

(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2011-519022

(P2011-519022A)

(43) 公表日 平成23年6月30日(2011.6.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 575	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 597	
	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2011-503410 (P2011-503410)
 (86) (22) 出願日 平成21年4月6日 (2009.4.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年12月6日 (2010.12.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/054072
 (87) 国際公開番号 W02009/124901
 (87) 国際公開日 平成21年10月15日 (2009.10.15)
 (31) 優先権主張番号 08154164.1
 (32) 優先日 平成20年4月7日 (2008.4.7)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/123,369
 (32) 優先日 平成20年4月7日 (2008.4.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

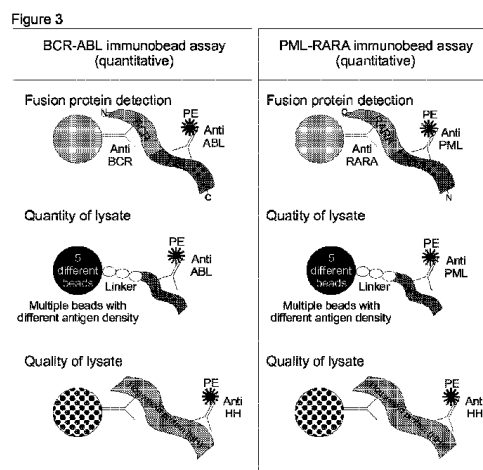
(71) 出願人 501399603
 エラスムス ユニバーシティ メディカル
 センター ロッテルダム
 Erasmus University
 Medical Center Rott
 erdam
 オランダ国 ロッテルダム ドクトル モ
 レワテルプレイン 40
 Dr. Molewaterplein 4
 O, Rotterdam, Netherl
 ands
 (74) 代理人 100075557
 弁理士 西教 圭一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍特異的融合タンパク質を検出するための方法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、癌の診断分野に関し、病理学および血液学における診断技術の適用に関するものである。具体的には、本発明は、染色体異常の検出、および腫瘍細胞によってのみ発現される腫瘍特異的遺伝子産物の検出のためのフローサイトメトリ技術の改良、およびそれらに関するキットに関連する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍特異的融合タンパク質を検出するための方法であって、

A) 融合タンパク質分析工程であって、少なくとも1つの腫瘍特異的融合タンパク質を含むことが予想される細胞ライセートを、少なくとも、ビーズ結合捕捉プローブと、融合タンパク質の少なくとも1つに対する蛍光標識化検出プローブとに接触させ、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側に位置する結合部位を認識して、前記融合タンパク質への前記プローブの結合をフローサイトメトリにより測定することが可能である、融合タンパク質分析工程、

B) 少なくとも、ビーズ結合捕捉プローブと、細胞内に存在することが知られているハウスホールドタンパク質に対する蛍光標識化検出プローブとに、細胞ライセートを接触させることを含み、各プローブは、前記ハウスホールドタンパク質の異なる結合部位を認識して、融合タンパク質の存在について分析されたライセート中における無傷のタンパク質の量を測定するために、前記ハウスホールドタンパク質への前記プローブの結合をフローサイトメトリによって測定することが可能である、定性管理分析を前記ライセートについて実施する工程、ならびに

C) 融合タンパク質分析工程(A)において使用された蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブを、少なくとも第1セットの定量ビーズと接触させることを含み、ビーズには、蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブのための既知量の結合部位が設けられ、フローサイトメトリによって、前記既知量の結合部位と関連付けられる蛍光シグナルを測定

することを含み定量管理工程、を含む腫瘍特異的融合タンパク質を検出するための方法。

【請求項 2】

融合タンパク質分析(A)および管理分析(B)、および/または(C)の工程が、フローサイトメトリによる検出の間に区別することができるビーズを用いてシングルチューブで同時に実行される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ビーズ結合捕捉プローブ、および定性管理分析工程(B)において使用されるハウスホールドタンパク質に対する蛍光標識化検出プローブは、前記ハウスホールドタンパク質のN末端およびC末端の結合部位をそれぞれ認識すること、または前記ハウスホールドタンパク質のC末端およびN末端の結合部位をそれぞれ認識することができる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記ハウスホールドタンパク質が、ABL、2M、MGUS、GAPDH、およびアクチンのようなアクチンからなる群から選択される、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記定量管理分析(C)が、標準曲線のプロットをするために、少なくとも、第1既知量の結合部位を含む第1セットの定量ビーズと、前記第2既知量の結合部位を含む第2セットの定量ビーズとを使用することを含み、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

細胞を含むサンプル中の融合タンパク質を検出するための方法であって、前記細胞ライセートを調製すること、および、少なくとも、融合タンパク質の少なくとも1つに対する蛍光標識化検出プローブと、ビーズ結合捕捉プローブとを前記ライセートに接触させることを含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側の部位に位置する結合部位を認識することができ、かつフローサイトメトリにより前記融合タンパク質への前記プローブの結合を測定することができ、ここで前記細胞ライセートの調製は、エンドヌクレアーゼを含む溶解緩衝液と、細胞とを接触させることを含み、方法。

【請求項 7】

前記エンドヌクレアーゼは、セラチアマルセセンス(*Serratia marcescens*)に由来す

10

20

30

40

50

る非特異的なエンドヌクラーゼである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞質の融合タンパク質、および核の融合タンパク質の検出を含む、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

細胞を含むサンプル中の融合タンパク質を検出するための方法であって、前記細胞ライセートを調製する工程、および、少なくとも、融合タンパク質の少なくとも 1 つに対する蛍光標識化検出プローブと、ビーズ結合捕捉プローブとを前記ライセートに接触させる工程を含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側の部位に位置する結合部位を認識し、フローサイトメトリにより前記融合タンパク質への前記プローブの結合を測定することができ、前記細胞ライセートの調製は、プロテアーゼ阻害剤の 1 つ以上を含む溶解緩衝液中で前処理された細胞の溶解に続いて、細胞透過性のプロテアーゼ阻害剤の少なくとも 1 つによる無傷の細胞の処理を含む、方法。

10

【請求項 10】

無傷の細胞が、不可逆的なセリンプロテアーゼ阻害剤の少なくとも 1 つとインキュベートされる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

無傷の細胞が、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、および 4 - (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド ハイドロクロライド (AEBSF HCl) の少なくとも 1 つ、またはそれらの組合せとインキュベートされる、請求項 10 に記載の方法。

20

【請求項 12】

融合タンパク質分析工程 (A) は、タンパク質分析 (A) において使用されるプローブに結合する腫瘍特異的融合タンパク質に競合することができる少なくとも 1 つの天然タンパク質を含むライセートを枯渇させることにより開始され、前記枯渇は、前記ライセートと、天然タンパク質に反応するビーズ結合した結合分子の少なくとも 1 つとを接触させることを含み、ここで前記天然タンパク質の断片は、検出される腫瘍特異的タンパク質の一部であり、前記結合分子は、天然タンパク質に反応するが、融合タンパク質に反応しない、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

異なる腫瘍特異的融合タンパク質を少なくとも 2 つ検出することを含み、ビーズ結合捕捉プローブと、蛍光標識化検出プローブとの特定の組合せを、融合タンパク質のそれぞれに対して同時に使用する、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 14】

MLL - AF4、MLL - AF6、MLL - AF9、MLL - ENL、MLL - AF10、MLL - ELL、PML - RARA、PLZF - RARA、NPM - RARA、NUMA - RARA、NPM - ALK、TPM3 - ALK、TFG - ALK、ATIC - ALK、EWS - FLI1、EWS - ERG、EWS - ETV1、AML1 - ETO、PML - RARA、CBFB - MYH11、E2A - PBX1、BCR - ABL、および TEL - AML1 からなる群から選択された腫瘍特異的タンパク質の 1 つ以上、好ましくは少なくとも 2 つの検出を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 15】

細胞内の腫瘍特異的融合タンパク質のフローサイトメトリ測定のためのキットであって、
、
少なくとも、第 1 のビーズ結合した融合タンパク質捕捉プローブ (A1) と、第 2 の蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブ (A2) とを含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側に位置する結合部位を認識することができる、プローブセット (A)、

ビーズ結合したハウスホールドタンパク質捕捉プローブ (B1)、および蛍光標識化したハウスホールドタンパク質検出プローブ (B2) を含み、それぞれのプローブは、前記

50

細胞内で発現されたハウスホールドタンパク質の異なる部位に位置する結合部位を認識することができる、プローブセット (B)、および / または

少なくとも、第 1 セットの定量ビーズ (C 1) であって、融合タンパク質検出プローブ (A 2) のための第 1 既知量の結合部位を備える定量ビーズ (C 1)、を含むキット。

【請求項 16】

さらに第 2 セットの定量ビーズ (C 2) を含み、前記定量ビーズがプローブ (A 2) への第 2 既知量の結合部位を備える、請求項 15 に記載のキット。

【請求項 17】

少なくとも 2 つのプローブセット (A) を含み、それぞれのプローブセットが、異なる腫瘍特異的融合タンパク質に特異的に結合することと、異なる腫瘍特異的融合タンパク質を検出することとを可能とする、請求項 15 または 16 に記載のキット。

10

【請求項 18】

MLL - AF 4、MLL - AF 6、MLL - AF 9、MLL - ENL、MLL - AF 10、MLL - ELL、PML - RARA、PLZF - RARA、NPM - RARA、NUMA - RARA、NPM - ALK、TPM3 - ALK、TFG - ALK、ATIC - ALK、EWS - FLI 1、EWS - ERG、EWS - ETV 1、AML 1 - ETO、PML - RARA、CBFB - MYH 11、E2A - PBX 1、BCR - ABL、および TEL - AML 1 からなる群から選択される腫瘍特異的タンパク質の少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つに対するプローブセット (A) を含む、請求項 15 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

【請求項 19】

プローブセット (A) のビーズ、プローブセット (B) のビーズ、および / または定量ビーズ (C) が、異なるビーズ特性を有し、好ましくは異なる大きさ、および / または色を有する、請求項 15 ~ 18 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 20】

プローブセット (B) が、ABL、2M、GUS GAPDH、および α -アクチンのようなアクチンからなる群から選択されたハウスホールドタンパク質に対するものである、請求項 15 ~ 19 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 21】

さらに、ヌクレアーゼ、好ましくは n エンドヌクレアーゼ、好ましくはセラチアマルセセンス (*Serratia marcescens*) に由来する非特異的エンドヌクレアーゼ、より好ましくは Benzonase (登録商標) を含む、請求項 15 ~ 20 のいずれか 1 項に記載のキット。

30

【請求項 22】

さらに、不可逆的な細胞透過性セリンプロテアーゼ阻害剤の少なくとも 1 つ、好ましくは、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) もしくは (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド ハイドロクロライド (AEBSF HCl)、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 15 ~ 21 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 23】

天然タンパク質に特異的に反応するビーズ結合した結合分子の少なくとも 1 つをさらに含み、前記天然タンパク質の断片が、検出される腫瘍特異的タンパク質の一部であって、前記結合分子が、天然タンパク質に反応するが融合タンパク質に反応しない、請求項 15 ~ 22 のいずれか 1 項に記載のキット。

40

【請求項 24】

疾患の診断、分類、および / または観察における、請求項 15 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の診断分野、および病理学および血液学における診断技術の適用に関する。具体的には、本発明は、染色体異常の検出、および前記染色体異常を含む腫瘍細胞によ

50

つてのみ発現される腫瘍特異的遺伝子産物の検出のための、各フローサイトメトリ技術およびそれらに関するキットに関し、サンプルは、融合タンパク質に対して向けられる少なくとも2つの異なるプローブと接触させられ、それぞれのプローブは融合タンパク質の異なる部位と反応する。

【背景技術】

【0002】

この様式の検出方法は、当該技術分野で知られている。例えば、US 6 6 8 6 1 6 5には、フローサイトメトリによる複数の融合タンパク質の同時検出のための多重化された迅速なビーズベース免疫測定法が記載されている。融合タンパク質特異的モノクローナル抗体（捕捉プローブ）は、大きさまたは色で分けられたビーズに共有結合することができる。抗体に結合されたビーズは、サンプル中の融合タンパク質を捕捉するために使用でき、次に、結合された融合タンパク質は、フローサイトメトリに使用される蛍光色素に共役した融合タンパク質特異的抗体（検出プローブ）のカクテルで検出される。多重免疫測定は、適した大きさ、または色で分けられたビーズを利用することで、1つの病気のカテゴリ内における数種の融合タンパク質（例えば、急性骨髄性白血病（AML）またはプレB細胞白血病）を同時に検出するためのシングルチューブアッセイへ容易に変換することができる。

10

【0003】

WO 2 0 0 5 / 0 1 5 2 3 5は、実質的にUS 6 6 8 6 1 6 5の方法のさらなる改善に関する。WO 2 0 0 5 / 0 1 5 2 3 5は、US 6 6 8 6 1 6 5に記載されているようなビーズベース捕捉/検出アッセイの感度は、融合タンパク質の検出に先立ち、天然の非融合タンパク質A、および/またはタンパク質Bに関する融合タンパク質A - Bについてのサンプルを濃縮することにより著しく改良することができることを開示している。これは、融合タンパク質の1つ以上の非融合の、天然の対応物のサンプルを枯渇させることによって達成される。

20

【0004】

上述の融合タンパク質の検出技術は、特に白血病、リンパ腫、および遺伝子融合をもたらす染色体異常に起因する固形腫瘍といった病気の診断および観察のために非常に価値があると証明された。

【0005】

しかし、前記方法のさらなる改善が必要とされていることは明らかである。本発明の目的は、この要求を満たすことである。例えば、PCRによる腫瘍特異的融合遺伝子の検出が陽性の検査結果をもたらす一方、タンパク質レベルでの融合遺伝子産物の検出が陰性の検査結果をもたらす場合があることが知られている。本発明の目的は、特に、融合タンパク質分析の偽陰性の結果を見落とす数を最小限に抑えること、および偽陰性の分析結果の発生を減少させることである。本発明の更なる目的は、1つ以上の融合タンパク質の信頼性の高い定量を可能にする方法を提供することである。このことは、例えば、抗がん治療への反応を評価するために、患者間および患者の観察において特に重要である。本発明は、好ましくは、簡単かつ便利な方法でこれらの問題を同時に解決することを目的とする。

30

【発明の概要】

40

【0006】

目的の少なくとも一部は、融合タンパク質の検出分析に加えて、いわゆる「定性管理ビーズ」および/または「定量ビーズ」の使用を含む、1以上の追加の定性管理分析および/または定量管理分析を実行することによって満たすことができることが見出された。さらに、アッセイの改良は、サンプル調製手順、特に、1つ以上の腫瘍特異的融合タンパク質の存在についてアッセイする細胞ライセートを調製する工程の変法に関する。以下の説明から明らかになるように、本明細書において開示された改良は、相互に完全に互換性を有する。それらは、そのようなものとして、または互いに任意に組み合わせで使用することができる。

【0007】

50

一実施形態では、腫瘍特異的融合タンパク質を検出するための方法であって、A) 融合タンパク質分析を含み、腫瘍特異的融合タンパク質の少なくとも1つを含むことが予想される細胞ライセートを、少なくとも、ビーズ結合捕捉プローブと、融合タンパク質の少なくとも1つに対する蛍光標識化検出プローブとに接触させ、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側に位置する結合部位を認識して、前記融合タンパク質への前記プローブの結合をフローサイトメトリにより測定することが可能であり、(B) 定性管理分析、および/または(C) 定量管理分析をライセートについて実行することをさらに含む、腫瘍特異的融合タンパク質を検出するための方法が提供される。

【0008】

工程(B)は、少なくとも、ビーズ結合捕捉プローブと、細胞内に存在することが知られているハウスホールドタンパク質に対する蛍光標識化検出プローブとに、細胞ライセートを接触させることを含み、各プローブは、前記ハウスホールドタンパク質の異なる結合部位を認識して、融合タンパク質の存在について分析されたライセート中における無傷のタンパク質の量を測定するために、前記ハウスホールドタンパク質への前記プローブの結合をフローサイトメトリによって測定することが可能である。

10

【0009】

工程(C)は、融合タンパク質分析工程(A)において使用された蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブを、少なくとも第1セットの定量ビーズと接触させることを含み、ビーズには、蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブのための既知量の結合部位が設けられ、さらに、工程(C)は、フローサイトメトリによって、前記既知量の結合部位と関連付けられる蛍光シグナルを測定することを含み。後者は、工程(A)において検出された融合タンパク質の量の指標を提供できる。

20

【0010】

したがって、例えば、US 6 6 8 6 1 6 5、またはWO 2 0 0 5 / 0 1 5 2 3 5の教示に用いられている融合タンパク質検出分析(A)に加えて、本発明の方法は、定性管理分析(B)および/または定量管理分析(C)により特徴付けられる。好ましくは、本発明の方法は、分析(A)および(B)、または(A)および(C)、または(A)、(B)および(C)をシングルチューブで同時に含む。

【発明の詳細な説明】

【0011】

分析(B)は、腫瘍特異的融合タンパク質の存在についてアッセイされる標的である数種類の細胞、特に、不要なタンパク質の分解を引き起こすプロテアーゼ活性が解放される白血球の溶解に関する洞察に基づく。特に、より成熟した骨髄細胞は、細胞溶解時に放出される細胞内タンパク質を急速に分解する、高濃度の様々なプロテアーゼを有する顆粒を含んでいると考えられる。また、もし分析された白血球サンプル中に(成熟した)骨髄細胞が存在していれば、放出された融合タンパク質は細胞の溶解時に分解されることが考えられる。このプロテアーゼの問題は、特に慢性骨髄性白血病(CML)の細胞ライセート中のBCR-ABL融合タンパク質を検出する場合に顕著である。CML細胞は、より成熟した骨髄細胞を表し、そのため、それらの顆粒内に高濃度のプロテアーゼを含み得る。

30

【0012】

細胞ライセート中のタンパク質の完全性が確かめられていない場合は、タンパク質分解のために融合タンパク質が検出できず、偽陰性の結果が得られることがある。したがって、細胞のサンプルが、顆粒球、またはCML細胞のような(より)成熟した骨髄細胞を含んでいる場合は特に、免疫ビーズアッセイを受ける細胞ライセート中のタンパク質の完全性を確認することが重要である。

40

【0013】

定性管理分析(B)は、腫瘍特異的融合タンパク質を含む疑いのある患者サンプルが、悪性腫瘍に関与することが知られている1つ以上の融合タンパク質の存在について分析される場合、診断時に有利に実行される。これは一般的に多重形式アッセイを用いて行われ、プローブの異なるセットが異なる融合タンパク質を同時に検出するために使用される。

50

分析 (B) における定性管理ビーズの使用は、陰性になり得るアッセイ結果を確実なものにする。すなわち、細胞ライセートがタンパク質の完全性の面で十分な品質であることが分かっている場合に結論が出されるという意味で、腫瘍特異的融合タンパク質の欠如が正確に判断される。

【 0 0 1 4 】

例えば、異なる大きさ、および / または色を有するビーズを使用する多重分析を計画することにより、融合タンパク質、およびハウスホールドタンパク質をシングルチューブで検出し得る (図 1) 。このことは、融合タンパク質の検出アッセイについて適した定性管理を保証する。例えば、ハウスホールドタンパク質のシグナルが特定の閾値以下であることが分かっている場合は、融合タンパク質分析の陰性結果 (すなわち、融合タンパク質が

10

検出されない) は、放棄されるか、または対応する融合遺伝子を検出するための P C R に基づく方法のような他の検出方法によって少なくとも検証されるだろう。代わりに、またはそれに加えて、融合タンパク質分析は、品質を向上させたサンプル、例えば、プロテアーゼ活性が (さらに) 阻害された、および / または核融合タンパク質が D N A から解放された、ライセートを用いて繰り返し得る。詳細については、以下を参照のこと。

【 0 0 1 5 】

ハウスホールド遺伝子、およびハウスホールドタンパク質は、腫瘍関連融合タンパク質の発現に関わりなく、細胞で発現されている任意のタンパク質である。好ましくは、ハウスホールド遺伝子、およびタンパク質は恒常的に発現される。また、検査される細胞の種類に発現しているハウスホールドタンパク質が好ましい。

20

【 0 0 1 6 】

本発明によれば、細胞ライセート中のタンパク質の完全性は、検査される細胞で安定して存在している明確に定義されたハウスホールドタンパク質の完全性を確認することによって評価される。例えば、白血球において、検出されるハウスホールドタンパク質は、A B L、 β 2 m、アクチン、M G U S、G A D H、 α -アクチンなどのようなアクチンなどとすることができる。類似の免疫ビーズアッセイにより、このハウスホールドタンパク質を融合タンパク質として検出すると便利である。したがって、ハウスホールドタンパク質は、少なくとも、ハウスホールドタンパク質の異なる結合サイトに対する、ビーズ結合捕捉プローブと、蛍光標識化検出プローブとを用いて検出することができる。好ましくは、この2つのプローブは、ハウスホールドタンパク質に結合するために競合しない。より好ましくは、細胞ライセート中にプロテアーゼ活性が存在する場合に陰性の結果を得るために、異なるプローブによって認識されるハウスホールドタンパク質の結合部位、またはエピトープの少なくとも2つは、2つのエピトープの間に潜在的なプロテアーゼ標的部位を有するように互いに空間的に十分に分離しているべきである。したがって、ハウスホールドタンパク質に対する捕捉プローブ、および検出プローブは、それぞれ前記ハウスホールドタンパク質のN末端およびC末端の結合部位、またはそれぞれ前記ハウスホールドタンパク質のC末端およびN末端の結合部位を認識することが可能である。アッセイについて最も高い感度を得るために、エピトープは、ハウスホールドタンパク質の末端部の25%

30

40

【 0 0 1 7 】

特定のエピトープに対するプローブは、当技術分野で知られている方法によって製造することができる。例えば、特異的な (モノクローナル) 抗体プローブは、エピトープを含む組換えタンパク質のドメイン、またはペプチド免疫原を用いて生成することができる。

【 0 0 1 8 】

用語「プローブ」は、本発明の方法で検出される標的タンパク質、すなわち融合タンパク質、またはハウスホールドタンパク質に特異的に結合することができる部分を含む、任意の一部を意味する。プローブは、標的に特異的に結合することができる核酸、ペプチド、P N A、および他の分子を含み得る。極めて適切なプローブは、(モノクローナル)抗

50

体、またはそれらの機能的フラグメントである。

【0019】

用語「腫瘍特異的融合タンパク質」は、公知の、および既に発見された全ての悪性融合遺伝子によってコードされるタンパク質を意味する。腫瘍特異的融合タンパク質は、当技術分野で広く知られている。それらを含むものが、参照により本明細書に組み込まれるUS 6686165の表1および2に記載されている。また、Mitelmanらに開示された融合タンパク質は、参照によりここに組み込まれている(Nat. Rev. Cancer 2007;7:233-245)。

【0020】

用語「蛍光色素」は、任意の蛍光分子、または検出可能なシグナルを生成することができる一部を意味する。プローブに標識するために有用な蛍光色素は、フルオレセイン、ローダミン、ベンゾフェノキサジン、エネルギー転移色素、およびシアニンを含む。

【0021】

用語「ビーズ」は、フローサイトメトリによる分析に適した特性を有する粒子を意味する。このようなビーズは、当該技術分野で知られている。それらは、プラスチック、ポリスチレン、ラテックス、およびその他の高分子物質を含む任意の適した材料で作製でき、一般的に球形である。多重アッセイを可能にするために、異なる種類のビーズ(融合タンパク質捕捉ビーズ、ハウスホールドタンパク質捕捉ビーズ、および/または異なるセットの定量ビーズ)は、好ましくは互いに区別され得る。例えば、異なる大きさ、および/または色のビーズを使用し得る。本明細書において使用される用語「免疫ビーズ」は、抗体

10

20

【0022】

本発明のさらなる管理分析は、定量管理分析を含む。融合タンパク質の量の定量は、腫瘍特異的融合タンパク質を検出するためのビーズベースアッセイの応用法において、これまで使用されていない。腫瘍特異的融合タンパク質は、とりわけ、微小残存病変(MRD)の検出に使用することができ、それは融合タンパク質の信頼性の高い定量のための方法を提供するために望ましい。この目的のために、ビーズの複数の異なるセット(異なる色のビーズの2以上のセットなど)を用いて、素晴らしいビーズベースアッセイを提供することができる。それらの各々は、免疫ビーズアッセイに關与する検出抗体(例えば、BCR-ABLのアッセイの場合には抗ABL)により認識されるタンパク質ドメインにより異なる密度で覆われている。したがって、本発明の方法の工程(C)は、標準曲線のプロット(またはキャリブレーション)を可能とするために、好ましくは、少なくとも、第1既知量の結合部位を含む第1セットの定量ビーズと、前記結合部位の第2既知量を含む第2セットの定量ビーズとの使用を含む。2セット以上の定量ビーズを使用して、より信頼性の高い標準曲線を取得することができることが理解される。好ましい実施形態において、異なる大きさ/色のビーズの少なくとも3セットの混合物が使用され、各セットは、異なる量、および/または結合部位の密度で提供される。例えば、標準曲線を得るために、定量ビーズの5セットの混合物がアッセイに含まれ、ビーズあたりの結合部位(抗原)は、300から30000までの範囲にわたる。セット内のビーズの量は、変更することができる。例えば、わずか50または100個のビーズが十分なシグナルを生成する可能性

30

40

【0023】

共有結合、紫外線架橋、および親和性の組合せによる結合を用いてタンパク質の結合部位に取り付けるなど、当該分野で知られている方法によって、既知量の結合部位を有するビーズを提供することができる。非限定的な例として、ニッケルビーズ上を被覆したヒスタグによりタンパク質性の結合部位が提供される。

【0024】

異なるビーズの混合物と、定量ビーズに基づいて作成することができる標準曲線とを図2にまとめた。この標準曲線は、融合タンパク質アッセイの結果をプロットするために使用することができ、これにより、例えば、診断での結果(D)と、フォローアップの間の

50

複数の時点（F1およびF2）との比較を可能にする。この方法では、融合タンパク質の濃度の動態と、それにより白血病細胞の動態とを正確に観察することが可能となる。定量管理解析（C）は、患者の観察の間において、特定の腫瘍特異的融合タンパク質のアクセシと組み合わせて有効に使用されている。しかし、診断の早期の段階においても、融合タンパク質の実際の量に関する情報を治療前に取得することは有用であり得る。前記量は、好ましくは、白血病細胞あたり、または血液量あたりの融合タンパク質の量として表現される。

【0025】

定量ビーズは、適切な免疫ビーズ融合タンパク質検出アクセシとともに、シングルチューブ多重形式で実行することができる（BCR-ABL、およびPML-RARAについては図3を参照）。また、例えば、腫瘍特異的融合タンパク質の1つ以上に関して分析されている複数の患者のサンプルに並行して処理されている、別の試験管において定量ビーズを使用することが可能である。

10

【0026】

本発明の方法についての多重化の可能性は、融合タンパク質ビーズ、定性管理ビーズ（ハウスホールドタンパク質ビーズ）、および定量ビーズの組み合わせを可能にする（図3を参照）。

【0027】

本システムは、容易に確立でき、カスタマイズ、および個々の設定を提供する。ビーズは、単一の定量化分析、または多重アレイのために使用することができる。明瞭に色付けされた大量の微小球体は、非常に低コストで製造することができる。アレイのための全ての構成要素は、数か月間預けることができ、短時間で組み立てることができる。調製された多重ビーズアレイは冷蔵庫で保管することができ、数週間安定である。さらに、アレイは、異なる直径の型を有するビーズ集団に変えることにより、および高分子電解質層（例えば、Cy5）内に追加の蛍光マーカを導入することにより、拡張することができる。例えば、Luminex社が販売する標準的なビーズ技術は、2つの蛍光色素の混合物に基づく百種類の異なるビーズを有する。

20

【0028】

アレイの感度は、例えば、優れた信号対雑音比を有するフィコエリスリン（PE）標識された二次抗体の使用により、さらに増加させることができる。一定量の抗体についてビーズ数を減少させるとシグナル強度が増加するため、システムの性能は、適切な粒子対抗体比に調整することによりさらに最適化できる。

30

【0029】

本発明のさらなる態様は、腫瘍特異的融合タンパク質を検出するためのビーズベースアクセシの偽陰性結果の発生を低減することに関する。これは、細胞に本来存在していた腫瘍特異的融合タンパク質を捕捉/検出アクセシに供される細胞ライセートにおいて実際に検出する可能性を高める手段によって達成される。本発明者らは、PML-RARA、AML-ETO、およびTEL-AML1のような、数種の腫瘍特異的融合タンパク質が、それら自身がDNA結合分子であること、または転写因子タンパク質複合体に関与していることを十分に理解した。伝統的な細胞溶解法では、これらの核タンパク質は、核、およびDNA結合タンパク質複合体から容易に解放されない。免疫ビーズアクセシによりそれらを検出するためには、これらの融合タンパク質を解放するための追加の努力が必要である。当技術分野において、超音波によって核タンパク質を解放することが知られている。しかし、超音波処理には、いくつかの欠点がある。第1に、特別な実験施設が必要である。第2に、従来の超音波処理は、生物学的サンプルと直接に接触する探触子を使用する。超音波エネルギーが、液体中の超音波探触子の深さに依存するので、再現性の面で大きな欠点を有する。このことは、（診断）研究室間のプロトコルの標準化された移転を妨げる。さらに、探触子システムは、作業に長時間かかり、泡を生成し、一度に1つのサンプルしか処理することができない。また、異なるサンプル間における汚染も頻繁に経験されることである。腫瘍特異的融合タンパク質の検出のために特に重要なことに関して、本発明

40

50

者らは、融合タンパク質を検出するための方法において超音波処理の工程を回避することが好ましいことを見出した。例えば、BCR - ABL陽性であることが分かっているライセートを捕捉/検出アッセイによる分析の前に超音波処理した場合、細胞質融合タンパク質BCR - ABLは、非常に低い濃度で検出された。理論に束縛されるものではないが、超音波処理は、(例えば、変性による)タンパク質内部での構造変化により特異的(抗体)プローブに対するその親和性を低減すると考えられる。したがって、腫瘍特異的融合タンパク質が、細胞質、核、または他の細胞内コンパートメントに局在しているかどうかに関わらず、超音波処理は、任意の腫瘍特異的融合タンパク質を検出することを目的とする(多重化)免疫ビーズアッセイでの使用には適さない。

【0030】

驚くべきことに、この問題は、核酸から核融合タンパク質を解放、または遊離し、それによって、捕捉/検出プローブセットにより認識するため、および捕捉/検出プローブセットに結合するために、それらをより接近させることができるヌクレアーゼ処理、より好ましくはエンドヌクレアーゼ処理、さらに好ましくはデオキシリボヌクレアーゼ処理により克服することができることが判明した。したがって、本発明は、細胞を含むサンプル中の融合タンパク質を検出するための方法であって、前記細胞ライセートを調製すること、および、少なくとも、融合タンパク質の少なくとも1つに対する蛍光標識化検出プローブと、ビーズ結合捕捉プローブとを前記ライセートに接触させることを含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側の部位に位置する結合部位を認識することができる、かつフローサイトメトリにより前記融合タンパク質への前記プローブの結合を測定することができる方法を提供する。また、換言すれば、本発明は、細胞を含むサンプル中の融合タンパク質を検出するための方法に関し、当該方法は、細胞を含むサンプル中の融合タンパク質を検出するための方法であって、前記細胞ライセートを調製すること、および、少なくとも、融合タンパク質の少なくとも1つに対する蛍光標識化検出プローブと、ビーズ結合捕捉プローブとを前記ライセートに接触させることを含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側の部位に位置する結合部位を認識することができる、かつフローサイトメトリにより前記融合タンパク質への前記プローブの結合を測定することができる。ここで前記細胞ライセートの調製は、ヌクレアーゼ、好ましくはエンドヌクレアーゼの使用を含む。

【0031】

数種のヌクレアーゼについて、DNAに結合する融合タンパク質の検出のために試験した。細胞ライセートを調製するための溶解緩衝液に、例えば、Merck KGaA、Darmstadtから販売されているBenzonase(登録商標)のようなセラチアマルセセンス(*Serratia marcescens*)に由来する非特異的エンドヌクレアーゼを添加することによって、非常に良い結果が得られた。Benzonase(登録商標)は、遺伝子組み換え酵素である。当該酵素については、US 5 173 418およびEP 0 229 866を参照のこと。当業者は、核融合タンパク質を解放するために、エンドヌクレアーゼの必要な濃度を決定することができる。好ましくは、Benzonaseは、少なくとも10 mU/ml、好ましくは、25 mU/ml以上のような、少なくとも20 mU/mlの濃度で使用される。

【0032】

Benzonaseのプロトコルは、数種の他の融合タンパク質アッセイ(例えば、ABL - BCRなど)で試験されている。これらの実験は、エンドヌクレアーゼ処理が、超音波処理とは対照的に、細胞質の腫瘍特異的融合タンパク質の免疫ビーズアッセイの結果に効果がないか、またはわずかな負の効果(信号の消失、またはわずかな減少)しか有さないことを示した。したがって、Benzonaseのようなエンドヌクレアーゼは、融合タンパク質の型、または細胞内局在に関係なく、融合タンパク質を検出するためのプロトコルに有利に含まれ得る。このことは、例えば多重アッセイのような、シングルチューブで様々な腫瘍特異的融合タンパク質の異なるものが同時に検出される多重アッセイのために特に重要である。

【0033】

エンドヌクレアーゼの使用は、細胞調製物の完全なプロテオームから部分的プロテオーム (partial proteome) を得るための方法におけるような、主に細胞内画分に関する技術分野で知られている。US 7 2 6 2 2 8 3 は、細胞質タンパク質に富んだ部分的プロテオーム、膜/器官タンパク質に富んだ部分的プロテオーム、細胞核内に由来するタンパク質に富んだ部分的プロテオーム、ならびに細胞骨格および核基質のタンパク質に富んだ部分的プロテオームの連続的な生成のための方法において、「不溶性」核タンパク質 (例えば、ヒストン) の抽出のための Benzonase (登録商標) の使用を開示している。Martinezらの研究 (BMC Cancer、2004; 4: 44) は、t (8; 21) 陽性の急性骨髄性白血病に関連する AML1 - ETO としても知られている融合タンパク質 RUNX1 - CBF A2 T1 に関する。RUNX1 - CBF A2 T1 の免疫プロット分析のための核ライセートを得るために、Benzonase を含む溶解緩衝液で細胞を洗浄した。しかし、従来技術は、本明細書に開示されているような (多重) ビーズベース捕捉/検出アッセイに用いる、多様な腫瘍特異的融合タンパク質を分析するための全細胞ライセートの調製におけるエンドヌクレアーゼの使用を教示、または示唆していない。

10

20

30

40

50

【0034】

覆い隠された融合タンパク質の検出の問題に対するさらなる解決策は、タンパク質分解の阻害に関連して本明細書で提供される。上記したように、プロテアーゼ活性は、ビーズに基づく (免疫) 検出アッセイにおける融合タンパク質の完全性に極めて大きな影響を与える。この問題は、成熟した (さらに成熟した) 骨髄細胞が、患者サンプル中に存在している場合に特に顕著である。特に、顆粒球または CML 細胞が高頻度に存在する患者検体においては、タンパク質分解のために、偽陰性の結果を得ることがあり得る。例えば、BCR - ABL は、B - ALL 体細胞、および K562 のような腫瘍細胞株で容易に検出される。しかし、CML 患者における BCR - ABL の検出は、おそらく、カテプシン、プロテアーゼ 3、および エラスターゼ のような骨髄性プロテアーゼのために、重度に妨げられている。

【0035】

本発明者らによって実行された一連のプロトコル最適化実験は、細胞溶解の前 (すなわち、溶解緩衝液を用いないプレインキュベーション工程)、および細胞溶解の間 (すなわち溶解緩衝液) に、無傷の細胞にプロテアーゼ阻害剤を添加した場合にのみ、腫瘍特異的タンパク質の変性が効果的に阻害されることを明らかにした。この複合的なアプローチは、プロテアーゼ活性の驚くほど強い減少をもたらし、それにより偽陰性結果を防ぐことに寄与する。

【0036】

したがって、本発明は、細胞を含むサンプル中の融合タンパク質を検出するための方法であって、前記細胞ライセートを調製すること、および、少なくとも、融合タンパク質の少なくとも1つに対する蛍光標識化検出プローブと、ビーズ結合捕捉プローブとを前記ライセートに接触させる工程を含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側の部位に位置する結合部位を認識することができ、かつフローサイトメトリにより前記融合タンパク質への前記プローブの結合を測定することができ、ここで前記細胞ライセートの調製は、プロテアーゼ阻害剤の1つ以上を含む溶解緩衝液中で前処理された細胞の溶解に続いて、細胞透過性のプロテアーゼ阻害剤の少なくとも1つによる無傷の (生存能力のある) 細胞の処理を含む、方法を提供する。一実施形態では、細胞のサンプルは、白血球、単核細胞、顆粒球またはそれらの混合物を含む。好ましくは、少なくとも1つの、無傷の細胞を不可逆的なセリンプロテアーゼ阻害剤とインキュベートする。極めて適したセリンプロテアーゼ阻害剤は、フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、および 4 - (2 - アミノエチル) ベンゼンスルホニルフルオリド ハイドロクロライド (AEB SF HCI) である。AEB SF は、239.5 Da の分子量を有する、水溶性の不可逆的なセリンプロテアーゼ阻害剤である。これは、キモトリプシン、カリクレイン、プラスミン、トロンピン、およびトリプシンのようなプロテアーゼを阻害する。特異性は、阻害剤 PMSF に似ているが、それにもかかわらず AEB SF は、低い pH 値に

においてより安定している。PMSFはセリンプロテアーゼ阻害剤であるが、全てのセリンプロテアーゼを阻害するわけではない。PMSFは、水中で急速に分解する。また、保存液は、通常、無水エタノール、イソプロパノール、コーン油、またはDMSOで構成される。

【0037】

PMSFとAEBSFの併用は、特に、溶解緩衝液中において、その他のプロテアーゼ阻害剤と組み合わせた場合に、プロテアーゼ活性の顕著な低下をもたらすことが分かった（実施例1を参照）。したがって、好ましくは、PMSFおよびAEBSFの組み合わせが無傷の細胞を前処理するために使用される。PMSFは、様々な濃度、例えば、最終的に0.5~5mM、好ましくは、最終的に約1mMのように0.5~2mMで使用することができる。AEBSFは、通常、高濃度、例えば、5~50mM、好ましくは、約20mMのような、10~30mMで使用される。

10

【0038】

その他のプロテアーゼ阻害剤を溶解緩衝液に添加することは、ライセート中におけるプロテアーゼ活性をさらに低下させるために役立つ。好ましい実施形態では、溶解緩衝液は、数種類の（広範な）プロテアーゼ阻害剤の標準的なカクテルを補われている。細胞は異なる種類のプロテアーゼを有しているため、異なるプロテアーゼ阻害剤の混合物は、通常、細胞溶解後に細胞タンパク質の組成物を維持、および保持する必要がある。典型的なカクテルは、セリン、システイン、アスパラギン、およびメタロプロテアーゼを阻害するための広範な特異性を有する水溶性プロテアーゼ阻害剤の混合物を含む。これらは、当技術分野で知られており、様々な商業的供給源から得ることができる。例えば、BDバイオサイエンスファーマインジェン社により販売されているプロテアーゼ阻害剤カクテル（Baculo Gold（商標））を使用することができる。この50倍に濃縮されたカクテルは、ベンズアミジンHCl、フェナントロリン、アプロチニン、ロイペプチン、ペプスタチン、およびPMSFを含む。溶解緩衝液を補うために利用可能な市販の別のプロテアーゼ混合物は、AEBSF、E-64、ペスタチン、ロイペプチン、アプロチニン、およびナトリウムEDTAを含む。本発明の方法におけるプロテアーゼ阻害剤の他の組み合わせの使用も包含されることが理解される。

20

【0039】

本発明のさらなる態様は、開示されているような融合タンパク質を検出するための方法において使用するためのキットに関する。本発明のキットは、特定の望ましい適用（例えば、診断、治療の追跡調査）に応じて様々な構成を含み得ることが理解される。

30

【0040】

一実施形態では、上記キットは、

少なくとも、第1のビーズ結合した融合タンパク質捕捉プローブ（A1）と、第2の蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブ（A2）とを含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側に位置する結合部位を認識することができる、プローブセット（A）、

ビーズ結合したハウスホールドタンパク質捕捉プローブ（B1）、および蛍光標識化したハウスホールドタンパク質検出プローブ（B2）を含み、それぞれのプローブは、前記細胞内で発現されたハウスホールドタンパク質の異なる部位に位置する結合部位を認識することができる、プローブセット（B）、および/または

40

少なくとも、第1セットの定量ビーズ（C1）であって、融合タンパク質検出プローブ（A2）のための第1既知量の結合部位を備える定量ビーズ（C1）、を含む。

【0041】

好ましいプローブは、抗体、またはその機能断片である。しかし、ビーズおよび/または蛍光色素に結合することができる、他の種類の特異的結合分子も包含される。

【0042】

キットは、さらに第2セットの定量ビーズ（C2）を含み、前記定量ビーズがプローブ（A2）への第2既知量の結合部位を備える。第1セットの定量ビーズとともに使用する

50

ことで、これは標準曲線をプロットすることを可能にする。好ましくは、キットは、定量ビーズの少なくとも3セット、より好ましくは少なくとも4セットを含み、各セットは、融合タンパク質検出プローブの結合部位の異なる量を備える。定量ビーズの複数のセットの間において、例えば、ビーズの異なるセットの間で少なくとも2～3倍の結合部位の量の差のような、有意な差があることが当然に理解される。さらに、定量ビーズは、サンプルにおいて検出される融合タンパク質の数を含むことが予想される、または予想できる、結合部位の範囲を含むことが好ましい。例えば、本発明のキットは、ビーズあたり約300～約30000の結合部位の範囲にわたるビーズの5セットを含む。定量ビーズの複数のセットのシングルチューブアッセイについて、異なるセットに属するビーズが、例えば、大きさ、および/または色に基づいて、互いに区別できることが好ましい。その場合には、キットには、定量ビーズの2以上のセットの混合物を含み得る。最も好ましいものは、Luminex（登録商標）ビーズのように、定量ビーズの異なる色のセットを含むキットである。その他の利用可能なキットの構成要素は、緩衝液、溶解試薬、および/または洗浄試薬を含む。

10

20

30

40

50

【0043】

複数の腫瘍特異的融合タンパク質の検出を可能にするために、キットは、互いのプローブセットが、異なる腫瘍特異的融合タンパク質に特異的に結合すること、および異なる腫瘍特異的融合タンパク質を検出することを可能とするプローブセット(A)の少なくとも2つを含む。例えば、キットは、BCR-ABLを検出するための抗体である、ビーズ結合した抗BCR抗体、および蛍光標識化抗ABL抗体だけでなく、PML-RARAを検出するための抗体である、ビーズ結合した抗RARA抗体、および蛍光標識化抗PML抗体を含む。重ねて、例えば、抗BCRビーズおよび抗PMLビーズのような異なるビーズは、フローサイトメトリにより区別できることが好ましい。もちろん、腫瘍特異的プローブセットの任意の組み合わせが、本発明のキットに存することができる。一態様では、MLL-AF4、MLL-AF6、MLL-AF9、MLL-ENL、MLL-AF10、MLL-ELL、PML-RARA、PLZF-RARA、NPM-RARA、NUMA-RARA、NPM-ALK、TPM3-ALK、TFG-ALK、ATIC-ALK、EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-ETV1、AML1-ETO、PML-RARA、CBFB-MYH11、E2A-PBX1、BCR-ABL、およびTEL-AML1からなる群から選択された少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つの腫瘍特異的融合タンパク質に対するプローブセット(A)を含む(Mitelmanら、Nat. Rev. Cancer 2007;7:233-245)。

【0044】

本発明のキットにおけるプローブセット(B)は、ハウスホールドタンパク質に対する。例えば、それはビーズ結合捕捉抗体、およびABL、2M、GUS、GADH、アクチン、またはその他からなる群から選択されたハウスホールドタンパク質の異なる部位に対するビーズ結合した蛍光標識化抗体を含む。定性管理分析(B)の信頼性を向上させるために、プローブセット(B)に対する結合部位(エピトープ)は、お互いに十分に離れていること、それによりできるだけ多くのプロテアーゼ部位を含むことが好ましい。例えば、それらは、ハウスホールドタンパク質の端部の25%、好ましくは15%、最も好ましくは、C-respN末端10%を占めるアミノ酸ストレッチにそれぞれ存在する。

【0045】

本発明のさらなる態様は、細胞内の腫瘍特異的融合タンパク質のフローサイトメトリ検出のためのキットに関し、当該キットは、少なくとも、第1のビーズ結合した融合タンパク質捕捉プローブ(A1)と、第2の蛍光標識化した融合タンパク質検出プローブ(A2)とを含み、それぞれのプローブは、前記融合タンパク質の融合領域の反対側に位置する結合部位を認識することができる、プローブセット(A)を含む。ここで、上記キットは、さらにエンドヌクレアーゼを含む。上記したように、エンドヌクレアーゼは、超音波処理を必要とせず、DNAに結合した腫瘍特異的融合タンパク質の検出を促進するために有

効に使用される。好ましくは、キットは、セラチアマルセセンスに由来する非特異的なエンドヌクレアーゼ、より好ましくはBenzonase（登録商標）を含む。

【0046】

なお、さらなる態様は、細胞透過性の不可逆的なセリンプロテアーゼ阻害剤の少なくとも1つ、好ましくは、フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）または4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド ハイドロクロライド（AEBSFHCI）、より好ましくは、PMSFおよびAEBSFの組合せを含む第1の容器と、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む第2の容器とを含む、キットに関する。阻害剤カクテルは、キットに含まれる細胞溶解緩衝液の一部として存在し得る。

【0047】

融合タンパク質検出アッセイの感度は、WO2005/015235に開示された、いわゆる「プレ-クリア工程」をライセートに施すことにより改善することができる。従って、本発明のキットは、天然タンパク質に特異的に反応するビーズ結合した、少なくとも1つの結合分子をさらに含み、前記天然タンパク質の断片が、検出される腫瘍特異的タンパク質の一部であって、前記結合分子が、天然タンパク質に反応するが融合タンパク質に反応しない。一実施形態では、これらのいわゆる「プレクリアビーズ」は、BCR-ABL融合タンパク質に存在していないBCR、またはABLの断片と反応する。

【0048】

本明細書において開示されたのは、特に、疾患の診断、分類、および/または観察のような、多くの臨床診断適用におけるキットの使用である。提供されるのは、例えば、腫瘍融合タンパク質の特性がまだ明らかにされていない、腫瘍融合タンパク質を含む疑いのある患者サンプルについて免疫ビーズアッセイを行うために特に設計された「診断キット」である。診断キットは、通常、複数の腫瘍特異的融合タンパク質の同時検出のための複数のプローブセットAと、細胞ライセートの完全性を評価するための定性管理ビーズとを含む。キットは、好ましくは、細胞ライセートの調製のために、PMSF、AEBSF、およびBenzonase（商標）のようなエンドヌクレアーゼをも含む。ここで、もし腫瘍融合タンパク質が存在するならば、その品質および量の両者は最大化されている。

【0049】

さらに他の実施形態は、例えば、特定の融合タンパク質を有し、治療を受けていることが知られているMRD患者の追跡調査のため、特に疾患の観察のために設計された「モニタリングキット」に関する。モニタリングキットは、通常、BCR-ABLのような、明らかにされている融合タンパク質を検出するためのプローブセット、融合タンパク質検出プローブに結合可能な定量管理ビーズ（例えば、蛍光色素標識された抗BCR抗体により認識されるBCR断片の既知の密度で覆われたビーズ）を含む。好ましくは、ライセートに由来する競合天然タンパク質を除去するために、天然の非融合タンパク質（例えば、BCRまたはABL）を激減させることができ、それによって、検出感度を向上させる好適なプレクリアビーズを含む。モニタリングキットは、診断キットと同様に、さらにPMSF、AEBSF、およびBenzonase（商標）のようなエンドヌクレアーゼを含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】融合タンパク質の検出および定性管理分析の概略図である。上部は、融合タンパク質のBCR-resp、RARAフラグメントに対するビーズ結合捕捉プローブ、および融合タンパク質のABL-resp、PML-フラグメントを認識することができる蛍光色素（この場合はPE）検出プローブを用いる腫瘍特異的融合タンパク質の検出を示す（パネルA：BCR-ABL、パネルB：RARA-PML）。並行して、好ましくは同一のチューブ内で、溶解液の完全性は、ハウスホールドタンパク質（HH、およびHH検出プローブに共役した蛍光標識（PE）を認識、および捕捉することができる定性管理ビーズを用いて評価される（パネル3および4）。パネル1～4において使用される区別可能なビーズ（この場合はビーズの異なる灰色の網かけにより示される）の使用は、シングルチューブにおいて融合タンパク質の異なるもの、およびハウスホールドタンパク質を同

10

20

30

40

50

時に検出することを可能とする。

【図2】パネルAは、定量ビーズの5つのセットの概略図を示し、それぞれのビーズのセットは、腫瘍特異的検出プローブへの結合部位（抗原）の異なる量を備える。パネルBは、定量ビーズを使用して得られる例示的な標準曲線を示す。この標準曲線は、融合タンパク質アッセイの結果をプロットするために使用することができる。これにより、例えば、診断（D）とフォローアップ（F1およびF2）の間の複数の時点との間の比較を可能とする。これにより、融合タンパク質の濃度の動態を正確に観察することが可能となり、それによって、白血病細胞の動態を正確に観察することが可能となる。

【図3】定量ビーズと共に複雑な免疫ビーズアッセイを多重形式で実行することができる（この場合、BCR-ABL（パネルA）およびPML-RARA（パネルB）の検出）
。また、複雑な免疫ビーズアッセイで分析される複数の患者のサンプルに対して、分離されたチューブにおいて定量ビーズを並行して使用することができる。溶解液の質は、無傷のハウスホールドタンパク質の量を検出することで確認することができる。図1および図2に示したように、ビーズの異なる「グレー色」は、検出抗体の蛍光色素を同一にできると同時に、フローサイトメトリ中に異なるビーズを認識できることを示す。

【図4】K562細胞におけるBCR-ABLの検出において、細胞を溶解する前にプロテアーゼ阻害剤で無傷の細胞を前処理する影響。詳細については、実施例1を参照。Y軸は、BCR-ABLの信号対雑音比を示す。

【図5】DNA結合腫瘍特異的融合タンパク質TEL-AMLの検出における、エンドヌクレアーゼ処理の影響。詳細については、実施例2を参照。Y軸は、TEL-AMLの信号対雑音比を示す。

【実施例】

【0051】

実施例1：BCR-ABL融合タンパク質の検出における、プロテアーゼ阻害剤の効果（前処理および/または溶解中）。

【0052】

細胞：K562は、急性転化の間の慢性骨髄性白血病の患者から得られたPh⁺細胞株である。この細胞株は、BCR-ABL融合タンパク質のp210アイソフォームを発現する。697は、プロテアーゼに陰性であるPh⁺白血病細胞株であり、(t(1;19))転座を含む。総白血球細胞(WBC)は、赤血球のNH4CI溶解後に健康なドナーの全血から得た。血液は、健康なドナーのインフォームドコンセント後に採取した。

【0053】

テストサンプル：白血病サンプルを模倣するために、Ph⁺陽性細胞株K562の細胞と健康なドナーのWBC（プロテアーゼを多量に含む）とを混合した。コントロールとして、K562細胞と、ほとんどプロテアーゼ活性を含まないPh⁻細胞株679の細胞とを1:4の比率で混合した。溶解の前に、まだ無傷の細胞を細胞透過性プロテアーゼ阻害剤の存在下、または非存在下において氷上でインキュベートした。その後、プロテアーゼ阻害剤（PIC）の有無それぞれの場合について、その細胞を溶解緩衝液に再懸濁した。氷上でインキュベーション後、細胞ライセートをスピンドウンし、上清を無傷のBCR-ABL融合タンパク質の存在を検出するビーズアッセイに用いた。

【0054】

細胞透過性プロテアーゼ阻害剤による細胞の前処理：細胞溶解中のプロテアーゼ活性を阻害するために、無傷の細胞を細胞透過性プロテアーゼ阻害剤で処理した。沈殿した細胞を、20mM AEBSF（4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホニルフルオリド、シグマアルドリッチ、Zwijndrecht、オランダ）、および1mMまたは5mM PMSF（フェニルメタンスホニルフルオリド、シグマアルドリッチ）1mlをPBS中に添加した前処理緩衝液に再懸濁し、氷上で10分間インキュベートした。その後、細胞を4、520Gで5分間スピンドウンした。

【0055】

細胞ライセートの生成：沈殿した細胞を、プロテアーゼ阻害剤カクテル（PIC、シグ

10

20

30

40

50

マアルドリッチ、product nr. P 2 7 1 4) の有無それぞれの場合について、R I P A 緩衝液 (5 0 m M トリス塩酸 p H 7 . 4、1 5 0 m M N a C l、1 % N P 4 0、0 . 5 % ソディウムデオキシクロライド、1 m M E D T A、0 . 1 % S D S、および 0 . 0 1 % のアジ化ナトリウム) 中で再懸濁した。(特に明記しない限り、2 5 万細胞 / m l)。氷上で 3 0 分間のインキュベーション後、細胞残渣を除去するために、上記ライセートをスピンドウンし、ライセートの上清をフローサイトメトリビーズアッセイで使用した。

【 0 0 5 6 】

ビーズアッセイ：5 0 μ l のライセート、抗 B C R 抗体 (捕捉プローブ) ビーズで提供される 2 5 μ l のビーズ、および P B S / 1 % B S A に溶解した P E 共役抗 A B L 抗体 (検出プローブ) を濾板 (ミリポア社製) に添加し、振盪しながら室温で 2 時間インキュベートした。濾板を P B S / 1 % B S A で 3 回洗浄し、濾過した。続いて、1 0 0 0 個のビーズを F A C S カント I I フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e) で得た。

10

【 0 0 5 7 】

全ての異なるインキュベート条件について、B C R - A B L ビーズアッセイは、標準のプロトコルに従って行った。定量の割合は、様々なインキュベート条件で処理された K 5 6 2 細胞のライセート中で検出された平均蛍光シグナルと、アッセイ (前処理、溶解、およびビーズアッセイを含む) が健康な個人の純粋な W B C の細胞ライセートについて行われた場合に得られた平均蛍光シグナル (バックグラウンド値) との間で計算した。

【 0 0 5 8 】

結果：図 4 は、プロテアーゼ阻害剤が使用されていない場合でも、プロテアーゼの少ない K 5 6 2 細胞の細胞ライセート中で容易に B C R - A B L が検出できることを示す。これに対して、顆粒球が豊富に存在する W B C の存在下で K 5 6 2 細胞を溶解すると、検出シグナルは、ほぼ完全に消失する。A E B S F および P M S F と、この細胞との混合物をプレインキュベーションすると、シグナルが部分的に回復する。一方、ライセートへのプロテアーゼ阻害剤カクテルの添加は、全く影響がない。驚いたことに、無傷の細胞の前処理と前記カクテルを補った溶解緩衝液との組み合わせは、検出シグナルについて相乗効果を有する。B C R - A B L のシグナルは、プロテアーゼ豊富な細胞の非存在下で得られるレベルに完全には回復しないが、信頼性の高い測定結果としては十分である。

20

【 0 0 5 9 】

実施例 2：エンドヌクレアーゼ処理は超音波処理に置き換えることができる。

腫瘍特異的融合タンパク質 T E L - A M L は、D N A 結合タンパク質であり、ライセートの超音波処理後の T E L A M L 特異的ビーズアッセイによってのみ検出することができる。この手順は全ての標準的な検査室には適用できないため、D N A を消化し、T E L - A M L (およびその他) の融合タンパク質を検出し易くするためのデオキシリボヌクレアーゼの使用について調べた。

30

【 0 0 6 0 】

細胞：R E H t (1 2 ; 1 2) は、発癌性融合タンパク質 T E L - A M L が発現している細胞株である。

【 0 0 6 1 】

細胞ライセートの生成：沈殿した細胞 (2 5 万細胞 / m l R I P A) を、非特異的エンドヌクレアーゼである Benzonase (登録商標) (ノバジェン社、メルクダルトムシュタット、ドイツ) の存在下、または非存在下において、プロテアーゼ阻害剤カクテル (P I C、シグマアルドリッチ) を添加した R I P A 緩衝液 (5 0 m M トリス塩酸 p H 7 . 4、1 5 0 m l N a C l、1 % N P 4 0、0 . 5 % デオキシコール酸ナトリウム、1 m M E D T A、0 . 1 % S D S、および 0 . 0 1 % アジ化ナトリウム) に再懸濁した。ライセートの一部を超音波処理し、氷上で 1 5 分間インキュベートした後、細胞残渣を除去するためにライセートをスピンドウンして、上清をフローサイトメトリビーズアッセイで使用した。

40

【 0 0 6 2 】

50

試験サンプル：R E H細胞をスピンドウンし、沈殿した細胞を、添加されたプロテアーゼ阻害剤（P I C）とR I P A 溶解緩衝液に再懸濁した。その後、

サンプル 1：氷上で15分間インキュベートした。

サンプル 2：氷上で15分間インキュベートし、続いて超音波処理した。

サンプル 3：25 U / m l のBenzonaseを溶解緩衝液に添加し、細胞を氷上で15分間インキュベートした。

サンプル 4：25 U / m l のBenzonaseを溶解緩衝液に添加し、細胞を超音波処理し、氷上で15分間インキュベートした。

【0063】

インキュベーション後、様々なライセートをスピンドウンし、その上清に標準条件下で実行されるT E L - A M L 特異的捕捉 / 検出ビーズアッセイを行った（実施例 1 参照）。 10

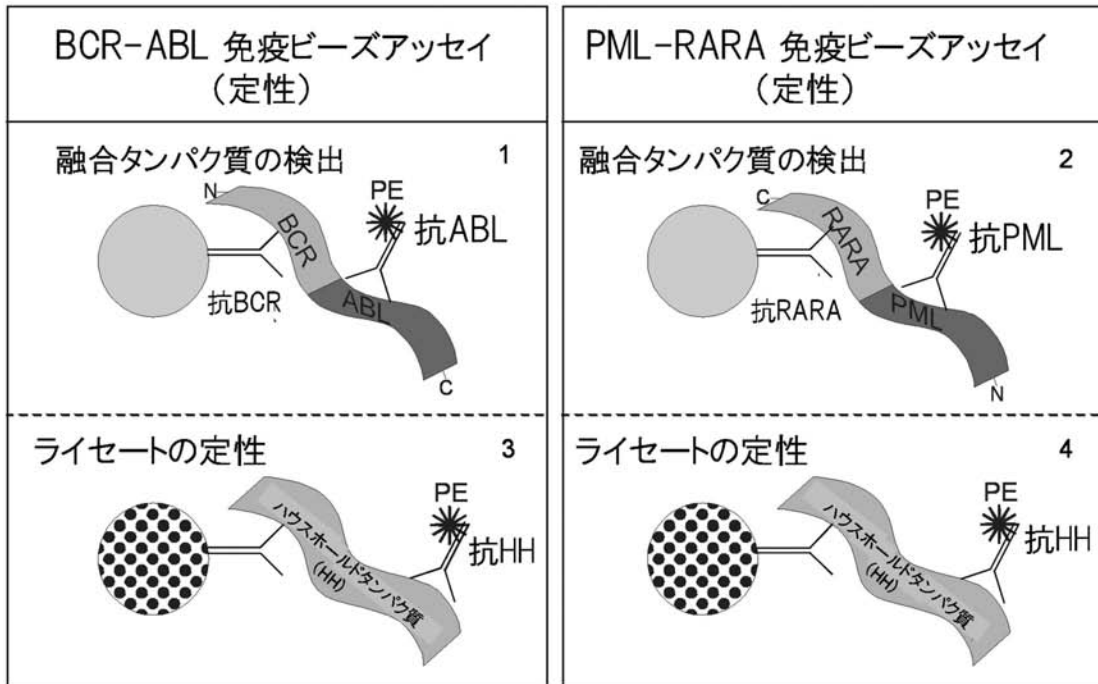
【0064】

T E L - A M L の検出シグナルの定量のために、様々な細胞ライセートについて検出された平均蛍光シグナルと、バックグラウンド値との間で割合を算出した。バックグラウンド値は、T E L - A M L 融合タンパク質について陰性であることが分かっている細胞株のライセートにアッセイ（前処理、溶解、およびビーズアッセイを含む）が実行された場合に得られた平均蛍光シグナルである。

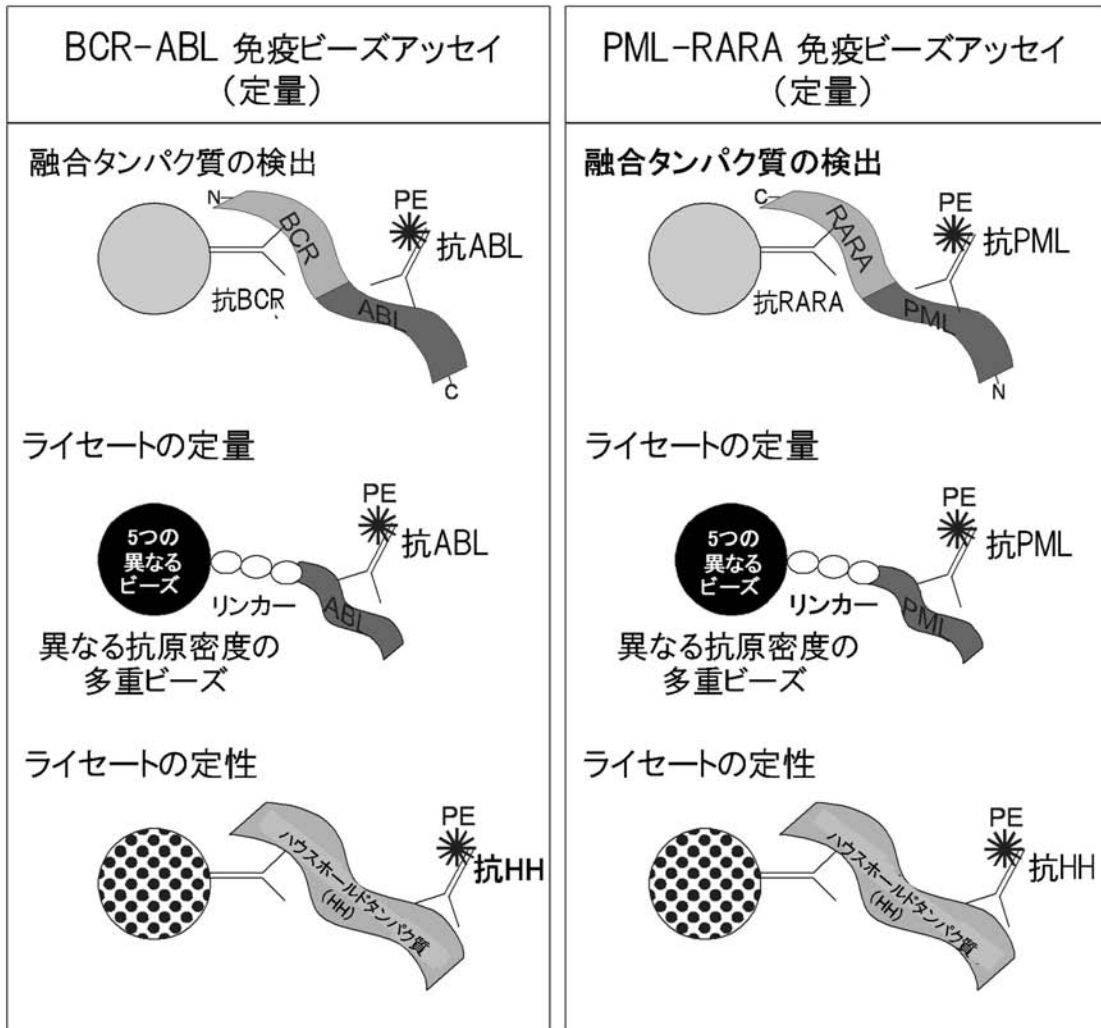
【0065】

結果：図 5 は、プロテアーゼ阻害剤を有する溶解緩衝液のみを用いて調製されたライセート中に、非常に少ないT E L - A M L シグナルしか検出されないことを示す。ライセートを超音波処理すると、劇的にT E L - A M L シグナルが増強する。ライセートにエンドヌクレアーゼを補っても、本質的に同じ効果がある。超音波と組み合わせたエンドヌクレアーゼ処理は、さらにシグナルを増強する。しかし、エンドヌクレアーゼ単独で得られる信号対雑音比だけで、充分以上に信頼性の高い測定結果である。超音波処理は、B C R - A B L のような1つ以上の細胞基質融合タンパク質がライセート中に検出される場合も回避することが好ましい。 20

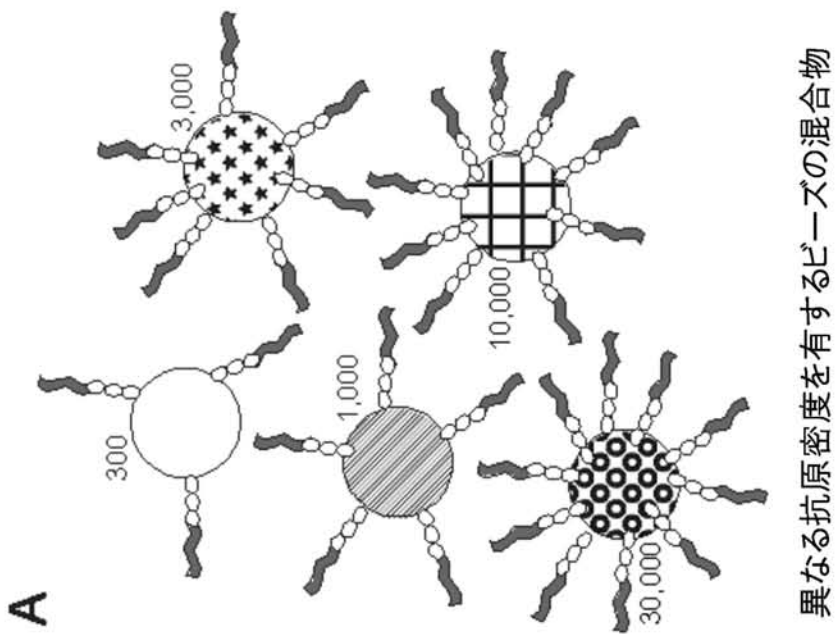
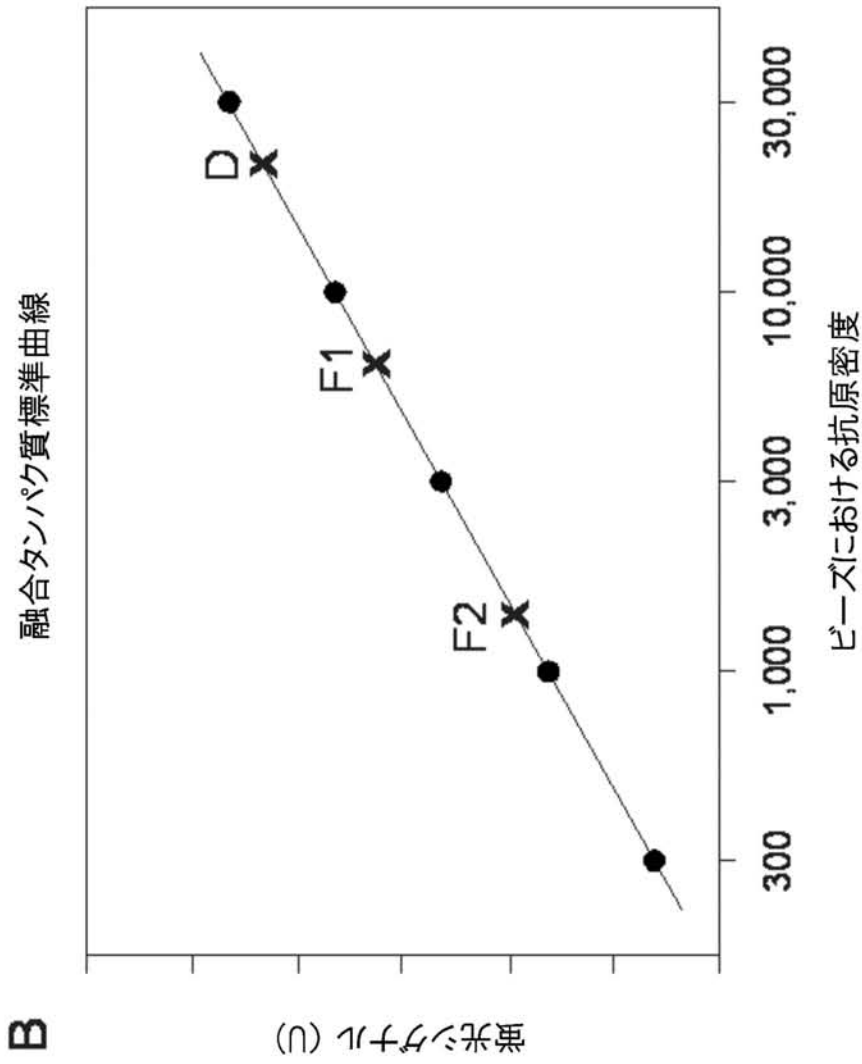
【 図 1 】



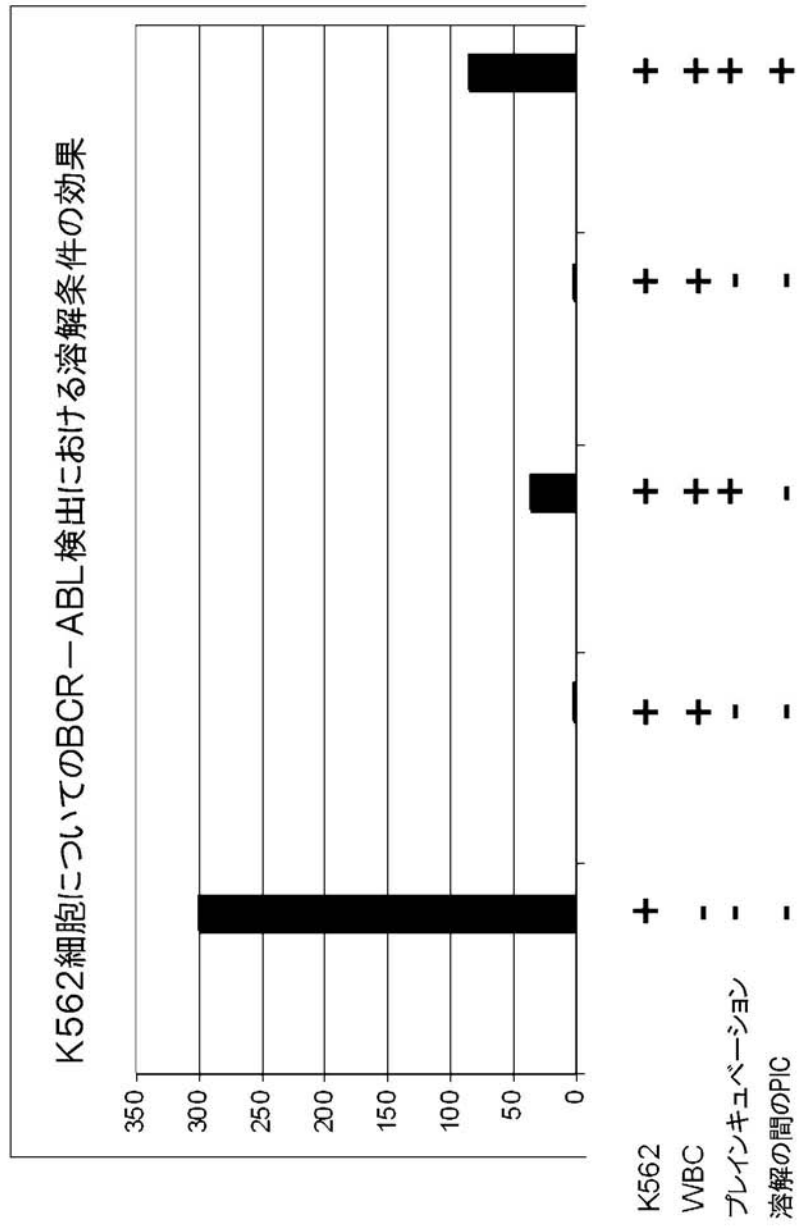
【 図 2 】



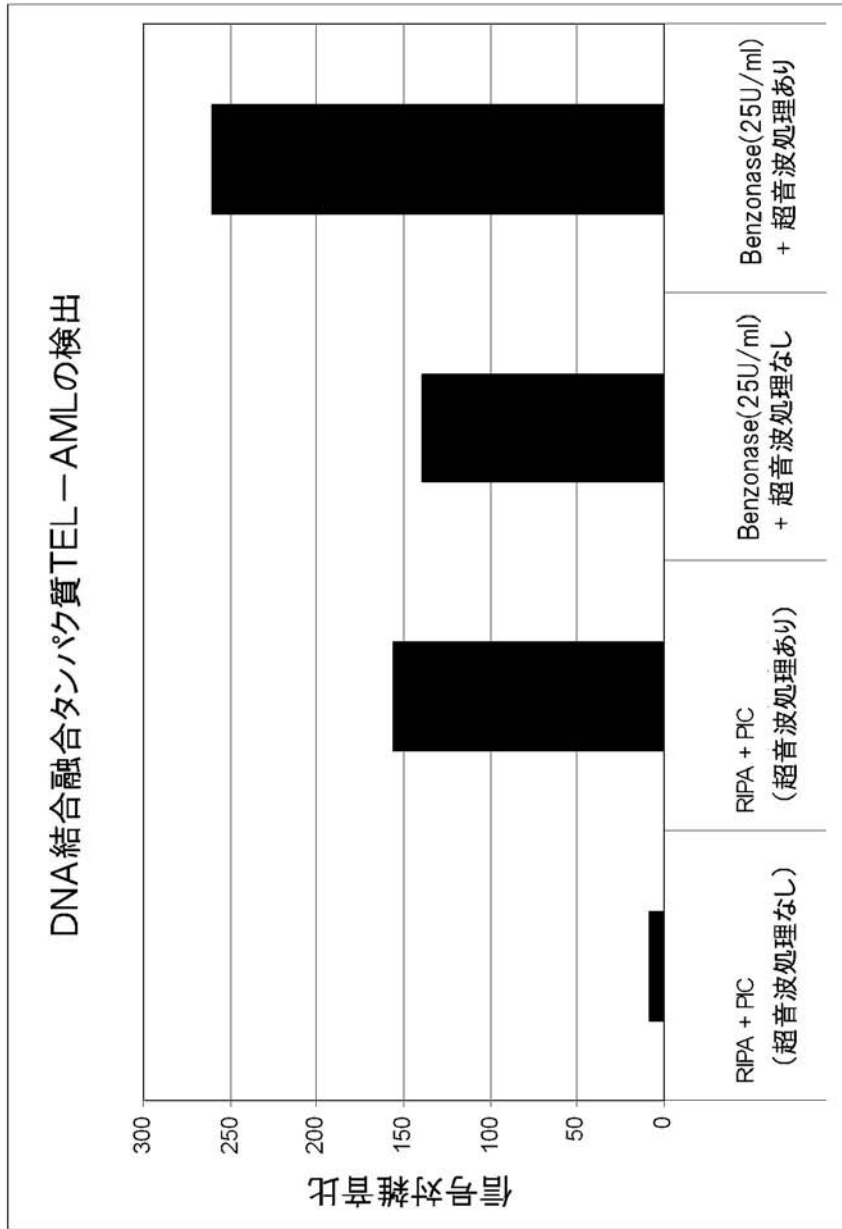
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/054072

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/061684 A (UNIV TEXAS [US]; ALBITAR MAHER [US]; KANTARJIAN HAGOP [US]; GILES FRAN) 31 May 2007 (2007-05-31) the whole document in particular: abstract page 5, paragraph 19 page 17, paragraph 65 page 23, paragraph 86 page 36, paragraph 140 - page 37, paragraph 153; example 7	1-5, 12-24
Y	WO 00/50903 A (LUMINEX CORP [US]) 31 August 2000 (2000-08-31) the whole document in particular: abstract claims 1-6	1-5, 12-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
<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>*Z* 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
17 June 2009		26/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 840-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gall, Anne-Laure

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/054072

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LATGER V ET AL: "PATHOLOGIE VASCULAIRE ET ACTIVATION CELLULAIRE. EXPLORATION DU PHENOTYPE CELLULAIRE ADHERENT PAR CYTOMETRIE EN FLUX QUANTITATIVE" JOURNAL DES MALADIES VASCULAIRES, MASSON, PARIS, FR, vol. 24, no. 1, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 11-18, XPO00910966 ISSN: 0398-0499 in particular: abstract page 13, right-hand column, paragraph 2	1-5, 12-24
Y	US 2007/015134 A1 (MAPLES JOHN A [US] ET AL) 18 January 2007 (2007-01-18) the whole document in particular: abstract page 4, paragraph 55 - paragraph 57	1-5, 12-24
Y	EP 1 507 147 A (ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CT [NL]) 16 February 2005 (2005-02-16) the whole document in particular: abstract claims 1-10	12
Y	MARTINEZ NATALIA ET AL: "The oncogenic fusion protein RUNX1-CBFA2T1 supports proliferation and inhibits senescence in t(8;21)-positive leukaemic cells" BMC CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 4, no. 1, 6 August 2004 (2004-08-06), page 44, XPO21004644 ISSN: 1471-2407 cited in the application the whole document in particular: abstract page 46, right-hand column, paragraph 2	21
Y	WO 02/054074 A (UNIV ERASMUS [NL]; VAN DONGEN JACOBUS JOHANNES MA [NL]; VAN DER VELDEN) 11 July 2002 (2002-07-11) the whole document in particular: abstract page 11, line 33 - line 37	22

Form PCT/AS/N210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/054072**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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

1-5 (fully), 12-14 (partially) and 15-24 (partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2009/054072

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-5 (fully), 12-14 (partially) and 15-24 (partially)

Methods and kits and their use for detecting a tumour-specific fusion protein characterized by a fusion protein analysis (step A), a qualitative control analysis (step B) and a quantitative control analysis (step C);

2. claims: 6-8 (fully), 12-14 (partially) and 21 (partially)

Methods and kit for detecting a fusion protein characterized by the use of an endonuclease in the lysis buffer;

3. claims: 9-11 (fully), 12-14 (partially) and 22 (partially)

Methods and kit for detecting a fusion protein characterized by the treatment of the cells, prior to detection, with a cell-permeable protease inhibitor.

4. claims: claims 15-24, partially

Kits and their use for detecting a tumour-specific fusion protein characterized by a fusion protein analysis (step A) and a qualitative control analysis (step B);

5. claims: claims 15-24, partially

Kits and their use for detecting a tumour-specific fusion protein characterized by a fusion protein analysis (step A) and a quantitative control analysis (step C).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/054072

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007061684	A	31-05-2007 DE 212006000071 U1	24-07-2008
WO 0050903	A	31-08-2000 AU 3500300 A	14-09-2000
US 2007015134	A1	18-01-2007 EP 1907565 A2 JP 2009501025 T WO 2007011615 A2	09-04-2008 15-01-2009 25-01-2007
EP 1507147	A	16-02-2005 AT 423974 T AU 2004264178 A1 CA 2535073 A1 CN 1836165 A DK 1660888 T3 ES 2323067 T3 JP 2007502404 T WO 2005015235 A1 US 2006172345 A1	15-03-2009 17-02-2005 17-02-2005 20-09-2006 15-06-2009 06-07-2009 08-02-2007 17-02-2005 03-08-2006
WO 02054074	A	11-07-2002 CA 2433556 A1 CN 1493000 A EP 1348126 A2 JP 2004523740 T	11-07-2002 28-04-2004 01-10-2003 05-08-2004

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ドンゲン, ファン, ヤコブス ヨハンネス マリア
オランダ国 レ ニーウェルケルク アーン デン エイセル パラレルウエフ ザイト 147

专利名称(译)	用于检测肿瘤特异性融合蛋白的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2011519022A	公开(公告)日	2011-06-30
申请号	JP2011503410	申请日	2009-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	鹿特丹伊拉斯谟大学医疗中心		
申请(专利权)人(译)	伊拉斯姆斯大学医学中心鹿特丹		
[标]发明人	ドンゲンファンヤコブスヨハンネスマリア		
发明人	ドンゲン,ファン,ヤコブス ヨハンネス マリア		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N15/14 G01N33/57426 G01N33/582 G01N2333/82		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/543.575 G01N33/543.597 G01N33/53.D		
优先权	2008154164 2008-04-07 EP 61/123369 2008-04-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及癌症诊断领域和诊断技术在病理学和血液学中的应用。具体地，本发明涉及改进的流式细胞术技术，以及与其相关的试剂盒，用于检测染色体畸变和检测由肿瘤细胞专门表达的肿瘤特异性基因产物。

Figure 3

