DAPI。优选的附加标记物选自抗 CD-38、抗 CD19、以及抗 CD45 ;尤其优选的附加标记物为抗 CD38。两个或更多个附加标记物可用于本发明的步骤(d) 且优选使用至少两个附加标记物,更优选地,三个附加标记物,最优选地四个附加标记物。

[0039] 术语“分析”意味着评价磁力捕获的样品以确定一个或多个下列项:样品是否包含 CMMC 或 CPC。此类识别可由目视或电子方式实施以确定磁力捕获的样品的荧光度。此类分析方法公开在美国专利 No. 7,011,794 中,该专利以引用方式并入本文。尤其是,磁力捕获

的样品被标识为 CMMC, 其对 CD38 为阳性且对 CD19 和 CD45 为阴性。

[0040] 本发明包括确定患者的血液是否为与异常血浆细胞相关联疾病的治疗干预的可能候选者的方法

[0041] (a) 处理所述患者的血液以确定样品中有多少 CMMC

[0042] (b) 通过计数 1 定存在于所述样品中的 CMMC 细胞数是否等于或者大于或等于正常范围。

[0043] 如本文使用, 术语样品具有其前述意义和优选的范围。术语“处理”意味着通过本文所述的方法处理患者的血液样品以分离和识别 CMMC。

[0044] 术语“治疗干预”寻求或获得用于治疗与异常血浆水平相关联的疾病的任何医疗干预。此类疾病包括但不限于多发性骨髓瘤、MGUS、和郁积型多发性骨髓瘤。此类治疗干预包括但不限于看医生, 获得治疗处理诸如辐射, 和用治疗任何与异常血浆水平相关联疾病的药物处理, 及监视此类治疗处理的效果。例如, 如果患者正接受药物治疗, 可在治疗过程中评估患者的 CMMC 水平, 以确定该药物是否起作用。此类药物包括但不限于, 地塞米松、环磷酰胺、长春新碱、硼替佐米 (Bortezomib)、美法仑、择泰、帕洛诺司琼 (Aloxi)、来那度胺 (Lenalidomide)、多柔比星 (Doxirubicin) 等。

[0045] 术语“正常范围”意味着存在于样品群体中的 CMMC 细胞数, 该样品群体未患有与异常血浆细胞相关联的疾病。优选地该正常范围在约 3mL 至约 7.5mL 的血样中小于 7 个 CMMC。术语“大于正常范围”是超出正常范围的 CMMC 数。此数越高, 越有可能患者患有与异常血浆细胞相关联的疾病之一。如果患者血液的样品中具有在 8 至 20 之间的 CMMC, 那么此类患者具有更高的患有与异常血浆细胞相关联的疾病之一的概率。如果患者具有在 21 至 49 之间的 CMMC, 那么患者具有提高的水平且更可能患有与异常血浆细胞相关联的疾病之一, 如果患者具有在 50 至数万之间的 CMMC, 那么患者具有高度提高的水平且甚至更可能患有此类疾病之一。

[0046] 但仍进一步的, 本发明包括确定经历治疗干预的患者是否减少 CMMC 数的方法, 所述方法包括:

[0047] (a) 处理所述患者的血液以确定在第一时间点在样品中有多少 CMMC

[0048] (b) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围

[0049] (c) 处理所述患者的血液以确定在第二时间点样品中有多少 CMMC

[0050] (d) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围

[0051] (e) 比较步骤(b)和(d)中的数目。

[0052] 所有前面所定义的术语具有其相同的意义和优选的范围。

[0053] 仍进一步的, 本发明包括确定患有异常血浆细胞疾病并已成功治疗此类疾病的患者是否停留在缓解期的方法, 所述方法包括

[0054] (a) 处理所述患者的血液以确定在第一时间点在样品中有多少 CMMC

[0055] (b) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围

[0056] (c) 处理所述患者的血液以确定在第二时间点样品中有多少 CMMC

[0057] (d) 通过计数确定存在于所述样品中的 CMMC 数是否等于或者大于或等于正常范围

[0058] (e) 比较步骤(b)和(d)中的数目。

[0059] 所有前面所定义的术语具有其相同的意义和优选的范围。

[0060] 仍进一步的,本发明包括用于捕获包括胶态磁性颗粒和至少一种配体的循环多发性骨髓瘤细胞的试剂。

[0061] 所有前面所定义的术语具有其相同的意义和优选的范围。

[0062] 但仍另外的,本发明包括捕获、分离和分析循环血浆细胞的方法,所述方法包括

[0063] (a) 从测试受试者获得血液的样品

[0064] (b) 使所述样品与缀合至第一配体的胶态磁性颗粒接触

[0065] (c) 使步骤(b)的样品经受磁场,以生产结合磁性颗粒的循环多发性骨髓瘤细胞的分离级分

[0066] (d) 用第一附加标记物处理步骤(c)的样品

[0067] (e) 分析循环血浆细胞。

[0068] 所有前面所定义的术语具有其相同的意义和优选的范围。

[0069] 从血液中捕获的循环多发性骨髓瘤细胞(CMMC),一种异常血浆细胞的形式已使用 **CellTracks[®] AutoPrep[®]**和 **CellTracksAnalyzer II[®]**系统捕获和分析。在此过程中,捕获试剂(铁磁流体)和荧光生物标记物(诸如抗-CD38-藻红蛋白(PE)抗体)和染料(诸如核酸染料 DAPI)的组合被用于识别异常血浆细胞并从污染白细胞和碎片中区分它们。CD138 或 Syndecan-1 (多配体蛋白聚糖-1)是在成熟血浆细胞和血浆细胞恶性肿瘤诸如多发性骨髓瘤上,但不在其它正常外周血白细胞上发现的细胞表面标记物。因为这个原因,将抗-CD138 联接到用于从外周血样中磁力选择循环血浆细胞的铁磁流体、磁性纳米颗粒上。为了从污染白细胞中检测异常血浆细胞,使用多个荧光生物标记物。将抗-CD38 缀合至藻红蛋白(PE)并用作检测血浆细胞的阳性标记物。然而,CD38 也被发现于一些类型的白细胞(活化的 T 和 B 细胞)上,因此测定法也使用别藻蓝蛋白(APC)缀合抗-CD45 和缀合至别藻蓝蛋白(APC)的抗-CD19 作为阴性标记物。CD45 是发现于外周血白细胞上的全白细胞标记物(pan-leukocyte marker),而 CD19 是特异性 B 细胞标记物。骨髓瘤细胞是不表达 CD45 或 CD19 的功能分化的 B 细胞。该测定法中的最终标记物为缀合至荧光素异硫氰酸酯(FITC)的抗 CD56。CD56 可被发现于一些外周白细胞亚群诸如 NK 细胞上,但也被表达于 75% 的骨髓瘤细胞上且常常与较差的患者预后相关联。因此,虽然 CD56 既不是多发性骨髓瘤的阳性标记物也不是多发性骨髓瘤的阴性标记物时,但其在细胞上的表达水平可在患者药物治疗过程中被监视。

[0070] 使用细胞系诸如 RPMI8226、H929 和 MM. 1S 初始开发该测定法,以评价确定存在于多发性骨髓瘤细胞上的标记物的不同抗体,该标志物包括 CD138、CD38 和 CD56。因为这些细胞系对于 CD45 和 CD19 是阴性的,所以替代利用 PBMC 来评价这些抗体。

[0071] 将富集和染色的细胞转移到 **CellTracks[®]**盒和用于磁性安装的**MagNest[®]**。使用 **CellTracks Analyzer II[®]**对盒进行扫描。细胞的各个图像被呈现给操作者进行查看,并根据荧光和细胞形态记为 CMMC。在模型掺入(spike-in)系统中,该测定法从掺入了来自健

康供体的 4.0mL 的血液的多发性骨髓瘤细胞株 H929 中一致地回收约 60% 的细胞。在掺入的 H929 细胞从 0 至 2000 的测试的范围内该测定法是线性的 ($r=0.98$, 斜率 0.50, 截距 10)。该测定法使用来自年龄匹配的健康供体 ($n=22$) 及多发性骨髓瘤患者 ($n=66$) 和 MGUS 患者 ($n=7$) 的血液进行验证。在来自正常供体的 4.0mL 血液中, 在 12/22 (55%) 样品中检测到 0CPC, 而在 10/22 (45%) 样品中检测到低数目 (1-6CPC)。有趣地, 一个 CD56 阳性 CPC 存在于正常供体中。多发性骨髓瘤患者中的 CMMC 范围为 0-17,000/4.0mL 血液。在 91% 的患者中检测到一个或多个 CMMC, 在 68% 患者中 ≥ 5 , 在 58% 患者中 ≥ 10 而在 35% 患者中 ≥ 100 。在患者群体中 CD56 的表达高度可变。MGUS 患者中的 CMMC 范围为 0-112/4.0mL 血液。在 6/7 的患者中检测到一个或多个 CMMC, 在 4/6 患者中 >5 , 在 2/6 患者中 >10 , 而在 1/6 患者中 >100 。

[0072] 为进一步表征 CMMC, 并从 CMMC 中区分 CPC, 开发间期荧光原位杂交 (FISH) 测定法以与上述的捕获和检测系统一起使用。使用四色 FISH 探针同时检测高风险的突变。下列实例示出了本发明

[0073] 实例

[0074] 缩写

[0075] PE- 藻红蛋白

[0076] FITC- 荧光素异硫氰酸酯

[0077] APC- 别藻蓝蛋白

[0078] PBMC- 外周血单核细胞

[0079] 抗体来源 -

[0080] CD138 :

[0081] Gen-ProbeDiaccloneSAS

[0082] 1BdAFleming, BP1985

[0083] 法国, F-25020Besancon Cedex

[0084] CD38 和 CD19

[0085] R&D 系统

[0086] 614McKinleyPlaceN. E.

[0087] Minneapolis, MN55413

[0088] 实例 1 捕获靶标

[0089] 图 1 表明, 用细胞系 RPMI8226、H929、和 MM. 1S 测试抗 -CD138 抗体的反应性, 表现最佳的抗体为克隆 B-A38。首先用不同的抗体标记该细胞系, 该不同的抗体全部为小鼠抗人抗体, 随后用抗小鼠 PE 缀合物标记并通过流式细胞术分析。克隆 B-A38 对所有多发性骨髓瘤细胞系给出了最高的荧光染色。

[0090] 实例 2 检测靶标

[0091] 图 2 表明, 用细胞系 RPMI8226、H929、和 MM. 1S 测试抗 -CD38 抗体的反应性, 表现最佳的抗体为克隆 240742。该细胞系使用直接抗 -CD38-FITC 缀合物进行初始测试, 但之后发现 FITC 缀合物不够适于在 CellTracks[®] 平台上检测。随后制备和测试这种抗体的 PE 缀合物, 并发现其适于检测

[0092] 实例 3 稀释液测定

[0093] 均为 APC 缀合物的抗 CD19 和抗 -CD45 被选为阴性检测标记物,当两者缺乏时指示异常血浆细胞。抗 -CD45APC 已经是 **CellSearch**[®] CTC 染色试剂的组分,所以没有必要进一步优化。并且因为在评价下没有骨髓瘤细胞系表达 CD19,所以使用 PBMC 来评价不同的抗 -CD19APC 克隆。对 PBMC 测试抗 -CD19 的结果可见于图 3。根据制造商的推荐方案对从 EDTA 和 CellSave 管上收集的 PBMC 进行染色。克隆 SJ25C1 被选为表现最佳的缀合物。然后于各种稀释度下以在 **AutoPrep**[®] 上使用的相同反应体积测试该缀合物,图 4。选择 1:5 的稀释度作为染色的最终稀释度。

[0094] 实例 4 染色 CD56 和 PBMC

[0095] 选择抗 -CD56 作为 FITC 标记物试剂,因为其在 75% 的具有异常表达的骨髓瘤病例中表达。根据制造商的推荐方案在细胞系(图 6)和 PBMC(图 5)上进行测试。选择 NCAM16.2 作为表现最佳的缀合物。

[0096] 实例 5CD56FITC 稀释液

[0097] 在各种稀释度下用 H929 细胞在 **AutoPrep**[®] 上测试抗 -CD56FITC 缀合物 NCAM16.2,见图 7-10。对细胞系没有明确的测试稀释度是最佳的。选择 1:4 的稀释度作为染色的最终稀释度,直到可测试患者样品以帮助确定最佳浓度。

[0098] 实例 6 图像

[0099] 然后构建由抗 -CD138 铁磁流体、染色试剂、和抗 -CD56FITC 标记物试剂组成的 CMMC 原型试剂盒,该染色试剂由抗 -CD38PE、抗 -CD45APC 和抗 -CD19APC 组成。该试剂盒的剩余组分为捕获增强试剂 (PN7037)、透化试剂 (PN7038)、核酸染料 (PN7041)、和 CellFix (PN7042)。第一轮测试使用在不同浓度下的抗 -CD138 铁磁流体。基于先前的流动数据,将最终抗 -CD38PE 浓度设定为 $1\mu\text{g/ml}$ ($5.7\mu\text{g/ml}$ 的染色试剂浓度)。最终抗 -CD45APC 浓度大约为 $2\mu\text{g/ml}$ ($13\mu\text{g/ml}$ 的染色试剂浓度 - 与 **CellSearch**[®] CTC 试剂盒中相同)并在染色试剂中 1:5 稀释抗 -CD19APC 缀合物原液。在标记物试剂瓶中以 1:4 的浓度使用抗 -CD56FITC。将 H929 细胞掺入 7.5ml 的 CellSave 血液并在 **AutoPrep**[®] 上以 135、185、220 和 $270\mu\text{g/ml}$ 的铁磁流体浓度处理。然后在 CellTracksAnalyzer II[®] 上分析样品,且在约 $220\mu\text{g/ml}$ 下 H929 细胞的回收率达到 55-60% 的平衡。

[0100] 因此,这决定了试剂盒中的最终铁磁流体浓度将为每 7.5ml 血样 $220\mu\text{g/ml}$,这类似于许多其他 **CellSearch**[®] 试剂盒中使用的浓度。

[0101] 回收 H929 和 MM.1S 细胞的 **CellTracks**[®] 图像可分别见于图 11 和 12。注意,H929 细胞的 CD56 染色相比 MM.1S 细胞较高。遗留白血细胞(CD38+/CD45+)可见于图 13。

[0102] 实例 7 患者样品

[0103] 共有 66 个多发性骨髓瘤患者样品进行了 CMMC 测试。从 Conversant 获得这些样品并且最初使用 **CellTracks**[®] CMMC 服务试剂盒测试 7.5ml 血液,但因为许多样品具有高数目的 CMMC 变得明显,所以作出决定降低测试血液的体积至 4mL。样品在 **CellTracks**[®] **AutoPrep**[®] 上处理,然后在 CellTracks Analyzer II[®] 上扫描。图 10 是由

患者的血样产生的数据表。多发性骨髓瘤患者中的 CMMC 范围为 0-17,000/4.0mL 血液。在 91% 的患者中检测到一个或多个 CMMC,在 68% 患者中 ≥ 5 ,在 58% 患者中 ≥ 10 而在 35% 患者中 ≥ 100 。在患者群体中 CD56 的表达高度可变。MGUS 患者中的 CMMC 范围为 0-112/4.0mL 血液。在 6/7 的患者中检测到一个或多个 CMMC,在 4/6 患者中 >5 ,在 2/6 患者中 >10 ,而在 1/6 患者中 >100 。图 14-17 示出了来自患者样品的一些代表性 CellTracks® 图像。

[0104] 表 1 说明

[0105] 阶段 :骨髓瘤细胞量值和特性的诊断分类,其包括阶段 I、II 和 III。随着阶段的进展,癌症细胞数从相对少数进展至中等再至相对多数。随着阶段的进展,附加的症状诸如 M 蛋白、贫血和血清钙也增加。

[0106] 处理状态 :反映疾病状态和处理方法

[0107] 处理类型 :药物或放射治疗

[0108] 体积 :在 CellSearch® 系统上处理外周血的体积

[0109] 总事件 :CellTracks® 浏览器图像的总数呈现给使用者用于多发性骨髓瘤细胞的手动分类

[0110] 总 MM 细胞 (CD38+, CD19/45-):使用者已确定符合多发性骨髓瘤 (MM) 细胞标准的来自总事件的图像总数。这些细胞为 CD38 阳性及 CD19/45 阴性。

[0111] CD38+、CD19/45-、CD56+ :为 CD56 阳性的多发性骨髓瘤细胞数

[0112] CD38+、CD19/45-、CD56- :为 CD56 阴性的多发性骨髓瘤细胞数

[0113] 未指定的事件 :总事件减去总 MM 细胞,其为使用者分类为多发性骨髓瘤细胞的事件。未指定的事件是白血细胞、计算机噪音、或其他未分类为 MM 细胞的碎片的组合。

[0114] 表 1 :CMMC 多发性骨髓瘤患者样品表

[0115]

样品	性别/ 年龄	处理状 态	处理类型	阶 段	体积 (mL)	总事 件	总 MM 细胞 CD38+、 CD45/19- CD56+	CD38+ 、 CD45/ 19- CD56+	CD38+ 、 CD45/ 19- CD56-	未指 定的 事件
----	-----------	----------	------	--------	------------	---------	---	-------------------------------------	-------------------------------------	----------------

[0116]

1	男/78	活性的	来那度胺 (Revlimid)、地塞 米松(Decadron)	II	7.5	5491	1	1	0	5490
2	男/66	活性的	硼替佐米 (Velcade)、盐酸 多柔比星脂质体 注射剂(Doxil)、 地塞米松	III	7.5	2118	4	3	1	2114
3	女/78	难治疗	后硼替佐米(Post Velcade)、盐酸多 柔比星脂质体注 射剂、地塞米 松、来那度胺	III	7.5	3179	16	15	1	3163
4	男/61	活性的	来那度胺、盐酸 多柔比星脂质体 注射剂	III	7.5	33090	20681	19399	1282	12409
5	男/54	前	N/A	I	7.5	4387	6	0	6	4381
6	女/62	活性的	地塞米松、盐酸 多柔比星脂质体 注射剂、硼替佐 米(Velcade)	II	7.5	6500	1931	1515	416	4569
7	女/63	后	NA		4	20383	16814			3569
8	男/56	活性的	地塞米松	II	7.5	21091	17779	0	17779	3312
9	男/57	活性的	放射		4	42388	16447	0	16447	25941
10	女/67	活性的	硼替佐米	I	7.5	3879	11	10	1	3868
11	男/48	活性的	硼替佐米、地塞 米松、盐酸多柔 比星脂质体注射 剂	III	7.5	8664	2	1	1	8662
12	女/53	活性的	硼替佐米	II	7.5	1102	3	2	1	1099
13	女/77	活性的	硼替佐米、地塞 米松	I	4	5104	23	8	15	5081
14	男/79	活性的	来那度胺、地塞 米松	III	4	2893	0	0	0	2893
15	女/68	活性的	环磷酰胺 (Cytosan)	III	4	960	3	0	3	957
16	女/40	活性的	硼替佐米	II	4	6937	5092	2213	2879	1845
17	女/41	后	NA		4	760	0			760
18	男/76	活性的	硼替佐米	II	4	1818	6	4	2	1812
19	男/53	活性的	地塞米松	I	4	6966	3	0	3	6963
20	女/76	活性的	硼替佐米	III	4	1630	26	4	22	1604
21	女/79	复发	NA	III	4	12834	5428	2451	2977	7406
22	女/80	后	在之间		4	9472	4	1	3	9468

[0117]

23	女/80	前	NA		4	2408	145			2263
24	女/80	前	NA		4	1197	249			948
25	男/79	活性的	硼替佐米	II	4	6792	788	68	720	6004
26	男/79	活性的	帕洛诺司琼、盐酸多柔比星脂质体注射剂、长春新碱(Vincristin)		4	17128	103	18	85	17025
27	男/73	后	NA		4	552	48	34	14	504
28	男/74	后	NA		4	584	22	5	17	562
29	男/74	后	NA		4	5293	13			5280
30	男/59	活性的	硼替佐米、盐酸多柔比星脂质体注射剂		4	2302	3	1	2	2299
31	女/60	后	NA		4	1237	148	110	38	1089
32	女/60	后	NA		4	4436	89	81	8	4347
33	女/61	之间	NA		4	1804	27			1778
34	女/61	前	NA		4	3941	99	27	72	3842
35	女/61	活性的	硼替佐米		4	2126	14			2112
36	女/61	活性的	硼替佐米		4	1289	7			1282
37	女/69	活性的	来那度胺		4	934	38	26	12	896
38	女/69	活性的	环磷酰胺(Cytosan)		4	890	12	0	12	878
39	女/72	活性的	盐酸多柔比星脂质体注射剂、硼替佐米		4	669	0	0	0	669
40	女/59	活性的	盐酸多柔比星脂质体注射剂、硼替佐米		4	4921	335	100	235	4586
41	女/59	活性的	盐酸多柔比星脂质体注射剂、硼替佐米		4	3098	221	37	184	2877
42	女/60	活性的	硼替佐米		4	272	0	0	0	272
43	女/60	活性的	硼替佐米		4	277	1			276
44	女/61	活性的	盐酸多柔比星脂质体注射剂、硼替佐米		4	2511	253	171	82	2258
45	女/61	活性的	盐酸多柔比星脂质体注射剂、硼替佐米		4	933	215	46	169	718
46	女/61	前	NA		4	2264	95			2169
47	男/70	活性的	盐酸多柔比星脂质体注射剂、美法仑(Melphalan)		4	1300	0	0	0	1300

[0118]

48	男/75	活性的	硼替佐米	4	4658	2	0	2	4656
49	男/63	后	NA	4	14448	1	0	1	14447
50	男/76	后	择泰(Zometa)	4	25095	2	1	1	25093
51	女/68	后	择泰	4	5099	5	0	5	5094
52	男/71	活性的	帕洛诺司琼 (Aloxi)、盐酸多 柔比星脂质体注 射剂、长春新碱 地塞米松和来那 度胺	4	18684	49	9	40	18635
53	女/45	活性的	度胺	4	3285	0	0	0	3285
54	男/78	后	NA	4	2182	16	0	16	2166
55	女/62	活性的	硼替佐米	4	1481	15	11	4	1466
56	女/63	前	NA	4	5681	581			5100
57	女/63	前	NA	4	1530	389			1141
58	男/75	前	NA	4	14232	199	4	195	14033
59	女/63	后	NA	4	9610	1	0	1	9609
60	男/79	活性的	放射	4	4121	4121	0	4121	0
61	男/62	后	NA	4	1494	8			1486
62	女/59	活性的	硼替佐米 (Bortezomib)	4	1956	398			1558
63	男/50	活性的	来那度胺 (Lenalidomide)	4	1276	7			1269
64	男/62	活性的	多柔比星 (Doxirubicin)	4	9470	1842			7628
65	男/60	后	NA	4	1055	2	0	2	1053
66	男/53	活性的	硼替佐米 (Bortezomib)	4	813	376	131	244	437

[0119] 实例 8 正常受试者

[0120] 然后也如此测试二十二年龄匹配的正常受试者。也从 Conversant 获得这些样本并使用 CellTracks[®] CMMC 服务试剂盒测试 4ml 的血液。样品在 CellTracks[®] AutoPrep[®] 上处理,然后在 CellTracksAnalyzer II[®]上扫描。表 2 是由 4ml 血样产生的数据表。在来自正常供体的 4.0mL 血液中,在 12/22 (55%) 样品中检测到 0CPC,而在 10/22 (45%) 样品中检测到低数目(1-6CPC)。有趣地,有一个 CD56 阳性 CPC 存在于正常供体中。参见图 18。总浏览器事件的平均数量大约为 1500。

[0121] 为进一步表征 CMMC,并从 CMMC 中区分 CPC,开发间期荧光原位杂交 (FISH) 测定法以与上述的捕获和检测系统一起使用。使用四色 FISH 探针同时检测高风险的突变,该突变包含 IgH 基因座 (t(4;14) (p16;q32) 和 t(14;16) (q32;q23)) 的两个频发易位,以及 TP53 基因座 (Δ 17p13) 的缺失。在细胞系 H929、MM1s、和 U266 上检验 FISH 测定法,其分别示出了在 t(4;14), t(14;16) 和 Δ 17p13 处的突变。在 9 个 CMMC 患者样品上测试 FISH 测定法,并且 8 个样品得到了可评价的结果。两个样品示出了 t(4;14) 融合,3 个患者示出了异常的 FISH 信号模式,指示 4 或 14 染色体的非整倍体,而剩余患者示出了正常的 FISH 模式。

[0122] 表 2 :来自 4ml 年龄匹配的正常血液供体的 CMMC 表

[0123]

样品	性别/年龄	体积(ml)	总事件	CD38+、 CD45/19- CD56+	CD38+、 CD45/19- CD56-	未指定的 事件
1	女/43	4	3281	0	1	2538
2	男/71	4	1939	0	0	759
3	女/54	4	3584	0	1	2794
4	女/61	4	399	0	0	102
5	女/70	4	645	0	0	114
6	女/60	4	526	0	0	273
7	女/49	4	273	0	0	80
8	女/55	4	2502	1	2	1559
9	男/47	4	811	0	1	209
1	女/55	4	1512	0	2	940
11	男/42	4	1032	0	0	485
12	女/54	4	576	0	0	287
13	男/44	4	6211	0	1	4742
14	女/55	4	1891	0	0	1182
15	男/43	4	1233	0	0	745
16	男/50	4	816	0	0	524
17	女/50	4	661	0	1	362
18	女/55	4	668	0	1	367
19	男/60	4	1621	0	0	696
20	女/58	4	414	0	0	249
21	女/60	4	2221	0	1	2220
22	男/51	4	762	0	6	756

[0124] 实例 9 使用抗 CD-38 和抗 CD138 患者样品的捕获

[0125] 抗 CD138 为缀合至用于捕获本发明中的骨髓瘤细胞的胶态磁性颗粒的细胞表面标记物,随着时间的推移其可从骨髓瘤细胞表面脱落。CD38 为也存在于骨髓瘤细胞上的表面标记物,其不经历从细胞表面脱落。开发磁性纳米颗粒,该磁性纳米颗粒被联接到抗 -CD138 和抗 -CD38 两者且用患者样品和正常供体测试其捕获骨髓瘤细胞能力。抗 -CD38 和抗 CD138 两者缀合至藻红蛋白 (PE),且均识别与用于制作磁性纳米颗粒的抗 CD38 和抗 CD-138 不同的抗原决定部位,该两者和缀合至别藻蓝蛋白 (APC) 的抗 -CD45 和抗 -CD19 一起用于检测。

[0126] 用替换的捕获试剂对共 22 个多发性骨髓瘤患者的样品测试 CMMC。从 Conversant 获得这些样品并在 CellTracks® AutoPrep® 上处理 4ml 样品,然后在 CellTracks Analyzer II® 上扫描。表 3 是由患者样品产生的表。多发性骨髓瘤患者中的 CMMC 范围为 0-2244/4.0mL 血液。在 82% 的患者中检测到一个或多个 CMMC,在 64% 患者中 > 为 5,在 59% 患者中 > 为 10,而在 23% 患者中 > 为 100。

[0127] 表 3 :来自多发性骨髓瘤患者的 CMMC

[0128]

样品	总事件	CD38+、CD138+CD19/45- 细胞	未指定的事件
1	19065	737	18328
2	5420	433	4987
3	6098	12	6086
4	7680	22	7658
5	26561	2244	24317
6	7682	52	7630
7	18621	63	18558
8	14889	111	14778
9	7039	13	7026
10	12608	15	12593
11	9708	2	9706
12	34273	5	34268
13	21771	182	21589
14	7097	0	7097
15	2988	3	2985
16	7936	1	7935
17	10879	69	10810
18	4990	0	4990
19	6153	12	6141
20	4248	0	4248
21	13757	0	13757
22	3334	1	3333

[0129] 实例 9 使用抗 -CD38 和抗 CD138 正常样品的捕获

[0130] 然后使用与实例 8 相同的试剂盒配置,也如此测试十二个正常供体。这些样品在机构供体中并在 **CellTracks[®] AutoPrep[®]** 上处理 4ml 的血液,然后在 **CellTracks Analyzer II[®]** 上扫描。表 4 是由 4mL 血样产生的表。在来自正常供体的 4.0mL 血液中,在 5/12 (42%) 的样品中检测到了 0CPC,而在 7/12 的样品 (58%) 中检测到低数目 (1-3CPC)。

[0131] 表 4 来自正常供体的 CPC

[0132]

样品	总事件	CD38+CD138+、CD19/45- 细胞	未指定的事件
1	7120	2	7118
2	13075	3	13072
3	9208	3	9205
4	29057	3	29054
5	20525	1	20526
6	19619	2	19617
7	6004	1	6003
8	14456	0	14456
9	8528	0	8528
10	7966	0	7966
11	17311	0	17311
12	5924	0	5924

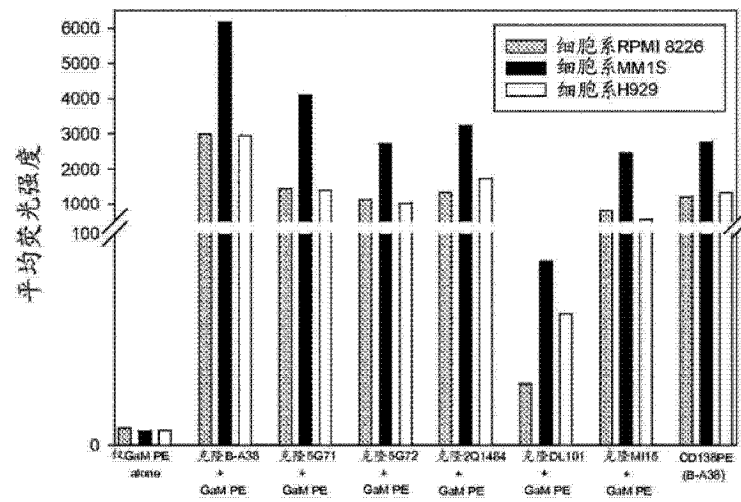


图 1:CD138 对细胞系 H929、MM. 1S 和 RPMI8226 染色

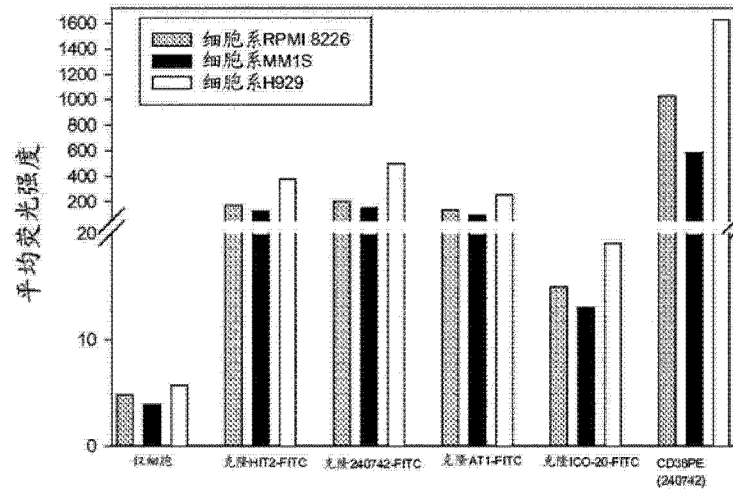


图 2 :CD138FITC 和 PE 对细胞系 RPMI8226、H929、和 MM. 1S 染色

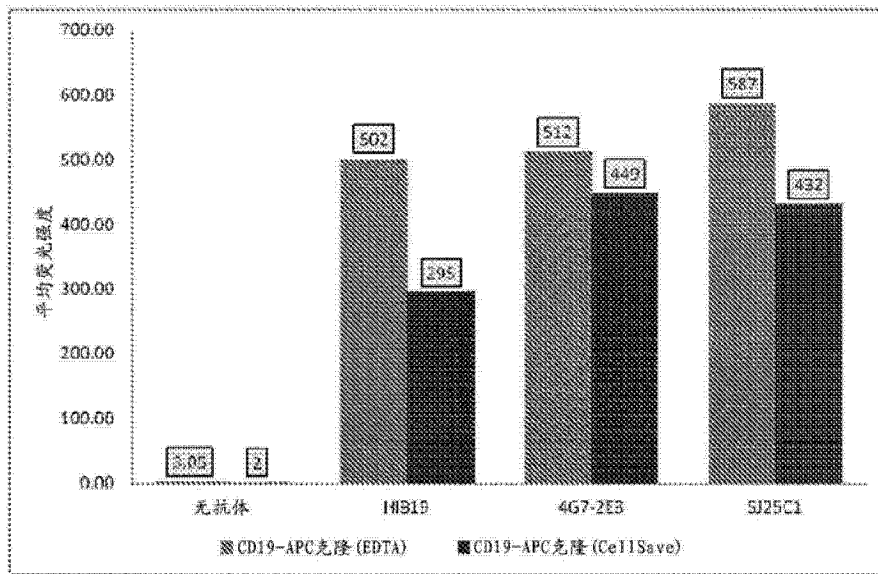


图 3:CD19APC 对 PBMC 染色

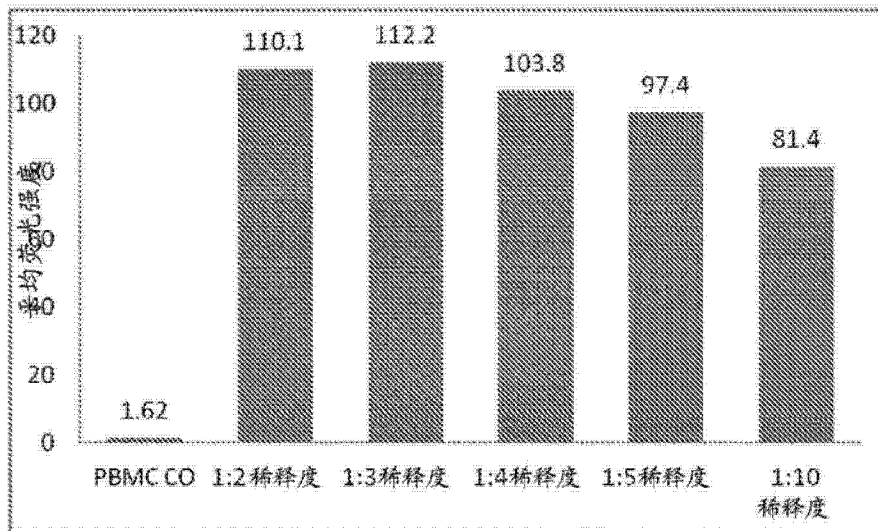


图 4: 在各种稀释度下 PBMN 的 CD19APC 染色

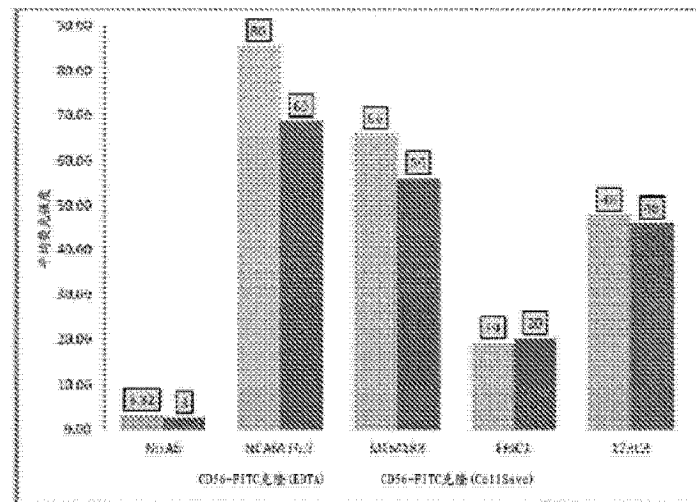


图 5 :CD56FITC 对 PBMC 的染色

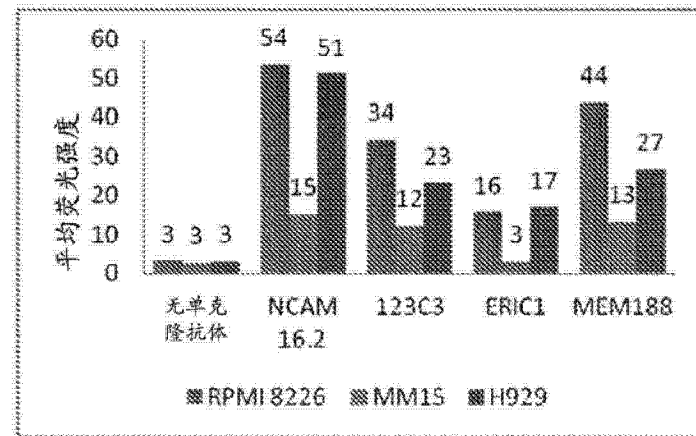


图 6 :CD56FITC 对细胞系的染色

无CD56 FITC

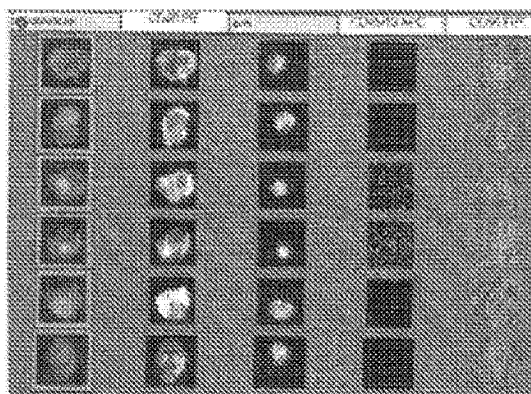


图 7: 在各种稀释度下 CD56FITC 对 H929 细胞的染色

CD56 FITC的1: 5稀释液

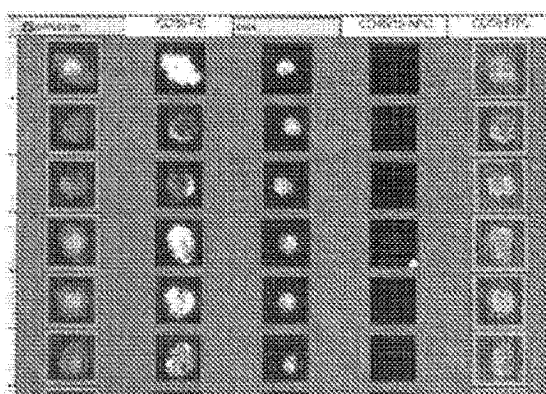


图 8

CD56 FITC的1: 4稀释液

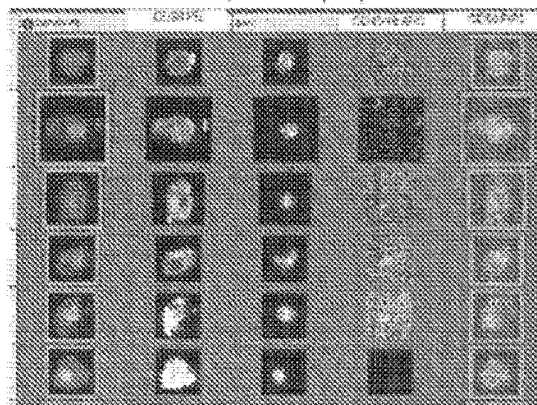
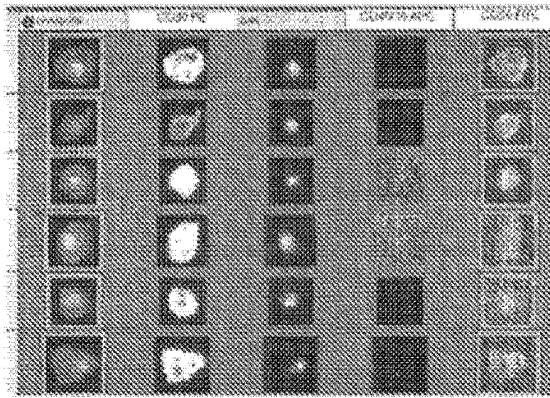


图 9

CD56 FITC的1:3稀释液



MM.1S细胞

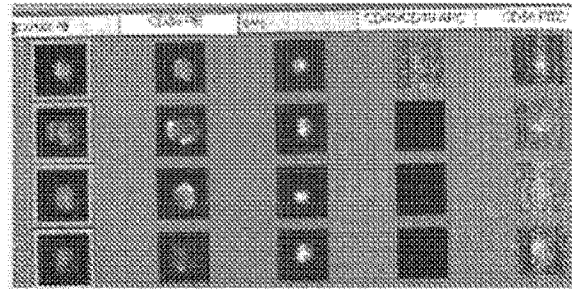


图 10

图 11: 回收自 CellSave 血液的细胞系 H929 和 MM.1S 的CellTracks®图像

H929细胞

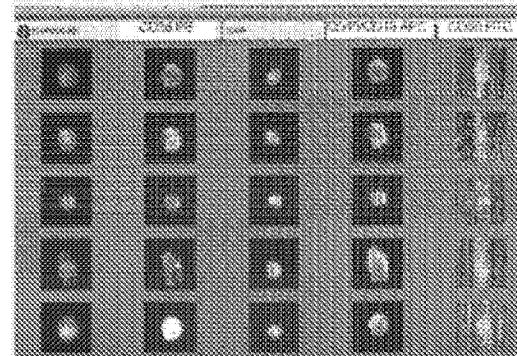
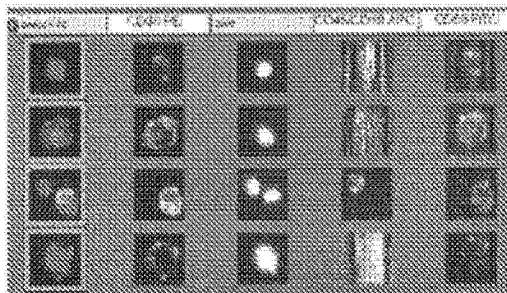


图 12

图 13: 来自 CellSave 血液的遗留白血细胞的CellTracks®图像

样品号:7

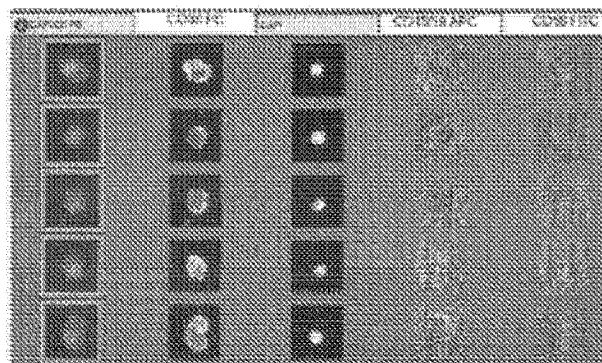


图 14: 多发性骨髓瘤患者样品的CellTracks®图像

样品号: 8

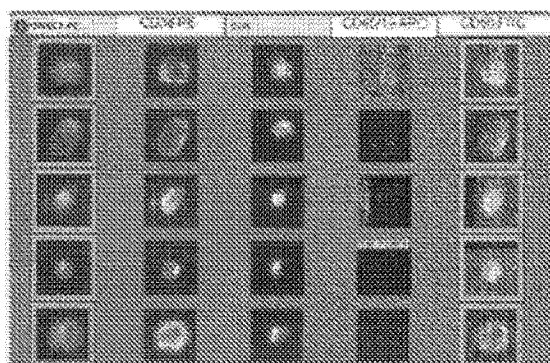


图 15

样品号: 4

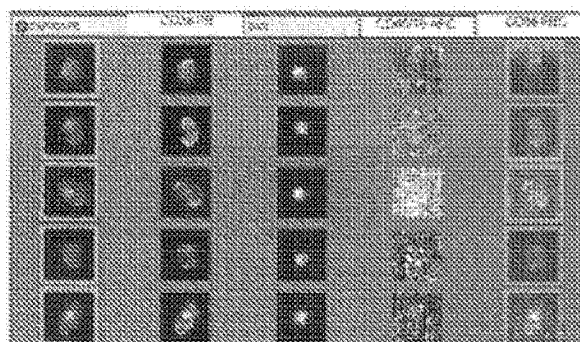


图 16

样品号: 6

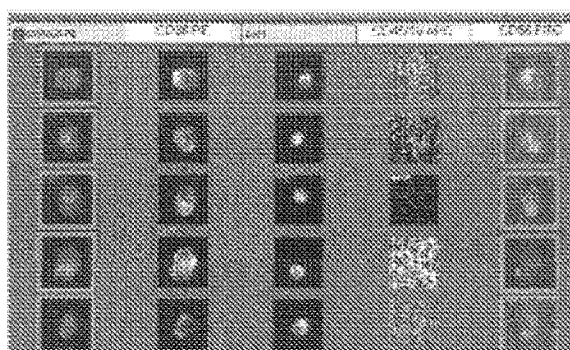


图 17

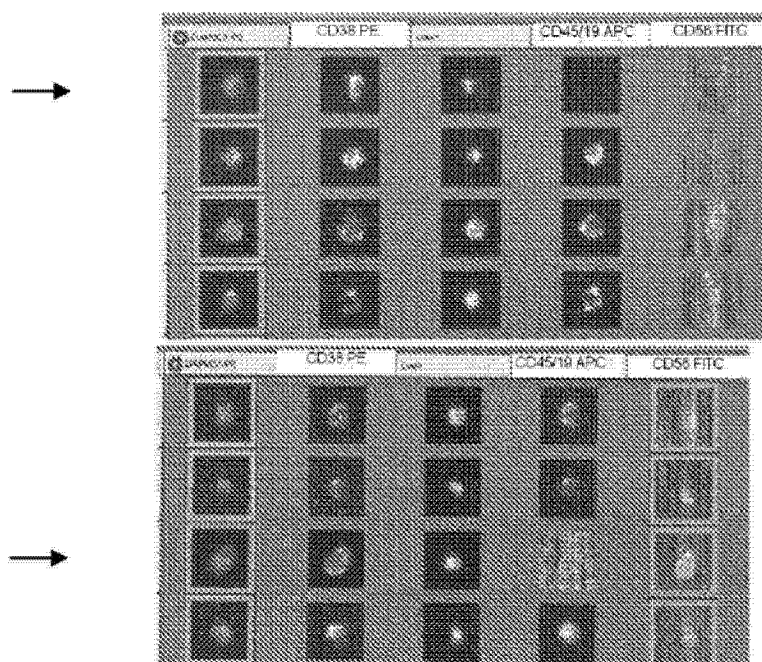
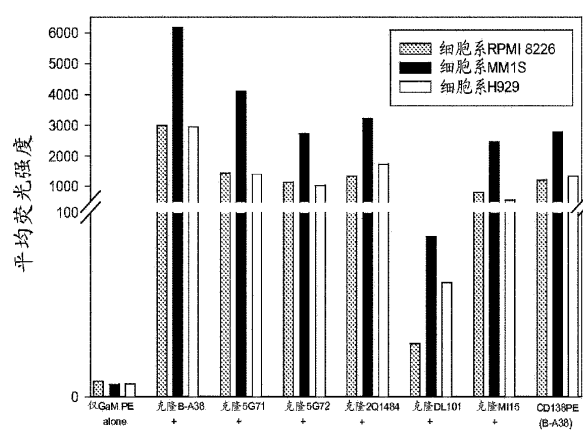


图 18: 来自正常供体的 CD38⁺、CD45/19⁻ 细胞的CellTracks®图像 (箭头)

专利名称(译)	从血液中捕获和检测循环多发性骨髓瘤的测定法		
公开(公告)号	CN103826750A	公开(公告)日	2014-05-28
申请号	CN201280046226.4	申请日	2012-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	詹森诊断器材有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	詹森诊断器材有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	詹森诊断器材有限责任公司		
[标]发明人	S 格罗斯 M C 康内利 G C 劳 M 马塔 C 莫拉诺		
发明人	S.格罗斯 M.C.康内利 G.C.劳 M.马塔 C.莫拉诺		
IPC分类号	B03C1/01 G01N33/49 G01N33/53 G01N33/58		
CPC分类号	B03C1/01 B03C1/28 B03C2201/26 G01N33/57426 G01N33/57492		
代理人(译)	林毅斌 梁谋		
优先权	61/510170 2011-07-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明包括分离循环多发性骨髓瘤细胞的方法以及治疗被怀疑患有异常血浆细胞疾病的患者的方法。



CD138对细胞系H929、MM. 1S和RPMI 8226染色