

(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2007-526469

(P2007-526469A)

(43) 公表日 平成19年9月13日(2007.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48 P	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Y	2 G O 5 4
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 D	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/49 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/49 K	
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-501297 (P2007-501297)	(71) 出願人	506299962 ユニバーシダド デ サラマンカ
(86) (22) 出願日	平成17年3月3日(2005.3.3)		スペイン国, イー37008 サラマンカ
(85) 翻訳文提出日	平成18年9月4日(2006.9.4)		, パチオ デ エスキューラス 1
(86) 国際出願番号	PCT/ES2005/000108	(74) 代理人	100074192
(87) 国際公開番号	W02005/085845		弁理士 江藤 剛
(87) 国際公開日	平成17年9月15日(2005.9.15)	(72) 発明者	オルファオ デ マトス カーレイア イ
(31) 優先権主張番号	10/791,994		ー バーレ アルベルト
(32) 優先日	平成16年3月3日(2004.3.3)		スペイン国, イー37008 サラマンカ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		, パチオ デ エスキューラス 1, ユニ
		(72) 発明者	バーシダド デ サラマンカ
			ベドレイラ カルロス エドアルド
			スペイン国, イー37008 サラマンカ
			, パチオ デ エスキューラス 1, ユニ
			バーシダド デ サラマンカ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 流体血球計算測定を使用する最小疾患レベルを監視するのに使用される腫瘍性細胞中の異常表現型の多次元検出方法

#### (57) 【要約】

骨髓、抹消血、脊髄およびリンパ節に存在する腫瘍性細胞によって発現される異常な表現型を検出するための方法は、以下の工程、すなわち、1) 1つまたはそれ以上の正常/反応サンプルおよび1つの腫瘍性のサンプルを単クローン性の抗体の同一または部分的に重なり合っている多数の組み合わせにより個別に染色し、2) 流体血球計算を使用して、正常/反応サンプルおよび腫瘍サンプルからの単クローン性の抗体の組み合わせで染色された多数の細胞に関連付けられた蛍光放出を連続して測定し、3) 分析された各個の細胞の特別な光散乱および蛍光特性についての情報を各々含んでいる2つの独立したリストモードデータファイルを記憶し、4) 既知の比率で、正常/反応サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいるテータファイルに、腫瘍サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいるテータファイルからのリストモードデータを混ぜ合わせることによって新たなデータファイルを作成し、5) 正常な細胞に対応する事象によって占有されるそれらの区域および正常/反応サンプル中の空の空間に対応しかつ腫瘍性サンプル中の腫瘍細胞によって占有されているそれらの区域を形成し、6) 続いて、多次元空間内に共存している腫瘍性細胞に対応するそれらの事象および正常細胞に対応する事象を識別し、そして7) それらの正常な同等物に比較されるような腫瘍性細胞によって表示される最も関連のある表現型の異常を確立する工程を含んでいる。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

腫瘍性細胞によって表現される異常表現型の識別方法において、

a) 1つまたはそれ以上の正常/反応サンプルおよび単クローン性の抗体の重なり合っている多数の組み合わせを有する1つの腫瘍性のサンプルを個別に染色し、各組み合わせ中の各単クローン性の抗体は異なる蛍光色素に接合されかつ各組み合わせは少なくとも3つの蛍光色素接合の単クローン性の抗体を共通に有し、

b) 流体血球計算を使用して、前記正常/反応サンプルおよび腫瘍サンプルからの単クローン性の抗体の前記組み合わせの各々で染色された多数の細胞に関連付けられた蛍光放出を連続して測定し、

c) 一方が前記正常/反応サンプルから分析された各細胞の特別な光散乱および蛍光特性についての情報を含みかつ他方が前記腫瘍サンプルから分析された各細胞の特別な光散乱および蛍光特性についての情報を含んでいる2つの独立したリストモードデータファイルを記憶し、

d) 既知の比率で、前記正常/反応サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいる前記データファイルに、前記腫瘍サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいる前記データファイルからの細胞事象を混ぜ合わせることによって新たなデータファイルを作成し、

e) 光散乱および蛍光放出の流体血球計算測定によって発生された多次元空間に、正常な細胞に対応する事象によって占有されるそれらの区域および正常/反応サンプル中の空の空間に対応しかつ腫瘍性サンプル中の腫瘍細胞によって占有されているそれらの区域を形成し、

f) 工程 e) に記載されたように混ぜ合わされた前記データファイルにおいて、光散乱および蛍光放出の流体血球計算測定によって発生された多次元空間に同時に存在している正常細胞に対応する事象と異なるような腫瘍性細胞に対応するそれらの事象を連続して識別し、

g) 前記混ぜ合わされたデータファイル中にそれらの明白な、高感度のかつ特別な識別を許容するそれらの正常な同等物に比較されるような腫瘍性細胞によって表示される最も関連のある表現型の異常を確立することを特徴とする異常表現型の識別方法。

**【請求項 2】**

前記サンプルは末梢血からなることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

**【請求項 3】**

前記サンプルは骨髄からなることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

**【請求項 4】**

前記サンプルは脊髄からなることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

**【請求項 5】**

前記サンプルはリンパ節からなることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

**【請求項 6】**

1つ以上の任意に選択された正常なサンプルが染色されることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

**【請求項 7】**

1つ以上の正常なサンプルが染色され、すべて正常なサンプルは人間の良好に定義されたグループからまたはそれらの性別に応じて定義されかつ非腫瘍性条件下にある人間のあらゆる他のグループから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

**【請求項 8】**

10

20

30

40

50

前記腫瘍性サンプルは1つまたはそれ以上の種々の型の造血腫瘍細胞を含んでいることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項9】

前記腫瘍性サンプルは1つまたはそれ以上の種々の型の非造血腫瘍細胞を含んでいることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項10】

前記腫瘍性サンプルは造血および非造血の両方の腫瘍細胞を含んでいることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項11】

前記腫瘍性サンプルは最初の診断、再発および診断後のあらゆる時間的周期で得られることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。 10

【請求項12】

前記腫瘍性サンプルは高いまたは最小数の腫瘍細胞を含むことができることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項13】

前記サンプルは得られた後に直接染色されることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項14】

前記サンプルは生体外で培養された後に染色されることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。 20

【請求項15】

腫瘍性サンプルおよび正常/反応サンプルを染色するのに使用される多数の組み合わせの単クローン抗体のパネルは同一であることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項16】

腫瘍性サンプルを染色するのに使用される多数の組み合わせの単クローン抗体のパネルは正常/反応サンプルを染色するのに使用される多数の組み合わせの単クローン抗体のパネルより短く前者のパネルは後者のパネルに完全に含まれることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項17】

単クローン抗体の組み合わせのパネルの各対に関して、単クローン抗体の各個の組み合わせに使用される各単クローン抗体の正確なクローン、および接合される蛍光色素は単クローン抗体の組み合わせの2つのパネルにおいて同一であることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。 30

【請求項18】

各組み合わせに含まれる単クローン抗体の数は4つまたはそれ以上の異なる単クローン抗体試薬からなることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項19】

前記すべての組み合わせに共通で、単クローン抗体試薬の数は3つまたはそれ以上の異なる単クローン抗体からなることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。 40

【請求項20】

正常/反応サンプルおよび腫瘍性サンプルの対を染色するのに使用される正確な単クローン抗体は前記腫瘍性サンプルに含まれる腫瘍細胞の型、系および成熟段階に依存して変化できることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項21】

少なくとも4つの異なる蛍光色素が使用され、各々異なる単クローン抗体に接合されており、各蛍光色素の蛍光放出は他の蛍光色素接合単クローン抗体の蛍光放出から区別されることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項22】

互換性のある蛍光色素の組み合わせは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC) 50

)、フィコエリトリン ( P E )、ペリジクロロフィルプロテイン ( P e r C P )、アロフィコシアニン、アレクサフルオール 4 8 8、アレクサ 6 4 7、パシフィックブルー、アレクサフルオール 4 0 5、シアニン 5 ( C y 5、シアニン 5 . 5 ( C Y 5 . 5 ) および P E に、A P C に、または P e r P C ( P E / C y 5 , P E / C y 5 . 5 , P E / C y 7 , A P C / C y 7 および P e r P C / C y 5 . 5 ) に結合されたその共役または追加の互換性のある蛍光色素または蛍光色素共役から選択されることを特徴とする請求項 2 1 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 2 3】

同一サンプルの種々繰り返しアリコートを染色するのに使用されるパネル中に含まれる蛍光色素に接合された単クローン抗体の各組み合わせにより染色されるそれらの事象の光散乱および蛍光測定についての情報は別個のデータファイルに最初に記憶されることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

10

【請求項 2 4】

同一サンプルの種々繰り返しアリコートを染色するのに使用されるパネル中に含まれる蛍光色素に接合された単クローン抗体のすべての異なる組み合わせにより染色されるそれらの事象の光散乱および蛍光測定についての情報は単一のデータファイルに記憶されることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 2 5】

2 つの異なるデータファイルからの情報はあらゆる補正なしに直接混ぜ合わされることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

20

【請求項 2 6】

2 つの異なるデータファイルからの情報は予め確立された標準に従って測定された細胞事象の集団の相対的な位置を調整した後に混ぜ合わされることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 2 7】

前記予め確立された標準は基準微粒子であることを特徴とする請求項 1 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 2 8】

基準微粒子の集団は均一であることを特徴とする請求項 2 7 に記載の異常表現型の識別方法。

30

【請求項 2 9】

基準微粒子の集団は異なるサイズ、密度、容量、形状、蛍光量、付着特性または他の物理 - 化学特性の微小ビーズの多数の集団からなることを特徴とする請求項 2 7 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 3 0】

微小粒子の集団は蛍光粒子からなることを特徴とする請求項 2 7 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 3 1】

微小粒子の集団はその表面が抗免疫グロブリン抗体で被覆される微小粒子からなることを特徴とする請求項 2 7 に記載の異常表現型の識別方法。

40

【請求項 3 2】

微小粒子の集団はその表面が抗免疫グロブリン抗体で被覆される蛍光微小粒子の混合物からなることを特徴とする請求項 2 7 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 3 3】

前記微小粒子は既知の数において追加されることを特徴とする請求項 2 7 に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項 3 4】

単クローン抗体の同一のパネルで染色された 1 つまたはそれ以上の正常 / 反応サンプルに含まれる細胞の光散乱および蛍光測定についての情報を含んでいるデータファイルへの多数の単クローン抗体のパネルで染色された腫瘍性のサンプルに対応するデータファイル

50

からの事象の系列希釈は少量の腫瘍細胞が予め定義された既知の比率で正常/反応細胞に希釈されると検出することができる感度を評価するようにしたことを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項35】

細胞活性および細胞機能に関連付けられる抗原の異常パターンが検出されることを特徴とする請求項1に記載の異常表現型の識別方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、骨髓、末梢血、脊髄およびリンパ節中に存在する腫瘍性細胞によって表現される異常な表現型の検出の感度、特異性および再現可能性を改善するための新規な方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本発明は、流体血球計算かつとくに腫瘍性細胞についてのプロテイン表現の異常なパターンの連続的検出および血液、骨髓、脊髄およびリンパ節サンプルの主要集団中に存在する最小数の腫瘍性細胞の識別の分野に関する。この発明は、1)それらの高感度および特別な識別を許容する腫瘍性細胞によって支持される異常な表現型の明白な識別、2)同時にかつ続いて得られる同一の人間からの他のサンプル中に同一に異常な表現型を表示している最小数の腫瘍性細胞の識別に関するそれらの有用性の評価、および定量化された微小ビーズ(微小粒子)懸濁液と混合された単クローン抗体の多数の組み合わせで染色されたサンプル中に存在する細胞の多重パラメータ流体血球計算分析によって、サンプルのマイクログリッターあたりの細胞のパーセンテージおよび細胞の数の両方に関して血液、骨髓、脊髄およびリンパ節サンプル中の腫瘍性細胞の分布の計算を可能にする。

20

【0003】

米国特許第5,047,321号明細書において、ロッケンおよびタースタッパンは体液中の細胞成分の多重パラメータ分析を記載した。記載された体液は血液および骨髓を包含していた。2つの核酸色素、蛍光的に分類された単クローン抗体および2つの光散乱パラメータの組み合わせを使用して、ロッケンおよびタースタッパンは血液および骨髓の種々の細胞成分を識別し、各成分中の細胞の数をカウントしかつそれらの各々の微分解析を提供することを可能にした。全体の血液および骨髓吸引物についての前方および側方光散乱の測定とともに、LDS-751(エクスシトン)DNA-色素、チアゾルオレンジ(TO、モレキュラー・プローブズ社)および蛍光的に分類されたアンチ-CD45単クローン抗体による組み合わせされた染色により、これらの著者は、核にされた赤血球、エリトロサイト(赤血球)、網状赤血球、血小板、リンパ細胞、単核細胞、好中性の顆粒球、好塩基性の顆粒球、好酸性の顆粒球および核にされたすべての細胞の前駆体間の識別および区別を可能にした。しかしながら、彼らは、同一サンプル内に同時に存在する正常なおよび腫瘍性の細胞間で特別に区別するようなこのアプローチの可能性を示すことができなかつた。

30

40

【0004】

米国特許第6,287,791号明細書において、タースタッパンおよびチェンは、米国特許第5,047,321号のさらに他の改善を記載しているが、彼らは種々の白血球集団の良好なあらゆる特徴付けを示さなかつた。

【0005】

米国特許第5,137,809号明細書において、ロッケンおよびシャは骨髓中の細胞成分の多重パラメータ分析を記載している。著者等は、第1段階で、すべての白血球を染色するために、異なる蛍光色素により各々分類された単クローン抗体の組み合わせかつ、第2段階で、白血球の選択された集団を染色するためにさらに他の組み合わせの使用を記

50

載している。

【0006】

上述したすべての方法は血液および骨髄中に存在する正常な白血球の幾つかの集団を識別することができかつ使用される単クローン抗体および核酸色素の特別な組み合わせによって識別されるような選択された副次集団を単に識別しており；それにも拘らず、それらはサンプル中の正常な細胞と自然にまたは人工的に混合された腫瘍性細胞の特定のかつ再生可能な識別に関するアプローチを提供することができなかった。また、これらのアプローチは全体の白血球のパーセンテージに関して識別される正常な白血球の副次集団の計数を許容する。そのうえ、これらの方法を使用することにより、とくに、サンプルが同一の人間の異なる組織から、異なる人間から得るかまたはそれらが異なる条件下で測定される場合に、第1のサンプル中に含まれる細胞に関して測定された光散乱および蛍光の量についての情報を第2の異なるサンプルに含まれている細胞の情報に容易に結合しかつ直接比較することができない。

10

【0007】

米国特許第5,627,037号明細書において、ワード等は、付与された量の血液サンプルに含まれる1つまたはそれ以上の細胞集団の数の計算についての1段階技術を提案している。このアプローチは1つまたはそれ以上の細胞マーカー、蛍光の定量化された微小粒子および定着剤からなる混合物を含んでいる試薬の混合物を使用している。ワード等によって記載された技術はCD4+T-細胞のような、白血球の絶対カウントの計算を許容するが、血液白血球の個々の副次集団の計数に応用されるような正確な手順のあらゆる特別な指示を提供していない。

20

【0008】

この10年の間に、血液学的悪性を患っている大多数の患者からの腫瘍性細胞が流動血球計算により分析される単クローン抗体の幾つかの三重または四重の組み合わせによって検出されるような抗原発現の異常なパターンを表示することを示す多くの種々の報告が公開されている(ビドリアルズ等によって概説された、Best Clin Res Pract, 2003; 16: 599-612)。これらの抗原発現の異常なパターンは正常な細胞には決して検出されずそしてそれらは、以下の副次型、すなわち、1)クロス-リネアージ(交差血統)抗原発現、2)非同期抗原発現、3)抗原過剰および過小発現、4)異常に高いまたは低い光散乱特性、および5)転移表現型の1つまたはそれ以上を含んでいる。これらの異常性に基づいて、単クローン抗体試薬の3および4色の組み合わせの幾つかの疾病型の特別なパネルが、他の疾病中で、実際に、前駆体B-急性リンパ性白血病(BCP-ALL; ルシコ等、白血病、2001年、第15巻、第1185頁乃至第1192頁)、T-ALL(ポーウィット-マクドナルド、白血病、2000年、第14巻、第816頁乃至第825頁)、急性骨髄芽球性白血病(AML; サン・ミゲル等、血液、2001年、第98巻、第1746頁乃至第1751頁)、B-細胞慢性リンパ細胞白血病(ローストローム等、血液、2001年、第98巻、第29頁乃至第35頁)および他のB-細胞慢性リンパ増殖疾患(サンチェス等、白血病、2002年、第16巻、第1460頁乃至第1469頁)を有する患者ごとに、異常表現型を発現している白血病細胞の組織的識別に関して提案されている。

30

40

【0009】

腫瘍性細胞によって発現される異常表現型の識別に関してこれまでされたすべてのアプローチにおいて、データ解釈は、正常な細胞についてのタンパク質(プロテイン)発現に関する広範囲な知識を有する経験を積んだ人間によって実施される。このアプローチによって、とくに3つまたは4つの単クローン抗体の組み合わせの比較的大きなパネルがそれらの識別に使用される場合に、最初の診断でかつ再発で研究された患者からの腫瘍性細胞が1つまたはそれ以上の異常な表現型を頻繁に示すことが明らかにされた。診断において検出されたすべての異常な表現型に基づいて、これらの腫瘍性細胞-特別な表現型の特別な検討のための単クローン抗体の新たな3または4色の組み合わせが同時に(例えば、段階付け目的のために)および引き続いて(例えば、疾病および療法を監視するために)得

50

られた他のサンプル中の腫瘍性細胞による最小侵入の検討のためのそれらのさらに他の使用に設計されかつ試験される。しかしながら、正常対腫瘍性細胞に異なって観察されるタンパク質発現のパターンについての高度の知識および経験を有する専門家によるデータ解釈の要求は異常な表現型の識別を主観的にかつ再生を困難にする。そのうえ、多くの異常な表現型は付与された細胞中に存在するすべての白血球細胞の部分集合中にのみ存在しかつそれらは、時間の経過により、同一の患者において、かつ同一の組織からの他のサンプルにおいても同様に变化する。これは、さらに、異常表現型の識別を、潜在的に発生している擬似の負のかつ正の結果により、主観的とは別に、不確かにする。加えて、 $10 \cdot \text{sup} \cdot -4$ 以下の周波数で発生している血液、骨髄、脊髄およびリンパ節からの正常な細胞の表現型についての現行の知識は非常に制限されており；これは、大多数の正常な血液および骨髄細胞中の最小数の腫瘍性細胞を検出するためのこれらのアプローチの感度に負に影響を与え、それは、最良の技術および生物学的条件下で、腫瘍性細胞の正確な血統、型および成熟の段階、腫瘍性細胞の識別に使用される異常な表現型、および研究される試料の型に依存して、一般に、 $10 \cdot \text{sup} \cdot -3$  ( $1000$ 個の通常細胞中の1つの腫瘍性細胞の検出)および $10 \cdot \text{sup} \cdot -6$  ( $100$ 万個の通常細胞中の1つの腫瘍性細胞)の間にある。

10

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

本発明は、以下の工程、すなわち、1) 1つまたはそれ以上の正常/反応サンプルおよび1つの腫瘍性のサンプルを同一または部分的に重なり合っている単クローン性の抗体の多数の組み合わせにより個別に染色し、各組み合わせ中の各単クローン性の抗体は異なる蛍光色素に接合されかつ各組み合わせは少なくとも3つの蛍光色素接合の単クローン性の抗体を共通に有しており、2) 流体血球計算を使用して、正常/反応サンプルおよび腫瘍サンプルからの単クローン性の抗体の組み合わせの各々で染色された多数の細胞に関連付けられた蛍光放出を連続して測定し、3) 分析された各個の細胞の特別な光散乱および蛍光特性を各々含んでおり、一方が正常/反応サンプルから細胞に対応する情報を含みかつ他方が腫瘍サンプルから細胞に対応する情報を含んでいる2つの独立したリストモードデータファイルを記憶し、4) 既知の比率で、正常/反応サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいるデータファイルに、腫瘍サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいる前記データファイルからの細胞事象(イベント)を混ぜ合わせることによって新たなデータファイルを作成し、5) 光散乱および蛍光放出の流体血球計算測定によって発生された多次元空間に、正常な細胞に対応する事象によって占有されるそれらの区域および正常/反応サンプル中の空の空間に対応しかつ腫瘍性サンプル中の腫瘍細胞によって占有されるかもしれないそれらの区域を形成し、6) 続いて、新たに混ぜ合わされたデータファイルにおいて、光散乱および蛍光放出の流体血球計算測定によって発生された多次元空間内の腫瘍性細胞に対応するそれらの事象および正常細胞に対応する事象を識別し、そして7) 混ぜ合わされたデータファイル中に含まれる腫瘍性細胞に対応するそれらの事象のそれらの明白なかつ明瞭な感度のかつ特別な識別を許容するそれらの正常な同等物に比較されるような腫瘍性細胞によって表示される最も関連のある表現型の異常を確立する工程を含んでいる。この手順は計算手順の使用によって正常なサンプル中の腫瘍性細胞の希釈実験をシミュレートしかつ2つまたはそれ以上の異なるデータファイルから直接または予め確立された標準にしたがって測定された細胞の事象の集団の関連の位置を調整した後

20

30

40

#### 【0011】

上記で簡略して述べたように、本発明の方法の第1の段階は、少なくとも4つの単クローン抗体の多数の組み合わせにより、1つまたはそれ以上の正常/反応なサンプルおよび1つの腫瘍性細胞の染色を含み、各組み合わせ中の各単クローン抗体は異なる蛍光色素に接合されかつ一般に各組み合わせは少なくとも3つの蛍光色素接合の単クローン抗体の副次グループを有している。

#### 【0012】

50

正常および腫瘍性サンプルは、以下の型の1つ、すなわち、血液、骨髄、脊髄およびリンパ節からなる。

【0013】

腫瘍性サンプルは、造血腫瘍細胞または乳ガン、直腸ガン、前立腺腫瘍、肺ガン、膀胱ガンおよび胃の腫瘍等のごときあらゆる非造血起源からの腫瘍性細胞を包含することができる。

【0014】

腫瘍性サンプルは、最初の診断、再発および診断後のあらゆる時間周期で得られ、それらは高い数の腫瘍性細胞および最小の疾患を包含することができる。それらは得られた後に直接および生体外で培養後に染色される。

【0015】

腫瘍性サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体の組み合わせのパネルは、正常/反応サンプルの染色に使用される単クローン抗体の組み合わせのパネルと同一であり、変形例において前者のパネルは後者のパネルより短くすることができるが、前者のパネルの一部は単クローン抗体の組み合わせの後者のパネルに完全に含まれる。

【0016】

正常/反応および腫瘍性サンプルを染色するのに使用される各対のパネルに関して、単クローン抗体の各個の組み合わせに使用される各単クローン抗体のクローン、およびそれが接合される蛍光色素は単クローン抗体の組み合わせの2つのパネルにおいて同一である。

【0017】

単クローン抗体の多数の組み合わせの各々における蛍光成分の数は、少なくとも4つの異なる蛍光色素を含み、各々異なる単クローン抗体に接合されており、各蛍光色素の蛍光放出は他の蛍光色素接合単クローン抗体の蛍光放出から区別できる。本発明の実施に使用することができる蛍光分類(ラベル)は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリトリン(PE)、ペリジクロロフィルプロテイン(PerCP)、アロフィコシアニン、アレクサフルオール488、アレクサ647、パシフィックブルー、アレクサフルオール405、シアニン5(Cy5)、シアニン5.5(CY5.5)およびPEに、APCに、またはPerPC(例えば、PE/Cy5, PE/Cy5.5, PE/Cy7, APC/Cy7およびPerPC/Cy5.5)に結合されたその共役を含んでいる。各単クローン抗体は白血球の種々の集団についてかつサンプル中の腫瘍性細胞の集団について異なる量で発現される異なる抗原を認めることができる。1対の正常/反応および腫瘍性サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体のすべての組み合わせに共通である正確な単クローン抗体は腫瘍性サンプル中に含まれる問題の腫瘍細胞の型、血統および成熟段階に依存して変化され得る。

【0018】

染色に使用される単クローン抗体の多色の組み合わせのパネルがいったん選択されると、既知の量のサンプル中の細胞は、溶解溶液、既知の量での蛍光微小粒子および単クローン抗体試薬の混合物とともに混合される。サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体の多数の組み合わせの各々に関して、溶解溶液、蛍光微小粒子および単クローン抗体の特別な組み合わせと混合されるサンプルの繰り返しを含んでいる異なるアリコートが使用される。核にされた細胞が染色されかつ核にされない赤血球が溶解された後、サンプルは洗浄されかつ流体血球計算器において測定することができ、そのさい細胞は1つまたはそれ以上の感知領域を通過して1つずつ通されるかまたはあらゆる洗浄過程を実現することなく流体血球計算器において直接分析させることができる。変形例において、サンプルは単クローン抗体および蛍光微小粒子の集団のみとともに混合されかついったん染色されると、流体血球計算器において直接測定される。

【0019】

基準微小粒子の集団は均一にすることもでき、または異なるサイズ、密度、容量、形状、蛍光量、付着特性または他の物理-化学特性の微小ビーズの多数の集団からなることも

10

20

30

40

50

できる。微小粒子の集団はその表面が抗免疫グロブリン抗体で被覆される微小粒子または両者の混合物の蛍光粒子からなることができる。サンプルのマイクロリッター中に存在する細胞の集団の絶対数を計算するためにおいて、既知の数/サンプルの量において微小粒子の量子化された集団が追加される。

#### 【0020】

流体血球計算器の感知領域の各々において、細胞および微小粒子は1つまたはそれ以上の波長で光源に個々に露光され、血液、骨髄、脊髄およびリンパ節から取られた細胞のサンプル中の各染色された細胞に関して、光散乱の少なくとも2つの測定が行なわれかつ蛍光の少なくとも4つの測定が行なわれる。分析された各個の細胞および各個の微小粒子の光散乱および蛍光測定に関して記録された情報はコンピュータのごとき、データ記憶および分析装置に記憶される。単クローン抗体の組み合わせにより染色された微小ビーズおよび細胞を含んでいる分析された各サンプルアリコートに関する情報は別個のデータファイルに記憶することができるが、しかしながら、本発明の好適な実施形態において、サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体のすべての組み合わせにより染色された微小ビーズおよび細胞についての情報は異なる組み合わせの単クローン抗体により染色されたサンプル/微小粒子混合物の各々別個のアリコートについての情報の連続獲得によって単一のファイルに記憶され、連続して測定された単クローン抗体の異なる組み合わせにより染色された各アリコートに対応するそれらの事象の特別な識別「獲得の時間」のごときパラメータの使用によって達成することができる。あらゆる場合において、正常/反応サンプルおよび腫瘍性サンプルについてのデータは種々のデータファイルに個別に記憶される。米国特許第4,284,412号明細書および同第4,727,020号明細書において、データ記憶コンピュータシステムおよび単一のおよび二重の光源を備えた代表的な流体血球計算器の構成および使用がそれぞれ記載されている。これらのシステムにおいて、データはリストモードFCS(流体血球計算標準)フォーマットに通常記憶されている。このフォーマットにおいて、各個の事象に関する情報は、各細胞および微小粒子が流体血球計算器において測定されたシーケンスにしたがって連続方法において測定されたすべてのパラメータに関して列挙される。

10

20

#### 【0021】

単一サンプルからの情報が独立のデータファイル データファイルの各々が単クローン抗体の特別な組み合わせにより染色された微小粒子および細胞の混合物に対応するそれらの事象の光散乱および蛍光特性についての情報を含んでいる に収容される場合に、サンプルが染色された単クローン抗体の多数の組み合わせに対応するすべてのデータファイルからの情報が単一のデータファイルに混ぜ合わされる。2つまたはそれ以上の異なるデータファイルに収容されたデータを混ぜ合わせる結果として生じる各データファイルにおいて、混ぜ合わされた各個のデータファイルに対応する情報は、リストモードデータが混ぜ合わされた他のデータファイルの事象についての情報を収容する前または後に別個のリストに順序付けられる。

30

#### 【0022】

流体血球計算器において測定された正常/反応サンプルからの細胞についての情報を含んでいるデータファイルはそのすべてが単一の正常/反応サンプルまたは多数の正常/反応サンプルに対応する単クローン抗体の異なる組み合わせにより各々染色された同一数のサンプルアリコートに対応する多重データファイルを混ぜ合わせた後に得られた情報からなっている。単クローン抗体の多数の組み合わせの同一パネルにより個々に各々染色された2つまたはそれ以上の正常/反応サンプルに関して集められた情報を混ぜ合わすことから生じるデータファイルは任意に選択された個人からの良好に定義された年齢間隔からの個人または、他の特性中、彼らの年齢、性別に応じてかつおよび非腫瘍条件下にある個人の他のグループからの正常/反応サンプルから構成される。

40

#### 【0023】

単クローン抗体の多数の組み合わせの特別なパネルにより染色された腫瘍性細胞により発現された異常な表現型の識別に関して、新たなデータファイルは正常/反応サンプルに

50

存在する細胞についての情報を含んでいるデータファイルに腫瘍性サンプル中に存在する細胞についての情報を含んでいるデータファイルから細胞事象に対応するデータを良好に知られた比率で混合することによって発生される。腫瘍性サンプルおよび正常/反応サンプルの両方からの細胞事象についての情報を含んでいる混ぜ合わされたデータファイルにおいて、2つのデータファイルの各々に対応する事象はリストモードデータフォーマットに相次いで順序付けされかつそれらは、ソフトウェアツール（例えば、種々の色でペイントされたドット）を使用して、光散乱および蛍光放出の流体血球計算測定によって発生されたあらゆる多次元空間に異なって分類することができる。

#### 【0024】

多数の異なるサンプルからの細胞の光散乱および蛍光特性についての情報を含んでいるデータファイルが混ぜ合わされ、そしてそれらが異なる条件（例えば、異なる機器設定）下で、異なる流体血球計算機器においてまたは異なる時間（異なる日、月または年において）で得られたならば、測定されたすべてのパラメータ（光散乱および蛍光放出）によって形成された多次元空間内の各細胞事象の相対的な位置が、サンプルの各々に関して、細胞と同時に測定された内部の基準微小粒子の集団の位置に観察される相対的な変化に基づいてソフトウェアオペレーションによって自動的に調整される。調整された後、基準化過程は混ぜ合わされた多数のサンプルに収容された正常/反応サンプルの微小粒子および同一の集団に対応するそれらの事象の補正された位置が重なり合うため制御される。

10

#### 【0025】

1つまたはそれ以上の正常サンプルおよび1つの腫瘍性サンプルにおいて測定された細胞事象についての情報を含んでいる種々のデータファイルが発生され得る。そのために、腫瘍性サンプルにおいて測定された全体の細胞性に対応するすべての情報またはこのファイルに存在する腫瘍性細胞を代表する任意に選択された事象の変数において測定された全体の情報に対応するその種々の部分が正常/反応サンプルを測定した後得られたデータファイルの情報に追加される。この手順は計算手順の使用によって正常なサンプル中の腫瘍性細胞の希釈実験をシミュレートする。したがって、例えば、1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, および1/100000000（事象/事象）の個々の事象についてのデータの連続希釈が腫瘍性サンプルに対応するファイルからのデータと正常/反応サンプルに対応するファイルからのデータを混ぜ合わせることによって作ることができる。

20

30

#### 【0026】

正常/反応サンプルからのおよび腫瘍性サンプルからのデータファイルが単一のデータファイルにいったん混ぜ合わされると、この新たに混ぜ合わされたデータファイルに存在する腫瘍性細胞は正常/反応サンプルの細胞についてのみの情報を含んでいる最初のファイルにおいて空のままである空間に落ち込んでいる少なくとも15個の事象のそれらの集団として、ソフトウェアツールを使用して識別される。同一のパネルで染色された正常細胞のそれらの集団に比較して腫瘍性細胞の各個の集団に関して測定された光散乱および蛍光の量を定量化することによって、腫瘍性細胞によって表示される最も分析的な異常表現型についての統計的な情報が引き出すことができる。異常表現型は2つまたはそれ以上の光散乱および蛍光測定の組み合わせから構成されかつそれは同一の混ぜ合わされたデータファイル中に収容される正常/反応細胞に対応する事象のすべての集団から異なるように混ぜ合わされたデータファイル中に存在する腫瘍性細胞に対応するそれらの事象の明白な高感度のかつ特別な識別を許容する。

40

#### 【0027】

本発明の方法は、また、細胞活性化および細胞の機能を監視するための抗原発現の異常パターンを検出するのに使用することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0028】

本発明を以下のようにその適用区域を限定しない2つの実施例について説明する。

#### 【0029】

50

## 実施例 1

## 1. サンプル

5 mL の抹消血 (PB) が 10 人の健康なボランティアから得られかつ抗凝固剤として EDTA を含有しているバキュテナー (商標) (ベクトン・ディキンソン、ニュージャージー州ニュージャージー) 管に置かれた。加えて、5 時間、 $10 \cdot \text{sup} \cdot 9 / \text{L}$  の絶対的リンパ球増加により B 細胞慢性リンパ球性の白血病 (B-CLL) と診断された患者からの 5 mL の PB が同様に得られた。

## 【0030】

## 2. サンプル調製

サンプルを軽く混合した後、 $10 \cdot \text{sup} \cdot 6$  および 2 時間、 $10 \cdot \text{sup} \cdot 6$  の間で核にされた細胞を含んでいる各 PB サンプルの 200  $\mu\text{L}$  が 6 本の異なる繰り返し管内に置かれそして 2 mL / 管の燐酸緩衝された塩水により 540 g で 5 分間洗浄された。次いで、各 PB サンプルから各管に、単クローン抗体の以下の 5 色の組み合わせの 1 つが追加され、異なる蛍光色素 (FITC / PE / PE - テキサスレッド / PerCP - Cy5.5 / APC) で接合された各単クローン抗体が 5  $\mu\text{L}$  の量、すなわち、1) CD22 / CD23 / CD19 / CD45 / CD5, 2) CD43 / CD79b / CD19 / CD45 / CD5, 3) アンチ - ラムダ / アンチ - カッパ / CD19 / CD45 / CD5, 4) アンチ - IgM / CD27 / CD19 / CD45 / CD5, 5) CD11c / CD10 / CD19 / CD45 / CD5, 6) CD103 / CD25 / CD19 / CD45 / CD5 および、7) CD20 / Zap70 / CD19 / CD45 / CD5 において追加されている。軽く混合した後、サンプルは暗闇において室温で 15 分間培養された。この培養後、2 時間、 $10 \cdot \text{sup} \cdot 3$  微小ビーズを包含している 200  $\mu\text{L}$  の微小ビーズ懸濁液 (パーフェクトカウント、シトグノス、スペイン、サラマンカ) が各繰り返し管に追加された。

## 【0031】

## データ獲得

軽く混合した後、染色された細胞の光散乱および蛍光がファクスディバ (FACSDIVA) (BDB) ソフトウェアを使用して 488 および 635 nm で同調された 2 つの放出レーザー光を備えたファクスアリア (FACSAria) 流体血球計算器 (ベクトン / ディキンソン・バイオサイエンシズ BDB -、カリフォルニア州サンホス) において測定された。分析された各サンプルに関して、分析された各細胞および微小ビーズに関する FITC, PE, PE - テキサスレッド / PE - Cy5.5 および APC の前方 (FSC) および側方光散乱 (SSC)、および蛍光放出についての情報を包含した単一のデータファイルが集められた。加えて、時間 (獲得パラメータの) に対応する情報が同様に記録された。各サンプルに関して、しきい値として CD45 - 関連の赤蛍光を使用する「サンプル調製」についての上記部分で定義されたシーケンスにおいて種々の管に関して獲得が実施された。開口クリーニング組み合わせに関して、500,000 CD45+ 細胞についての情報が獲得された。獲得は 10 秒間 2 つの連続する管の間で停止された。

## 【0032】

## 4. データ操作およびデータ分析

データ分析の前に、10 個の正常な PB サンプルに対応する 10 個のファイルすべてに包含されるリストモードデータが単一のデータファイルにサンプル 1 からサンプル 10 へ順序付けされた方法において合体させられた。各微小ビーズおよび細胞事象に関する FSC, SSC, FITC, PE, PE - テキサスレッド / PE - Cy5.5 および APC 蛍光放出の測定に対応するデータがアルファCCSアシスタント 1.1a ソフトウェアを使用するチャンネル値 (0 ないし 2048 に目盛りされる) に変換された後データベースに導入される。アルゴリズムは、その場合に、クラスタ分析によって、すべてのサンプルアリコート (FSC, SSC, CD19, CD45, CD5) に関して測定された共通のパラメータならびに各サンプルアリコートにおいて測定された微量粒子により識別された正常細胞のすべての異なる集団を識別するためにリンパ節造影写真 B ソフトウェア (バージョン: ベータ - テスト、サイトグノス、スペイン、サラマンカ) を使用する正常サンプルから

のデータに基づいて作成された。各測定パラメータの各細胞集団の統計的データは、その場合に、例えば、パーゼン・ウィンドーズ（デュダ・アール・オー等、パターン分類、ジョン・ワイリー・アンド・サン2001）を使用することによって、多次元蓋然性分布機能の評価するのに使用された。1つまたはそれ以上のプロトタイプ（コードブック・ベクトルズ）が正常サンプルに関して集められたデータファイルに存在する細胞および微小ビーズの各集団の代表であるように設定される。

#### 【0033】

並行して、同様な分析がB-CLLデータファイルにより実施された。B-CLLデータファイルにおいて得られたパーフェクトカウント微小ビーズ粒子の評価された分布は、その場合に、ノーマルデータファイルにおいて得られた位置において比べられた。B-CLLにおいて、微小ビーズは同一の位置を付与したが、空間R<sub>sup</sub>.7の別な空間において、異なる大きさの移動が各次元において観察されている。観察された移動に基づいて、補正機能が適用されかつB-CLLデータファイルにおけるすべての事象の位置はこの機能にしたがって調整された。調整された後、正常な残存のCD5+/CD45++/CD19T-細胞のおよび腫瘍性細胞B-CLLと共存している正常な残存するCD45++/SSCの高い中性好性白血球の分布に対応する事象に関する新たな値がB-CLLデータファイルにおいて計算されかつノーマル（正常な）データファイル中に存在する同一の正常な集団に関して得られた値と比較された。事象の両集団の分布は両方のデータファイルにおいて同一であった（ $p > 0.05$ ）。次いで、腫瘍性B-細胞集団を含んでいるすべての細胞および微小ビーズ集団の多次元統計データが1つまたはそれ以上のプロ調整タイプを作成するのにかつ同一のデータファイル中に存在する細胞事象の正常な残存する集団に対応するそれらに加えて、腫瘍性B-CLL細胞の集団の確立分布機能の評価するのに使用された。

10

20

#### 【0034】

この段階後、10個の正常なPBサンプル（ノーマルデータファイル）についての情報を含んでいるデータファイルのコピーが上述したようなこのデータファイルからの各事象の位置に関する値を調整した後B-CLLデータファイルからの事象に対応するデータと異なる集団で合流させた。調整されたB-CLLデータファイルに対応するデータファイルからNORMALデータファイルへの事象の以下の希釈因子、すなわち、99/1, 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 1/10000000, 100000000（NORMAL/B-CLLデータファイル）が用意された。次いで、クラスタ分析が上述されたような合流させられたNORMAL/B-CLLデータファイルに関して実施された。すべてのNORMAL/B-CLLデータファイルにおいて、NORMALデータファイル中に存在しないCD5+/CD19+/CD45高い/CD20低い/CD11c-/CD22-CD23++/CD79b低い/IgM低い/CD27+/CD103-/CD25低い/カッパ低い/ラムダ-/ZAP70-/CD10-腫瘍性B-細胞の集団が識別された。他の集団から、最も緊密に関連する集団がCD5+/CD19+/CD45高いB-細胞によって代表された。この後者の集団はCD20, CD22, CD79b, CD43, CD5およびCD25（腫瘍性B-CLL細胞の異常表現型を定義するマーカー）の組み合わせに基づいて前者から明瞭に識別

30

40

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES 2005/000108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 G01N33/53, G01N33/577, G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 G01N33/52, G01N33/53, G01N33/58, C12Q1/00		
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)		
CIBEPAT,EPODOC,DWPI,PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1363126 A (Universidad de Salamanca) 19.11.2003 The whole document.	1 - 22
A	EP 0470810 A (Becton Dickinson & Company) 12.02.1992 Todo el documento.	1 - 35
A	US 4983359 A (Tomioka et al.) 08.01.1991 The whole document.	1 - 22
A	US 5234816 A (Terstappen) 10.08.1993 The whole document.	1 - 22
A	US 5064616 A (Brosnan et al.) 12.11.1991 The whole document.	1 - 22
A	EP 0317156 A (Becton Dickinson & Company) 24.05.1989 The whole document.	1 - 22
A	EP 0552707 A (Becton Dickinson & Company) 28.07.1993 The whole document.	1 - 22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
09 June 2005 (09.06.2005)		14 June 2005 (14.06.2005)
Name and mailing address of the ISA/ SPTO		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

The whole document.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/ES 2005/000108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1363126 A1	19.11.2003	EP 20020380098 US 2003215892 A1	14.05.2002 20.11.2003
EP 0470810 A1	12.02.1992	FI 913733 A CA 2048004 A1 NO 913063 A EP 19910307209 IE 912620 A1 IE 76732 B AU 8152891 A MX 9100553 A1 ZA 9105958 A BR 9103400 A JP 4252957 A JP 7101218 B JP 2061274 C AP 266 A AU 642282 B2 AT 136653 T DE 69118617 D ES 2088470 T OA 10036 A DE 69118617 T US 5627037 A SG 48820 A1	08.02.1992 08.02.1992 10.02.1992 06.08.1991 12.02.1992 05.11.1997 13.02.1992 01.04.1992 29.04.1992 19.05.1992 08.09.1992 01.11.1995 10.06.1996 16.06.1993 14.10.1993 15.04.1996 15.05.1996 16.08.1996 14.10.1996 31.10.1996 06.05.1997 18.05.1998
US 4983359 A	08.01.1991	JP 63196854 A	15.08.1988
US5234816 A	10.08.1993	NONE	-----
US 5064616 A	12.11.1991	US 4987086 A	22.01.1991
EP 0317156 A1	24.05.1989	EP 19880310507 JP 1161153 A JP 6105253 B JP 1978940 C US 5137809 A AT 81724 T DE 3875456 D DE 3875456 T ES 2035317 T GR 3006183 T GR 3025901 T	08.11.1988 23.06.1989 21.12.1994 17.10.1995 11.08.1992 15.11.1992 26.11.1992 10.06.1998 16.04.1993 21.06.1993 30.04.1998
EP 0552707 A1	28.07.1993	CA 2087086 A1 EP 19930100697 AU 3190693 A JP 6027017 A JP 8001434 B JP 2104080 C	23.07.1993 19.01.1993 29.07.1993 04.02.1994 10.01.1996 06.11.1996

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/ES 2005/000108

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		DE 69317449 D	23.04.1998
		ES 2113965 T	16.05.1998
		DE 69317449 T	09.07.1998
		US 6287791 B1	11.09.2001

### INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/000108

<b>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD</b> CIP <sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/577, G01N33/574 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.		
<b>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA</b> Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación) CIP <sup>7</sup> G01N33/52, G01N33/53, G01N33/58, C12Q1/00 Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda		
Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) CIBEPAT, EPODOC, DWPI, PAJ		
<b>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</b>		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	EP 1363126 A (Universidad de Salamanca) 19.11.2003 Todo el documento.	1 - 22
A	EP 0470810 A (Becton Dickinson & Company) 12.02.1992 Todo el documento.	1 - 35
A	US 4983359 A (Tomioka et al.) 08.01.1991 Todo el documento.	1 - 22
A	US 5234816 A (Terstappen) 10.08.1993 Todo el documento.	1 - 22
A	US 5064616 A (Brosnan et al.) 12.11.1991 Todo el documento.	1 - 22
A	EP 0317156 A (Becton Dickinson & Company) 24.05.1989 Todo el documento.	1 - 22
A	EP 0552707 A (Becton Dickinson & Company) 28.07.1993 Todo el documento.	1 - 22
<input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo		
* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional	
09 Junio 2005 (09.06.2005)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span style="font-size: 1.2em;">14 JUN 2005</span> <span style="font-size: 1.2em;">14. 06. 2005</span> </div>	
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado	
O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	<div style="display: flex; justify-content: center;"> <span style="font-size: 1.2em;">A. Cardenas Villar</span> </div>	
	Nº de teléfono + 34 91 3495393	

**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 2005/000108

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 1363126 A1	19.11.2003	EP 20020380098 US 2003215892 A1	14.05.2002 20.11.2003
EP 0470810 A1	12.02.1992	FI 913733 A CA 2048004 A1 NO 913063 A EP 19910307209 IE 912620 A1 IE 76732 B AU 8152891 A MX 9100553 A1 ZA 9105958 A BR 9103400 A JP 4252957 A JP 7101218 B JP 2061274 C AP 266 A AU 642282 B2 AT 136653 T DE 69118617 D ES 2088470 T OA 10036 A DE 69118617 T US 5627037 A SG 48820 A1	08.02.1992 08.02.1992 10.02.1992 06.08.1991 12.02.1992 05.11.1997 13.02.1992 01.04.1992 29.04.1992 19.05.1992 08.09.1992 01.11.1995 10.06.1996 16.06.1993 14.10.1993 15.04.1996 15.05.1996 16.08.1996 14.10.1996 31.10.1996 06.05.1997 18.05.1998
US 4983359 A	08.01.1991	JP 63196854 A	15.08.1988
US5234816 A	10.08.1993	NINGUNO	-----
US 5064616 A	12.11.1991	US 4987086 A	22.01.1991
EP 0317156 A1	24.05.1989	EP 19880310507 JP 1161153 A JP 6105253 B JP 1978940 C US 5137809 A AT 81724 T DE 3875456 D DE 3875456 T ES 2035317 T GR 3006183 T GR 3025901 T	08.11.1988 23.06.1989 21.12.1994 17.10.1995 11.08.1992 15.11.1992 26.11.1992 10.06.1998 16.04.1993 21.06.1993 30.04.1998
EP 0552707 A1	28.07.1993	CA 2087086 A1 EP 19930100697 AU 3190693 A JP 6027017 A JP 8001434 B JP 2104080 C	23.07.1993 19.01.1993 29.07.1993 04.02.1994 10.01.1996 06.11.1996

**INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2005/000108

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
		DE 69317449 D	23.04.1998
		ES 2113965 T	16.05.1998
		DE 69317449 T	09.07.1998
		US 6287791 B1	11.09.2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 21/78 (2006.01)</b>		G 0 1 N 21/78	C	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>		C 1 2 Q 1/02		

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

(72) 発明者 ソブラル ダ カスタ エライネ  
 スペイン国, イ - 3 7 0 0 8 サラマンカ, パチオ デ エスキューラス 1, ユニバーシダド  
 デ サラマンカ

F ターム(参考) 2G045 AA02 CA01 CB02 FB03 FB12 GC15  
 2G054 AA07 AA08 AB04 CE02 EA03 EA05  
 4B063 QA07 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QX02

专利名称(译)	用于使用流体细胞计量测量监测最小疾病水平的肿瘤细胞中异常表型的多维检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007526469A</a>	公开(公告)日	2007-09-13
申请号	JP2007501297	申请日	2005-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	普遍性蕨去萨拉曼卡		
申请(专利权)人(译)	Yunibashidado萨拉曼卡		
[标]发明人	オルファオデマトスカーレイアイバーレアルベルト ペドレイラカルロスエドアルド ソブラルダカスタエライネ		
发明人	オルファオデマトスカーレイアイバーレアルベルト ペドレイラカルロスエドアルド ソブラルダカスタエライネ		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/49 G01N33/543 G01N21/78 C12Q1/02 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/574.D G01N33/49.K G01N33/543.575 G01N21/78.C C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/CA01 2G045/CB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EA05 4B063/QA07 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	江藤刚		
优先权	10/791994 2004-03-03 US		
其他公开文献	JP4768706B2 JP2007526469A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

骨髓，用于检测由外周血中，存在于骨髓和淋巴结的肿瘤细胞表达的异常表型的方法，下面的步骤，即，1) 一个或多个正常/无功样本和单独染色一个肿瘤样本，单独使用相同或部分重叠的单克隆抗体组合，2) 使用流式细胞仪比较正常/反应样本和单个连续测量与克隆抗体组合染色的大量细胞相关的荧光发射，并且3) 包含关于分析的每个单独细胞的特定光散射和荧光特性的信息。4) 以已知比例存储包含肿瘤文件中正常/反应样品中存在的细胞信息的数据文件，它由列表模式数据从含有大约存在于样品中的细胞信息的θ文件结合创建了一个新的数据文件，5) 的那些区域和通过正常对应于正常细胞事件占用/反应对应于样品中的空的空间，并形成由肿瘤细胞的肿瘤样品中所占据的那些区域，6) 接着，对应于肿瘤细胞在多维空间中共享的鉴定与正常细胞相对应的那些事件和与正常细胞相对应的事件，和7) 与正常细胞相比，确定由肿瘤细胞表达的最相关的表型异常包含。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PC/7/ES 2005/000108
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC <sup>7</sup> G01N33/53, G01N33/577, G01N33/574 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: G01N33/53, G01N33/55, G01N33/58, C12Q1/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, DWPLPAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1363126 A (Universidad de Salamanca) 19.11.2003 The whole document.	1 - 22
A	EP 0470810 A (Becton Dickinson & Company) 12.02.1992 Todo el documento.	1 - 35
A	US 4983359 A (Tomiloka et al.) 08.01.1991 The whole document.	1 - 22
A	US 5254816 A (Christophen) 10.08.1993 The whole document.	1 - 22
A	US 5064616 A (Brosnan et al.) 12.11.1991 The whole document.	1 - 22
A	EP 0317156 A (Becton Dickinson & Company) 24.05.1989 The whole document.	1 - 22
A	EP 0532707 A (Becton Dickinson & Company) 28.07.1993 The whole document.	1 - 22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Book C. <input type="checkbox"/> See patent family search.		
* Special categories of cited documents: "A": document published after the international filing date or priority date in a state of the art which is not considered to be prior art for the purposes of the international search. "U": document which, upon filing, is not yet published or which is published in a state which is not open to public inspection. "P": document published in a state which is not open to public inspection. "N": document published in a state which is not open to public inspection and which is not available to the public in any form. "X": document published in a state which is not open to public inspection and which is not available to the public in any form. "Y": document published in a state which is not open to public inspection and which is not available to the public in any form. "Z": document published in a state which is not open to public inspection and which is not available to the public in any form.		
Date of the actual completion of the international search 09 June 2005 (09.06.2005)		Date of mailing of the international search report 14 June 2005 (14.06.2005)
Name and mailing address of the ISA/ SPTO		Authorized officer
Filing date 09 June 2005 (second sheet) (July 1992)		Telephone No.