

(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2016-507066  
(P2016-507066A)

(43) 公表日 平成28年3月7日(2016.3.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	A
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	P
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	Y
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 4 5 A
	GO 1 N 33/543	5 2 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 57 頁)

(21) 出願番号 特願2015-557128 (P2015-557128)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月7日 (2014.2.7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年9月25日 (2015.9.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/015338  
 (87) 国際公開番号 W02014/124280  
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014.8.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/762, 753  
 (32) 優先日 平成25年2月8日 (2013.2.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

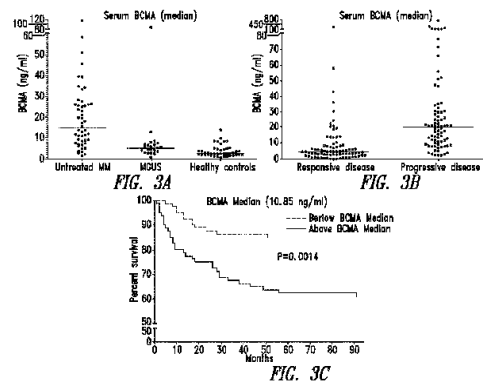
(71) 出願人 515216099  
 インスティテュート フォー ミエローマ  
 アンド ボーン キャンサー リサーチ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 900  
 69, ウェスト ハリウッド, サンセ  
 ット ブールバード 9201, スイ  
 ト 300  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫の改善された診断方法、予後予測方法、およびモニタリング方法

(57) 【要約】

本発明は、多発性骨髄腫 (MM) を診断する方法を提供する。特定の実施形態では、MMを診断する方法は、(a) 対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b) ステップ(a)において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、所定のカットオフ値または(b)の対照血清試料中の量と比較した(a)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、MMの存在を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

多発性骨髄腫（MM）を診断する方法であって、

（a）対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

（b）ステップ（a）において検出した前記BCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、前記所定のカットオフ値または（b）の前記対照血清試料中の量と比較した（a）の前記生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、MMの存在を示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

**【請求項 2】**

慢性リンパ球性白血病（CLL）を診断する方法であって、

（a）対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

（b）ステップ（a）において検出した前記BCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、前記所定のカットオフ値または（b）の前記対照血清試料中の量と比較した（a）の前記生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、CLLの存在を示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

**【請求項 3】**

B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を診断する方法であって、

（a）対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

（b）ステップ（a）において検出した前記BCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、前記所定のカットオフ値または（b）の前記対照血清試料中の量と比較した（a）の前記生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、NHLの存在を示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

**【請求項 4】**

前記生体試料が、血清試料である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記生体試料が、前記対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記生体試料が、前記対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記BCMA断片が、切断されたBCMAポリペプチドである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記BCMAポリペプチドまたはその断片が、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）、蛍光免疫アッセイ（FIA）、発光免疫アッセイ（LIA）、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出される、請求

10

20

30

40

50

項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出システムが、E L I S A アッセイである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出システムが、ラテラルフローアッセイである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記検出を、B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

多発性骨髄腫 ( M M ) を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法であって、

( a ) 対象から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( b ) ステップ ( a ) において検出した前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片の量と、M M について処置されている対象の集団における B C M A ポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、( b ) の前記処置された集団における B C M A ポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した ( a ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、M M を有する対象についての生存の可能性の低減を示す、ステップと

20

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

【請求項 15】

慢性リンパ球性白血病 ( C L L ) を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法であって、

30

( a ) 対象から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( b ) ステップ ( a ) において検出した前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片の量と、C L L について処置されている対象の集団における B C M A ポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、( b ) の前記処置された集団における B C M A ポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した ( a ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、C L L を有する対象についての生存の可能性の低減を示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

40

【請求項 16】

B 細胞非ホジキンリンパ腫 ( N H L ) を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法であって、

( a ) 対象から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( b ) ステップ ( a ) において検出した B C M A ポリペプチドまたはその断片の前記量と、N H L について処置されている対象の集団における B C M A ポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、( b ) の前記処置された集団における B C M A ポリペプチドまたはその断片の前記中央値または対応する量と比較した ( a ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、N H L を有す

50

る前記対象についての生存の可能性の低減を示すステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髓単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である方法。

【請求項 17】

前記対象が、MMと診断されている、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象が、MMについての処置を受けている、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記対象が、CLLと診断されている、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

前記対象が、CLLについての処置を受けている、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記対象が、NHLと診断されている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象が、NHLについての処置を受けている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 23】

前記対象が、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が10%低減する、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記対象が、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が30%低減する、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記対象が、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が50%低減する、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記対象が、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が70%低減する、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記生体試料が、血清試料である、請求項 14 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記生体試料が、前記対象の骨髓単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 14 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記生体試料が、前記対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 14 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記BCMA断片が、切断されたBCMAポリペプチドである、請求項 14 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

BCMAポリペプチドまたはその断片が、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出される、請求項 14 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記検出システムが、ELISAアッセイである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記検出システムが、ラテラルフローアッセイである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記検出を、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う、請

10

20

30

40

50

求項 1 4 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

多発性骨髄腫 ( M M ) の進行または処置に対する応答をモニターする方法であって、

( a ) 第 1 の時点における、 M M と診断された患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( b ) 第 2 の時点または処置の後における、前記患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( c ) ステップ ( a ) において検出した量と、ステップ ( b ) において検出した前記量とを比較するステップであって、( b ) の前記生体試料中の前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片の量と比較した ( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記多発性骨髄腫が進行していることを示し、( a ) の前記生体試料中の量と比較した ( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記 M M が、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

【請求項 3 8】

慢性リンパ球性白血病 ( C L L ) の進行または処置に対する応答をモニターする方法であって、

( a ) 第 1 の時点における、 C L L と診断された患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( b ) 第 2 の時点または処置の後における、前記患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( c ) ステップ ( a ) において検出した量と、ステップ ( b ) において検出した前記量とを比較するステップであって、( b ) の前記生体試料中の前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片の量と比較した ( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記 C L L が進行していることを示し、( a ) の前記生体試料中の量と比較した ( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記 C L L が、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

【請求項 3 9】

B 細胞非ホジキンリンパ腫 ( N H L ) の進行または処置に対する応答をモニターする方法であって、

( a ) 第 1 の時点における、 N H L と診断された患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( b ) 第 2 の時点または処置の後における、前記患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

( c ) ステップ ( a ) において検出した前記量と、ステップ ( b ) において検出した前記量とを比較するステップであって、( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の前記量と比較した ( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記 N H L が進行していることを示し、( a ) の前記生体試料中の前記量と比較した ( b ) の前記生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片の減

10

20

30

40

50

少しした量が、前記 N H L が、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示すステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である方法。

【請求項 4 0】

前記生体試料が、血清試料である、請求項 3 7 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記生体試料が、前記対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 3 7 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記生体試料が、前記対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 3 7 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記 B C M A 断片が、切断された B C M A ポリペプチドである、請求項 3 7 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

B C M A ポリペプチドまたはその断片が、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A )、放射免疫アッセイ ( R I A )、酵素免疫アッセイ ( E I A )、蛍光免疫アッセイ ( F I A )、発光免疫アッセイ ( L I A )、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出される、請求項 3 7 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記検出システムが、E L I S A アッセイである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記検出システムが、ラテラルフローアッセイである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記検出を、B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う、請求項 3 7 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

患者において多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、または B 細胞非ホジキンリンパ腫を検出し、診断し、生存を予測し、病期分類し、またはモニターするためのキットであって、患者から得た生体試料中の B C M A ポリペプチドまたはその断片のレベルを決定するのに適した試薬を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、キット。

【請求項 5 1】

B C M A に特異的な抗体を含む、請求項 5 0 に記載のキット。

【請求項 5 2】

B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 5 1 に記載のキット。

【請求項 5 3】

B C M A ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 5 1 に記載のキット。

【請求項 5 4】

E L I S A アッセイを含む、請求項 5 0 に記載のキット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 55】

ラテラルフローアッセイを含む、請求項 50 に記載のキット。

## 【請求項 56】

多発性骨髄腫（MM）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、または B 細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を診断する方法であって、

（a）対象から得た生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

（b）ステップ（a）において検出した前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、前記所定のカットオフ値または（b）の前記対照血清試料中の量と比較した（a）の前記生体試料中の B A F F ポリペプチドまたは断片の増加した量が、MM、CLL、または NHL の存在を示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

## 【請求項 57】

前記生体試料が、血清試料である、請求項 56 に記載の方法。

## 【請求項 58】

前記生体試料が、前記対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 56 に記載の方法。

## 【請求項 59】

前記生体試料が、前記対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 56 に記載の方法。

## 【請求項 60】

B A F F ポリペプチドまたはその断片が、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）、蛍光免疫アッセイ（FIA）、発光免疫アッセイ（LIA）、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出される、請求項 56 から 59 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 61】

前記検出システムが、ELISA アッセイである、請求項 60 に記載の方法。

## 【請求項 62】

前記検出システムが、ラテラルフローアッセイである、請求項 60 に記載の方法。

## 【請求項 63】

前記検出を、B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う、請求項 56 から 62 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 64】

前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 63 に記載の方法。

## 【請求項 65】

前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 63 に記載の方法。

## 【請求項 66】

多発性骨髄腫（MM）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、または B 細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法であって、

（a）対象から得た生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

（b）ステップ（a）において検出した前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片の量と、MM、CLL、または NHL について処置されている対象の集団における B A F F ポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、（b）の前記

10

20

30

40

50

処置された集団における B A F F ポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した ( a ) の前記生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、 M M、 C L L、または N H L を有する対象についての生存の可能性の低減を示す、ステップと

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髓単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

【請求項 6 7】

前記対象が、 M M、 C L L、または N H L と診断されている、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記対象が、 M M、 C L L、または N H L についての処置を受けている、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記対象が、中央レベルの B A F F ポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が 1 0 % 低減する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記対象が、中央レベルの B A F F ポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が 3 0 % 低減する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記対象が、中央レベルの B A F F ポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が 5 0 % 低減する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記対象が、中央レベルの B A F F ポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が 7 0 % 低減する、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記生体試料が、血清試料である、請求項 6 6 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記生体試料が、前記対象の骨髓単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 6 6 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記生体試料が、前記対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 6 6 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

B A F F ポリペプチドまたはその断片が、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A )、放射免疫アッセイ ( R I A )、酵素免疫アッセイ ( E I A )、蛍光免疫アッセイ ( F I A )、発光免疫アッセイ ( L I A )、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出される、請求項 6 6 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記検出システムが、 E L I S A アッセイである、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記検出システムが、ラテラルフローアッセイである、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記検出を、 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う、請求項 6 6 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体であ

10

20

30

40

50

る、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 82】

多発性骨髄腫 (MM)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、または B 細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) の進行または処置に対する応答をモニターする方法であって、

(a) 第 1 の時点における、MM、CLL、または NHL と診断された患者から得た生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

(b) 第 2 の時点または処置の後における、前記患者から得た生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、

(c) ステップ (a) において検出した量と、ステップ (b) において検出した量とを比較するステップであって、(a) の前記生体試料中の前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片の量と比較した (b) の前記生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記多発性骨髄腫が進行していることを示し、(a) の前記生体試料中の量と比較した (b) の前記生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記 MM、CLL、または NHL が、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示す、ステップと、

を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、方法。

【請求項 83】

前記生体試料が、血清試料である、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

前記生体試料が、前記対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 85】

前記生体試料が、前記対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 86】

B A F F ポリペプチドまたはその断片が、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、放射免疫アッセイ (RIA)、酵素免疫アッセイ (EIA)、蛍光免疫アッセイ (FIA)、発光免疫アッセイ (LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出される、請求項 82 から 85 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 87】

前記検出システムが、ELISA アッセイである、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記検出システムが、ラテラルフローアッセイである、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 89】

前記検出を、B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う、請求項 82 から 88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記 B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 92】

患者において多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、または B 細胞非ホジキンリンパ腫を検出し、診断し、生存を予測し、病期分類し、またはモニターするためのキットであって、患者から得た生体試料中の B A F F ポリペプチドまたはその断片のレベルを決定するのに適した試薬を含み、前記生体試料が、血清試料、または前記対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である、キット。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9 3】

B A F F に特異的な抗体を含む、請求項 9 9 に記載のキット。

## 【請求項 9 4】

B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 1 0 0 に記載のキット。

## 【請求項 9 5】

B A F F ポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項 1 0 0 に記載のキット。

## 【請求項 9 6】

E L I S A アッセイを含む、請求項 9 9 に記載のキット。

10

## 【請求項 9 7】

ラテラルフローアッセイを含む、請求項 9 9 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年2月8日に提出された米国仮特許出願第61/762,753号における米国特許法§119(e)の下で優先権の利益を請求する。上記出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0 0 0 2】

20

本発明の組成物および方法は一般に、がんの診断、予後予測、およびモニタリングのためのバイオマーカーの検出に関する。特に、本発明は、多発性骨髄腫の診断、予後予測、およびモニタリングのためのB細胞成熟抗原の検出のための組成物および方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー17(TNFRSF17、また、B細胞成熟抗原(BCMA)またはCD269とも命名される)は、T細胞腫瘍系において最初に同定され(Laabiら、1992年)、それに続いてこれらが成熟するにつれBリンパ球において発現することが示された(Laabiら、1994年)受容体である。BCMAリガンドは、BAFF(B細胞活性化因子;TNFSF13B)およびAPRIL(増殖誘発リガンド;TNFSF13)を含む(Rennerら、2000年;Thompsonら、2000年)。多発性骨髄腫(MM)細胞系において、これらのリガンドは、細胞増殖経路を活性化し、抗アポトーシスタンパク質をアップレギュレートする(Moreauxら、2004年)。両方のリガンドはまた、受容体TACI(膜貫通活性化物質およびCAML相互作用物質;TNFRSF13B)を結合する(Grossら、2000年;Wuら、2000年;Yuら、2000年)。さらに、BAFFは、BAFF受容体(BAFFR;TNFRSF13C)と称される第3の受容体に結合し、一方、APRILは、これに結合しない(Thompsonら、2001年;Dayら、2005年)。リガンドであるBAFFおよびAPRILは、腫瘍壊死ファミリー(TNF)のメンバーであり、これらの受容体へのTNFメンバーの結合は、アポトーシス、分化または増殖をもたらす得る(Smithら、1994年)。TNFファミリーメンバーは、オートクリン、パラクリンおよびエンドクリン機序を介して作用する(Smithら、1994年)。

30

40

## 【0 0 0 4】

BAFFを過剰発現しているトランスジェニックマウスは、全身性エリテマトーデス(SLE)のTACI欠損を提示する症状であり、B細胞の異常増殖および血清免疫グロブリン(Ig)のレベルの増加を示す(McKayら、1999年;Yanら、2001年;Groomら、2002年;Seshasayeeら、2003年)。APRIL欠損マウスは、B細胞またはT細胞の異常を示さない(Varfolomeevら、2004年)。BCMA欠損マウスは、正常な末梢性のBリンパ球が発生し、これらの免疫応答は

50

インタクトなままである (Xu & Lam, 2001年)。

【0005】

血清BAFFレベルは、自己免疫疾患およびリンパ腫を有する患者において上昇することが報告されている (Cheemaら、2001年; Zhangら、2001年; Okiraら、2005年)。BCMAは、形質細胞系において細胞内にあることが示されてきた (Laabiraら、1992年、1994年)。BCMAの表面発現は、ヒト扁桃腺B細胞 (Thompsonら、2000年)、およびヒトCD138発現MM細胞 (Novakら、2004年) 上に見出された。ホジキンリンパ腫およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症 (WM) 患者からの悪性細胞はまた、このタンパク質を発現している (Elsawaraら、2006年; Chiuら、2007年)。しかし、BCMAの血清レベルは、どのような疾患においても従前に報告されてこなかった。

10

【0006】

非ホジキンリンパ腫 (NHL) は、リンパ系において発生する血液がんの1タイプである。白血病およびリンパ腫協会は、2011年において、約502,943人がNHLを抱えながら生活しており、または寛解期 (疾患の徴候なし) にあると推定している。多くの他のがんと同様に、NHLの発病率は年齢と共に増加する。国立がん研究所は、約70,000件の新規な症例が2012年に診断を受けると推定している。慢性リンパ球性白血病 (CLL) は、成人の最も一般的なタイプの白血病である。小児は、CLLを発症しない。CLLの発病率は、50歳以上の人の間で有意に増加する。少数の成人は、30歳代および40歳代において診断される。白血病およびリンパ腫協会は、約105,000人がCLLを抱えながら生活しており (またはCLLの寛解期)、約14,500人が米国において2011年にCLLと診断されたと推定している。

20

【0007】

多発性骨髄腫はまた、よく見られる血液がんであり、全てのがんの概ね1%および全てのがん死亡の2%を表す。多発性骨髄腫の発症のピーク年齢は、65~70歳であるが、最近の統計は発病率の増加および発症年齢の早期化の両方を示す。概ね100,000人の米国人が現在骨髄腫を有し、米国がん協会は、概ね22,000件の骨髄腫の新規な症例が米国において毎年診断されていると推定している。

【0008】

B細胞成熟抗原は、正常および悪性のB細胞の表面上に発現する (Laabiraら、1992年、1994年; Thompsonら、2000年; Novakら、2004年)。MM、CLL、およびNHLを診断するために使用される大部分の細胞表面マーカーは、関連性のある患者集団の大きなセグメントにおいて上昇せず、または確実に発現されない。例えば、正常および悪性のB細胞上に存在する1つの表面受容体であるインターロイキン (IL) - 6受容体は、MM患者の血清において (Jonesら、2001年) 上昇するが、しかし患者の概ね15%においてのみ上昇することが示されてきた (Stephensら、2012年)。<sub>2</sub>ミクログロブリン (Simonsson Bら、1980年)、チミジンキナーゼ (TK) (Kallander CFRら、1984年)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) (Lee Jら、1987年)、可溶性CD23 (Sarfati Mら、1988年)、可溶性CD27 (Van Oer's MHJら、1993年) およびICAM-I (Christiansen Iら、1994年) を含めたCLLのいくつかの血清マーカーは、臨床病期に正に相関することが報告されてきたが、さらに評価する必要がある。研究を行い、NHLにおける血清分子の臨床的意義を評価した。結果は、CD23、CD27、CD30、またはCXCL13が、B-NHLおよびVEGFにおけるリスクが2.8倍から5.5倍増加し、bFGFがB-NHLにおける重要な予後因子であることが見出されたことを示す (Benboubker Lら、2000年)。IL-10、TNF- $\alpha$  およびsTNF-R1、sTNF-R2のレベルの上昇は、NHLのリスクの増加と有意に関連した。 (Purdue M. P.ら、2011年)。しかし、これらの分子は、NHL特異的な診断または予後予測のマーカーではない。

30

40

【0009】

50

骨髄（BM）に基づいた悪性腫瘍の場所を評価することにおける困難、および異なるBM部位内での悪性細胞の不均一な関与によって、MM、CLL、およびNHL腫瘍量の測定は間接的であり、したがって、治療に対する応答は決定が困難であることが多い。血液および尿中のモノクローナルIgレベルに加えて、MM腫瘍量を決定するために使用される現存する血液マーカーは、ヘモグロビン、尿素窒素、カルシウム、アルブミン、クレアチニン、単クローン性タンパク質、ベータ-2ミクログロブリン（ $\beta 2M$ ）、IL-6、C反応性タンパク質、可溶性IL-6受容体、乳酸デヒドロゲナーゼ、チミジンキナーゼ、および $\alpha 1$ -アンチトリプシンを含む（Kytle、1994年）。しかし、これらのマーカーはMM細胞によって直接生じず、したがって信頼できない。さらに、現存するマーカーは、恐らく多くの他の非悪性細胞タイプにおけるこれらの広範な存在によって、処置

10

#### 【0010】

したがって、当技術分野には、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、および非ホジキンリンパ腫の信頼できる診断用、予後予測用、および処置をモニターするバイオマーカーが欠損している。さらに、現存するバイオマーカーは、抗がん処置に対する応答と、または疾患の程度もしくは重症度と良好に相関しない。

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

本発明は一般に、がん、例えば、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を確実に再現性よく診断および/またはモニターするための組成物および方法を提供する。培養したBMMCの上清、および患者の血清中のBCMAおよびBAFFのレベルを、検出し、かつ/または測定し、ベースラインもしくは対照に対して比較し、対象においてMM、CLL、またはNHLを確実に再現性よく診断することができる。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

様々な実施形態では、多発性骨髄腫（MM）を診断する方法を提供する。特定の実施形態では、MMを診断する方法は、（a）対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、（b）ステップ（a）において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、所定のカットオフ値または（b）の対照血清試料中の量と比較した（a）の生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、MMの存在を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

30

#### 【0013】

様々な実施形態では、慢性リンパ球性白血病（CLL）を診断する方法を提供する。特定の実施形態では、慢性CLLを診断する方法は、（a）対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、（b）ステップ（a）において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、所定のカットオフ値または（b）の対照血清試料中の量と比較した（a）の生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、CLLの存在を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

40

#### 【0014】

様々な実施形態では、B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を診断する方法を提供する。ある種の実施形態では、NHLを診断する方法は、（a）対象から得た生体試料中のB

50

CMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、所定のカットオフ値または(b)の対照血清試料中の量と比較した(a)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたは断片の増加した量が、NHLの存在を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

【0015】

特定の実施形態では、生体試料は、血清試料である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

10

【0016】

ある種の実施形態では、BCMA断片は、切断されたBCMAポリペプチドである。

【0017】

さらなる実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片は、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出する。さらなる実施形態では、検出システムは、ELISAアッセイである。いくつかの実施形態では、検出システムは、ラテラルフローアッセイである。

20

【0018】

特定の実施形態では、検出は、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う。ある種の実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体である。

【0019】

様々な実施形態では、多発性骨髄腫(MM)を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法を提供する。ある種の実施形態では、MMを有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法は、(a)対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、MMについて処置されている対象の集団におけるBCMAポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、(b)の処置された集団におけるBCMAポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した(a)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の増加した量が、MMを有する対象についての生存の可能性の低減を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

30

【0020】

様々な実施形態では、慢性リンパ球性白血病(CLL)を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法を提供する。ある種の実施形態では、CLLを有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法は、(a)対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、CLLについて処置されている対象の集団におけるBCMAポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、(b)の処置された集団におけるBCMAポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した(a)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の増加した量が、CLLを有する対象についての生存の可能性の低減を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

40

【0021】

様々な実施形態では、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)を有する、または有するこ

50

とが疑われる対象の生存についての予後予測の方法を提供する。ある種の実施形態では、NHLを有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法は、(a)対象から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出したBCMAポリペプチドまたはその断片の量と、NHLについて処置されている対象の集団におけるBCMAポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、(b)の処置された集団におけるBCMAポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した(a)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の増加した量が、NHLを有する対象についての生存の可能性の低減を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

10

**【0022】**

特定の実施形態では、対象は、MMと診断されている。さらなる実施形態では、対象は、MMについての処置を受けている。

**【0023】**

ある種の実施形態では、対象は、CLLと診断されている。さらなる実施形態では、対象は、CLLと診断されている。

**【0024】**

いくつかの実施形態では、対象は、NHLと診断されている。関連する実施形態では、対象は、NHLと診断されている。

**【0025】**

特定の実施形態では、対象は、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が10%低減する。ある種の実施形態では、対象は、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が30%低減する。ある種の実施形態では、対象は、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が50%低減する。他の実施形態では、対象は、中央レベルのBCMAポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が70%低減する。

20

**【0026】**

特定の実施形態では、生体試料は、血清試料である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

30

**【0027】**

ある種の実施形態では、BCMA断片は、切断されたBCMAポリペプチドである。

**【0028】**

さらなる実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片は、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出する。さらなる実施形態では、検出システムは、ELISAアッセイである。いくつかの実施形態では、検出システムは、ラテラルフローアッセイである。

40

**【0029】**

特定の実施形態では、検出は、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う。ある種の実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体である。

**【0030】**

様々な実施形態では、多発性骨髄腫(MM)の進行または処置に対する応答をモニターする方法を提供する。特定の実施形態では、MMの進行または処置に対する応答をモニターする方法は、(a)第1の時点における、MMと診断された患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)第2の時点また

50

は処置の後における、患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(c)ステップ(a)において検出した量と、ステップ(b)において検出した量とを比較するステップであって、(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記多発性骨髄腫が進行していることを示し、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記MMが、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

#### 【0031】

様々な実施形態では、慢性リンパ球性白血病(CLL)の進行または処置に対する応答をモニターする方法を提供する。ある種の実施形態では、CLLの進行または処置に対する応答をモニターする方法は、(a)第1の時点における、CLLと診断された患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)第2の時点または処置の後における、患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(c)ステップ(a)において検出した量と、ステップ(b)において検出した量とを比較するステップであって、(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記CLLが進行していることを示し、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記CLLが、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

#### 【0032】

様々な実施形態では、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)の進行または処置に対する応答をモニターする方法を提供する。関連する実施形態では、NHLの進行または処置に対する応答をモニターする方法は、(a)第1の時点における、NHLと診断された患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)第2の時点または処置の後における、患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(c)ステップ(a)において検出した量と、ステップ(b)において検出した量とを比較するステップであって、(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記NHLが進行していることを示し、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記NHLが、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

#### 【0033】

特定の実施形態では、生体試料は、血清試料である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である。ある種の特定の実施形態では、生体試料は、対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

#### 【0034】

ある種の実施形態では、BCMA断片は、切断されたBCMAポリペプチドである。

#### 【0035】

さらなる実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片は、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出する。さらなる実施形態では、検出システムは、ELISAアッセイである。いくつかの実施形態では、検出システムは、ラテラルフローアッセイである。

10

20

30

40

50

## 【0036】

特定の実施形態では、検出は、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う。ある種の実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体である。

## 【0037】

様々な実施形態では、患者において多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、またはB細胞非ホジキンリンパ腫を検出し、診断し、生存を予測し、病期分類し、またはモニターするためのキットを提供する。特定の実施形態では、キットは、患者から得た生体試料中のBCMAポリペプチドまたはその断片のレベルを決定するのに適した試薬を含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

10

## 【0038】

特定の実施形態では、キットは、BCMAに特異的な抗体を含む。ある種の実施形態では、キットは、モノクローナル抗体である、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を含む。さらなる実施形態では、キットは、ポリクローナル抗体である、BCMAポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を含む。

## 【0039】

他の実施形態では、キットは、ELISAアッセイを含む。他の関連する実施形態では、キットは、ラテラルフローアッセイを含む。

20

## 【0040】

様々な実施形態では、多発性骨髄腫(MM)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、またはB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)を診断する方法を提供する。ある種の実施形態では、方法は、(a)対象から得た生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出したBAFFポリペプチドまたはその断片の量と、所定のカットオフ値または対照血清試料中で検出した量とを比較するステップであって、所定のカットオフ値または(b)の対照血清試料中の量と比較した(a)の生体試料中のBAFFポリペプチドまたは断片の増加した量が、MM、CLL、またはNHLの存在を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

30

## 【0041】

特定の実施形態では、生体試料は、血清試料である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である。ある種の特定の実施形態では、生体試料は、対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

## 【0042】

ある種の実施形態では、BAFF断片は、切断されたBAFFポリペプチドである。

## 【0043】

さらなる実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片は、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出する。さらなる実施形態では、検出システムは、ELISAアッセイである。いくつかの実施形態では、検出システムは、ラテラルフローアッセイである。

40

## 【0044】

特定の実施形態では、検出は、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う。ある種の実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体である。

## 【0045】

様々な実施形態では、多発性骨髄腫(MM)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、また

50

はB細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）を有する、または有することが疑われる対象の生存についての予後予測の方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、（a）対象から得た生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、（b）ステップ（a）において検出したBAFFポリペプチドまたはその断片の量と、MM、CLL、またはNHLについて処置されている対象の集団におけるBAFFポリペプチドまたはその断片のレベルの中央値とを比較するステップであって、（b）の処置された集団におけるBAFFポリペプチドまたはその断片の中央値または対応する量と比較した（a）の生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の増加した量が、MM、CLL、またはNHLを有する対象についての生存の可能性の低減を示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

10

**【0046】**

特定の実施形態では、対象は、MMと診断されている。さらなる実施形態では、対象は、MMについての処置を受けている。

**【0047】**

ある種の実施形態では、対象は、CLLと診断されている。さらなる実施形態では、対象は、CLLと診断されている。

**【0048】**

いくつかの実施形態では、対象は、NHLと診断されている。関連する実施形態では、対象は、NHLと診断されている。

20

**【0049】**

特定の実施形態では、対象は、中央レベルのBAFFポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が10%低減する。ある種の実施形態では、対象は、中央レベルのBAFFポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が30%低減する。ある種の実施形態では、対象は、中央レベルのBAFFポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が50%低減する。他の実施形態では、対象は、中央レベルのBAFFポリペプチドを有する対象の生存と比較して、生存の可能性が70%低減する。

**【0050】**

特定の実施形態では、生体試料は、血清試料である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

30

**【0051】**

ある種の実施形態では、BAFF断片は、切断されたBAFFポリペプチドである。

**【0052】**

さらなる実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片は、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）、蛍光免疫アッセイ（FIA）、発光免疫アッセイ（LIA）、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出する。さらなる実施形態では、検出システムは、ELISAアッセイである。いくつかの実施形態では、検出システムは、ラテラルフローアッセイである。

40

**【0053】**

特定の実施形態では、検出は、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う。ある種の実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体である。

**【0054】**

様々な実施形態では、多発性骨髄腫（MM）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、またはB細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）の進行または処置に対する応答をモニターする方法を提供する。ある種の実施形態では、方法は、（a）第1の時点における、MM、CL

50

L、またはNHLと診断された患者から得た生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(b)第2の時点または処置の後に於ける、患者から得た生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の量を検出するステップと、(c)ステップ(a)において検出した量と、ステップ(b)において検出した量とを比較するステップであつて、(a)の生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の量と比較した(b)の生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の増加した量が、前記多発性骨髄腫が進行していることを示し、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片の減少した量が、前記MM、CLL、またはNHLが、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示すステップとを含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

10

## 【0055】

特定の実施形態では、生体試料は、血清試料である。ある種の実施形態では、生体試料は、対象の骨髄単核細胞の培養物から得た上清である。ある種の特定の実施形態では、生体試料は、対象の末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

## 【0056】

ある種の実施形態では、BAFF断片は、切断されたBAFFポリペプチドである。

## 【0057】

さらなる実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片は、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、発光免疫アッセイ(LIA)、ラテラルフローアッセイ、またはストリップアッセイからなる群から選択される検出システムを使用して検出する。さらなる実施形態では、検出システムは、ELISAアッセイである。いくつかの実施形態では、検出システムは、ラテラルフローアッセイである。

20

## 【0058】

特定の実施形態では、検出は、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を使用して行う。ある種の実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、モノクローナル抗体である。さらなる実施形態では、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体である。

## 【0059】

様々な実施形態では、患者において多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、またはB細胞非ホジキンリンパ腫を検出し、診断し、生存を予測し、病期分類し、またはモニターするためのキットを提供する。特定の実施形態では、キットは、患者から得た生体試料中のBAFFポリペプチドまたはその断片のレベルを決定するのに適した試薬を含み、生体試料は、血清試料、または対象の骨髄単核細胞もしくは末梢血単核細胞の培養物から得た上清である。

30

## 【0060】

ある種の実施形態では、キットは、BAFFに特異的な抗体を含む。他の実施形態では、キットは、モノクローナル抗体である、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を含む。関連する実施形態では、キットは、ポリクローナル抗体である、BAFFポリペプチドまたはその断片に特異的な抗体を含む。

40

## 【0061】

他の実施形態では、キットは、ELISAアッセイを含む。さらなる実施形態では、キットは、ラテラルフローアッセイを含む。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0062】

【図1】図1は、BM単核細胞(MC)における膜結合BCMAの検出のためのフローサイトメトリー分析を示す。BMMCを、ヤギ抗ヒトBCMA Ab(R&D Systems)または対照ヤギIgG(R&D Systems)と共に4に overnight インキュベートした。細胞を洗浄し、BCMAを検出するためにFITCとコンジュゲートしたウサ

50

ギ抗ヤギAbを試料に加えた(2時間)。細胞を洗浄し、Cytomics CXPソフトウェア(Beckman Coulter、Fullerton、CA)を伴うBeckman Coulter FC500血球計算器を使用してフローサイトメトリー分析を完了した。フローサイトメトリー結果の統計解析は、Cytomics CXPソフトウェアを使用して、BCMAを発現している細胞の割合で完了した。

【0063】

【図2A】図2は、MM患者からの培養したBMMCからの上清においてBCMAが見出されたことを示す。A) BMMCを72時間培養し、上清を集め、BCMA ELISAを行った。活性MMを有する患者は、緩徐進行型多発性骨髄腫(MM)、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(MGUS)を有する患者、または健康な対照より著しく高いBCMAレベルを有した。B) 軽鎖染色によって決定した悪性細胞を有する患者の100%は、これらの培養培地において高濃度のBCMAを示し、一方では、僅かな軽鎖に制限される細胞を有する患者は、これらの培養培地において低いBCMAレベルを有した(当初の拡大率9100)。グラフ化したデータは、3つの反復試験片を使用した平均値±平均値の標準誤差である。

10

【図2B】図2は、MM患者からの培養したBMMCからの上清においてBCMAが見出されたことを示す。A) BMMCを72時間培養し、上清を集め、BCMA ELISAを行った。活性MMを有する患者は、緩徐進行型多発性骨髄腫(MM)、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(MGUS)を有する患者、または健康な対照より著しく高いBCMAレベルを有した。B) 軽鎖染色によって決定した悪性細胞を有する患者の100%は、これらの培養培地において高濃度のBCMAを示し、一方では、僅かな軽鎖に制限される細胞を有する患者は、これらの培養培地において低いBCMAレベルを有した(当初の拡大率9100)。グラフ化したデータは、3つの反復試験片を使用した平均値±平均値の標準誤差である。

20

【0064】

【図3】図3は、可溶性BCMAが、MM患者の血清中に見出され、疾患状況および全生存期間と相関することを示す。A) 未処置の多発性骨髄腫(MM)患者は、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(MGUS)患者および正常な対照と比較して、有意により高い血清BCMAレベルを有した(それぞれ、 $P = 0.0157$ 、 $P < 0.0001$ )。B) 応答患者からの血清BCMAレベルは、進行性疾患を有する患者と比較して低かった( $P = 0.0038$ )。C) 中央値(10.85 ng/mL)超のBCMAレベルを有するMM患者のカプラン-マイヤー全生存期間は、中央値未満の量を有するものと比較して生存の短縮を示した。複数のBCMAレベルを有する個々の患者は、それらの最初の評価のときから分析した。グラフ化したデータは、三連での試料操作のものであり、中央値として提示する。

30

【0065】

【図4】図4は、血清BCMAレベルと上清BCMA濃度との相関を示す。Corvac(商標)血清セパレーターチューブ(Beckton Dickinson、Franklin Lakes、NJ)からの血清は、遠心分離によって単離し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて貯蔵した。BM吸引液をヘパリン処置したチューブ中に集め、Histopaque-1077(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)によって密度勾配遠心分離を使用してMCを単離した。細胞を、10% FBS、非必須アミノ酸、2 mMのグルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウム、25 mMのHEPES、200単位/mLのペニシリン、およびストレプトマイシンを補充したRPMI 1640(Omega Scientific、Tarzana、CA)中で37°Cおよび5%  $\text{CO}_2$ にて培養した。MM患者からのBM吸引液からのMCを72時間培養した後に、上清を集めた。

40

【0066】

【図5-1】図5は、血清BCMAレベルの変化が、抗MM処置に応答した個々の患者の臨床状況の変化と相関することが見出されたことを示す。個々のMM患者の処置の過程において、血清BCMAレベルをELISAで測定し、グラフ化した。1人の患者(201

50

5)において、未処置のMM患者の血清BCMAレベルは、個体が部分応答(PR)または完全応答(CR)を達成した後で減少したことが見出された。患者が進行性疾患(PD)を発症したとき、患者の血清BCMAレベルは増加した。

【図5-2】図5は、血清BCMAレベルの変化が、抗MM処置に応答した個々の患者の臨床状況の変化と相関することが見出されたことを示す。個々のMM患者の処置の過程において、血清BCMAレベルをELISAで測定し、グラフ化した。1人の患者(2015)において、未処置のMM患者の血清BCMAレベルは、個体が部分応答(PR)または完全応答(CR)を達成した後で減少したことが見出された。患者が進行性疾患(PD)を発症したとき、患者の血清BCMAレベルは増加した。

【図5-3】図5は、血清BCMAレベルの変化が、抗MM処置に応答した個々の患者の臨床状況の変化と相関することが見出されたことを示す。個々のMM患者の処置の過程において、血清BCMAレベルをELISAで測定し、グラフ化した。1人の患者(2015)において、未処置のMM患者の血清BCMAレベルは、個体が部分応答(PR)または完全応答(CR)を達成した後で減少したことが見出された。患者が進行性疾患(PD)を発症したとき、患者の血清BCMAレベルは増加した。

【0067】

【図6】図6は、最も高い四分位値(25%)の血清BCMAレベルを有するMM患者のカプラン-マイヤー生存は、残りの患者より短かったことを示す。MM患者(n=162)の中で、最も高い四分位値(>24.56ng/mL)のBCMAレベルを有するものは、患者の残りと比較して著しく短い全生存期間を示した。

【0068】

【図7-1】図7は、ポリクローナル遮断抗体およびモノクローナル抗BCMA抗体(Ab)が、MM血清中のBCMAの存在を確認することを示す。A)ポリクローナル抗BCMA Abと共にインキュベートしたときに、BCMA標準物質は、検出不能であった(左パネル)。(同じ高濃度での)アイソタイプを一致させた対照ヤギAb、または遮断ポリクローナル抗BCMA Abを伴わずにインキュベートしたBCMA標準物質は、BCMAの検出に対して何らの影響を有さなかった(左パネル)。遮断ポリクローナル抗BCMA Abを10分の1の濃度で使用したとき、高濃度のBCMA標準物質のみが検出可能であった(右パネル)。BCMA標準物質をポリクローナル抗BCMA Abと共にインキュベートしなかったとき、BCMAを検出した(右パネル)。B)ポリクローナル抗BCMA Ab(100ng/mL)は、MM患者1056の無希釈および希釈した(1:16まで)血清からのBCMAを遮断した。対照的に、遮断抗体の非存在下での同じ患者からの血清においてBCMAを検出したが、これは段階希釈によって減少した。C)モノクローナル抗BCMA Abは、BCMA標準物質を検出し(下のパネル)たが、レベルのパターンは、ポリクローナル抗BCMA Abを使用したときに得たものと同様であった(上のパネル)。D)ポリクローナルAb(左パネル)を使用した、未処置であったMM患者(1429)、VGPR(1764)またはCR(1004)またはMGUS個体(1725)からのBCMAレベルのパターンは、モノクローナルAbによって得た結果(右パネル)と同様のパターンを示した。

【図7-2】図7は、ポリクローナル遮断抗体およびモノクローナル抗BCMA抗体(Ab)が、MM血清中のBCMAの存在を確認することを示す。A)ポリクローナル抗BCMA Abと共にインキュベートしたときに、BCMA標準物質は、検出不能であった(左パネル)。(同じ高濃度での)アイソタイプを一致させた対照ヤギAb、または遮断ポリクローナル抗BCMA Abを伴わずにインキュベートしたBCMA標準物質は、BCMAの検出に対して何らの影響を有さなかった(左パネル)。遮断ポリクローナル抗BCMA Abを10分の1の濃度で使用したとき、高濃度のBCMA標準物質のみが検出可能であった(右パネル)。BCMA標準物質をポリクローナル抗BCMA Abと共にインキュベートしなかったとき、BCMAを検出した(右パネル)。B)ポリクローナル抗BCMA Ab(100ng/mL)は、MM患者1056の無希釈および希釈した(1:16まで)血清からのBCMAを遮断した。対照的に、遮断抗体の非存在下での同じ患

10

20

30

40

50

者からの血清においてBCMAを検出したが、これは段階希釈によって減少した。C)モノクローナル抗BCMA Abは、BCMA標準物質を検出し(下のパネル)たが、レベルのパターンは、ポリクローナル抗BCMA Abを使用したときに得たものと同様であった(上のパネル)。D)ポリクローナルAb(左パネル)を使用した、未処置であったMM患者(1429)、VGPR(1764)またはCR(1004)またはMGUS個体(1725)からのBCMAレベルのパターンは、モノクローナルAbによって得た結果(右パネル)と同様のパターンを示した。

【図7-3】図7は、ポリクローナル遮断抗体およびモノクローナル抗BCMA抗体(Ab)が、MM血清中のBCMAの存在を確認することを示す。A)ポリクローナル抗BCMA Abと共にインキュベートしたときに、BCMA標準物質は、検出不能であった(左パネル)。(同じ高濃度での)アイソタイプを一致させた対照ヤギAb、または遮断ポリクローナル抗BCMA Abを伴わずにインキュベートしたBCMA標準物質は、BCMAの検出に対して何らの影響を有さなかった(左パネル)。遮断ポリクローナル抗BCMA Abを10分の1の濃度で使用したとき、高濃度のBCMA標準物質のみが検出可能であった(右パネル)。BCMA標準物質をポリクローナル抗BCMA Abと共にインキュベートしなかったとき、BCMAを検出した(右パネル)。B)ポリクローナル抗BCMA Ab(100ng/mL)は、MM患者1056の無希釈および希釈した(1:16まで)血清からのBCMAを遮断した。対照的に、遮断抗体の非存在下での同じ患者からの血清においてBCMAを検出したが、これは段階希釈によって減少した。C)モノクローナル抗BCMA Abは、BCMA標準物質を検出し(下のパネル)たが、レベルのパターンは、ポリクローナル抗BCMA Abを使用したときに得たものと同様であった(上のパネル)。D)ポリクローナルAb(左パネル)を使用した、未処置であったMM患者(1429)、VGPR(1764)またはCR(1004)またはMGUS個体(1725)からのBCMAレベルのパターンは、モノクローナルAbによって得た結果(右パネル)と同様のパターンを示した。

【0069】

【図8】図8は、CB17 SCIDマウスから取り出したヒトMM異種移植片における抗BMCA抗体による陽性の免疫組織化学染色を示す。Microsuite Biological Suite Program(Olympus BX51)を使用して、スライド(当初の拡大率×100)を分析した。

【0070】

【図9】図9は、BCMAが腫瘍担持マウスにおいて成長している生きたMM細胞によって生成されることを示す。観察された血清BCMAが死んだMM細胞からの膜結合BCMAの結果であったかを決定するために、1000mm<sup>3</sup>のLAG-2腫瘍を担持するマウスに、ボルテゾミブ(bort)を0.75mg/kgで、およびシクロホスファミド(cy)を10mg/kgで投与した。処置の12時間後に、ヒトBCMAのレベルを決定した。A)LAG-2担持マウスの腫瘍容積は、未処置のマウスと比較したとき、著しくより小さかった(P=0.0006)。B)LAG-2担持マウスにおける血清BCMAレベルはまた、未処置のマウスと比較したとき、著しくより低かった(P<0.0001)。

【0071】

【図10】図10は、LAG-1MM腫瘍を担持し、メルファランで処置される重症複合免疫不全(SCID)マウスが、腫瘍サイズ、IgGレベル、および血清ヒトBCMAレベルが有意に低減することを示す。IgGタイプの分泌性疾患を示すこのヒトMM異種移植片モデルを担持するマウスに、メルファラン(3mg/kg)をi.p.注射によって週2回投与した。A)未処置のSCIDマウス(n=4)は、大きな腫瘍容積を有し、一方では、メルファラン処置したマウス(n=7)は、小さな腫瘍容積を有した(P<0.0001)。B)血清IgGのレベルは、対照と比較したときに、薬物処置したマウスにおいて有意に低減した(P=0.0033)。C)血清BCMAのレベルは、対照と比較したときに、薬物処置したマウスにおいて有意に低減した(P=0.0055)。提

10

20

30

40

50

示された結果は、群の平均値 ± 平均値の標準誤差である。

【発明を実施するための形態】

【0072】

A. 概要

BCMAはB細胞悪性腫瘍における腫瘍細胞上で発現しているが、血清中では見出されなかった。本発明者らは、BCMAが、様々なB細胞悪性腫瘍、例えば、多発性骨髄腫(MM)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、およびB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)を有する患者の血清において存在し、治療に対する患者の応答および全生存期間と関連することを示した。さらに、検出可能なBAFFのレベルは、病気ではない対象におけるBAFFレベルと比較して、MM、CLL、およびNHL患者の血清中で低いことを本発明者らは驚いたことに発見した。当業者は血清中により高いBAFFレベルを検出したことを報告している。

10

【0073】

様々な実施形態では、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)を確実に診断するための組成物および方法を提供する。培養したBMMCの上清、および患者の血清中のBCMAおよびBAFF濃度を、検出し、かつ/または測定し、ベースラインもしくは対照に対して比較し、対象においてMM、CLL、またはNHLを確実に診断する。特定の理論に束縛されるものではないが、緩徐進行型疾患、MGUSを有する患者、または健康な対象(MMを有さない)と比較して、高い血清BCMAレベルが、活性疾患を有するMM、CLL、およびNHL患者において検出されたため、血清BCMAを使用して、MM、CLL、またはNHLを確実に診断することができる。同様に、緩徐進行型疾患、MGUSを有する患者、または健康な対象と比較した、活性疾患を有する患者における低い血清レベルのBAFFを使用して、MM、CLL、またはNHLを確実に診断することができる。

20

【0074】

MM、CLL、もしくはNHLを有する対象の生存の可能性、または抗MM、抗CLL、もしくは抗NHL処置に対する対象の応答を決定することにおいて、血清BCMAおよびBAFF濃度をまた、予後予測の目的のために使用することができる。特定の理論に束縛されるものではないが、高い血清BCMAレベルが、応答性疾患を有する患者と比較して、進行性疾患を有するMM、CLL、およびNHL患者において検出されたため、ならびに集団の中央値超の血清BCMAレベルを有する患者が、全体的により短い生存率を有するため、血清BCMAを使用して、MM、CLL、またはNHLと診断された患者の生存を確実に決定することができる。同様に、低い血清BAFFレベルが、応答性疾患を有する患者と比較して進行性疾患を有するMM、CLLおよびNHL患者において検出されたため、ならびに集団の中央値未満の血清BAFFレベルを有する患者が、全体的により短い生存率を有するため、血清BAFFを使用して、MM、CLL、またはNHLと診断された患者の生存を確実に決定することができる。同様に、低い血清BAFFレベルが、応答性疾患を有する患者と比較して進行性疾患を有するMM、CLLおよびNHL患者において検出されたため、ならびに集団の中央値未満の血清BAFFレベルを有する患者が、全体的により短い生存率を有するため、血清BAFFを使用して、MM、CLL、またはNHLと診断された患者の生存を確実に決定することができる。同様に、低い血清BAFFレベルが、応答性疾患を有する患者と比較して進行性疾患を有するMM、CLLおよびNHL患者において検出されたため、ならびに集団の中央値未満の血清BAFFレベルを有する患者が、全体的により短い生存率を有するため、血清BAFFを使用して、MM、CLL、またはNHLと診断された患者の生存を確実に決定することができる。

30

【0075】

さらに、BCMAおよびBAFF血清レベルを使用して、対象においてMM、CLLまたはNHLの重症度または程度をモニターすることができる。特定の理論に束縛されるものではないが、高い血清BCMAレベルが、ヒトMM、CLLおよびNHL異種移植片において検出され、血清BCMAレベルが、抗MM、抗CLL、または抗NHL剤に応答した腫瘍容積の変化と関連したため、血清BCMAレベルを、MM、CLL、およびNHL患者の疾患状況および全生存期間をモニターするための効率的なバイオマーカーとして使用することができる。同様に、低い血清BAFFレベルが、応答性疾患を有する患者と比較して進行性疾患を有するMM、CLLおよびNHL患者において検出されたため、ならびに集団の中央値未満の血清BAFFレベルを有する患者が、全体的により短い生存率を有するため、血清BAFFを使用して、MM、CLL、またはNHLと診断された患者の生存を確実に決定することができる。

40

【0076】

本発明の実施は、特に別に示さない限り、当分野の技術の範囲内の化学、生化学、有機化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、遺伝学、免疫学、および細胞生物学の通常の方法を用いるが、これらの多くを例示の目的のために下記で記載する。このような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrookら、Molec

50

ular Cloning: A Laboratory Manual (第3版、2001年); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、1989年); Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982年); Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons、更新2008年7月); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover、DNA Cloning: A Practical Approach、第IおよびII巻 (IRL Press、Oxford、1985年); Anand、Techniques for the Analysis of Complex Genomes、(Academic Press、New York、1992年); Transcription and Translation (B. HamesおよびS. Higgins編、1984年); Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984年); および Harlow および Lane、Antibodies、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1998年)を参照されたい。

10

20

**【0077】**

本明細書において引用した全ての公開資料、特許および特許出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

**【0078】****B. 定義**

他に定義しない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されているものと同様または同等な任意の方法および材料は、本発明の実施または試験において使用することができるが、組成物、方法および材料の好ましい実施形態を本明細書に記載する。本発明の目的のために、下記の用語を下記で定義する。

30

**【0079】**

冠詞「a」、「an」および「the」は、本明細書において、冠詞の文法的な目的の1つまたは複数(すなわち、少なくとも1つ)を指すために使用される。例として、「エレメント」は、1つのエレメントまたは複数のエレメントを意味する。

**【0080】**

本明細書において使用する場合、「約」または「概ね」という用語は、参照の分量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量または長さに対して30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、または1%だけ変化する分量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量または長さを指す。特定の実施形態では、「約」または「概ね」という用語は、数値に先行するとき、値に15%、10%、5%、または1%の範囲をプラスまたはマイナスしたものを示す。

40

**【0081】**

この明細書を通して、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む」、「含み」および「含むこと」という単語は、記述したステップもしくはエレメント、またはステップもしくはエレメントの群を含むが、任意の他のステップもしくはエレメント、またはステップもしくはエレメントの群を除外しないことを暗示すると理解される。「からなる」とは、語句「からなる」に続く何らかのものを含み、これに限定されることを意味する。このように、「からなる」という語句は、列挙したエレメントが必要とされ、または必須であり、他のエレメントが存在し得ないことを示す。「から本質的になる」とは、この語句の

50

後に列挙する任意のエレメントを含み、列挙したエレメントについての開示において特定した活性もしくは作用を妨げず、またはこれに貢献しない他のエレメントに限定されることを意味する。このように、「から本質的になる」という語句は、列挙したエレメントが必要とされ、または必須であるが、他のエレメントが任意選択でなく、これらが列挙したエレメントの活性または作用に影響を与えるか、しないかによって、存在してもよく、または存在しなくてもよいことを示す。

**【0082】**

この明細書を通して「一実施形態」、「実施形態」、「別の実施形態」、「特定の形態」、「関連する実施形態」、「ある種の実施形態」、「さらなる実施形態」もしくは「さらなる実施形態」への言及、またはこれらの組合せは、実施形態に関連して記載した特定のフィーチャー、構造または特徴が、少なくとも本発明の一実施形態に含まれることを意味する。このように、この明細書を通して様々な場所において上記の語句が現れることは、必ずしも全てが同じ実施形態について言及しない。さらに、特定のフィーチャー、構造、または特徴は、1つまたは複数の実施形態において任意の適切な様式で合わせてもよい。

10

**【0083】**

本明細書において使用する場合、「BCMA」という用語は、特に別に示されない限り、野性型およびバリエーションB細胞成熟抗原ポリペプチドの両方を一般に指すことを意図する。BCMAポリペプチドは、BCMA遺伝子によってコードされる。当技術分野で一般に使用されるように、「遺伝子」という用語は、5'非翻訳領域(複数可)(UTR)、エキソン、イントロン、および3'UTRを包含するゲノム領域を指すことを意図する。個々のセグメントは、例えば、プロモーター、コード領域などと特に称し得る。完全なBCMAタンパク質を実現するこのようなセグメントの組合せは、タンパク質コード配列と総称して称し得る。ヒトゲノムにおいてBCMA遺伝子の4つの主要なハプロタイプが存在し、本開示において、「BCMA」という用語は、4つの全てを包含することを意味する(Kawasakiら、Genes Immun.、2巻:276~9頁、2001年)。

20

**【0084】**

「BCMAポリペプチド」という用語は、完全長天然ポリペプチドおよびその断片、特に、生物活性のある断片、および/または機能ドメイン、例えば、生物活性を有する領域もしくはドメインに対応する断片など;その抗原性断片を含めた、ならびに他のタンパク質またはその部分への対象ポリペプチドの融合体を含めた、公知のBCMAポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(ORF)によってコードされるアミノ酸配列を包含する。BCMAポリペプチドのアミノ酸配列は、開示されてきた。例えば、Laabiraら、Nucleic Acids Research、22巻:1147~1154頁、1994年;Laabiraら、EMBO J.、11巻:3897~3904頁(1992年);Grasら、Int. Immunology、7巻:1093~1106頁(1995年);およびMadryら、Int. Immunology、10巻:1693~1702頁(1998年)を参照されたい。本発明のBCMAポリペプチドは、種々の源から、例えば、ヒト組織タイプまたは生体試料、例えば、血清、骨、髄、または組織から単離することができる。

30

40

**【0085】**

本明細書において使用する場合、「BAFF」という用語は、B細胞活性化因子を指す。BAFFはまた、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー13B、Bリンパ球刺激因子(BLyS)、TNFおよびAPOLに関連する白血球発現リガンド(TALL-1)、ならびにCD257として公知である。「BAFF」という用語は、特に別に示されない限り、野性型およびバリエーションポリペプチドの両方を総称して指すことを意図する。BAFFポリペプチドは、BAFF遺伝子によってコードされる。当技術分野で一般に使用されるように、「遺伝子」という用語は、5'非翻訳領域(複数可)(UTR)、エキソン、イントロン、および3'UTRを包含するゲノム領域を指すことを意図する

50

。個々のセグメントは、例えば、プロモーター、コード領域などと特に称し得る。完全な B A F F タンパク質を実現するこのようなセグメントの組合せは、タンパク質コード配列と総称して称し得る。

【0086】

「B A F F ポリペプチド」という用語は、完全長天然ポリペプチドおよびその断片、特に、生物活性のある断片、および/または機能ドメイン、例えば、生物活性を有する領域もしくはドメインに対応する断片など；その抗原性断片を含めた、ならびに他のタンパク質またはその部分への対象ポリペプチドの融合体を含めた、公知の B A F F ポリヌクレオチドのオープンリーディングフレーム (O R F) によってコードされるアミノ酸配列を包含する。B A F F ポリペプチドのアミノ酸配列は、開示されてきた。(例えば、S c h n e i d e r ら、J . E x p . M e d .、189巻(11号)、1747~1756頁(1999年)；M u k h o p a d h y a y ら、J . B i o l . C h e m .、274巻(23号)、15978~15981頁(1999年)；S h u ら、J . L e u k o c . B i o l .、65巻(5号)、680~683頁(1999年)を参照されたい)。本発明の B A F F ポリペプチドは、種々の源から、例えば、ヒト組織タイプまたは生体試料、例えば、血清、骨、髄、または組織から単離することができる。

10

【0087】

「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」という用語は、本明細書において互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および/またはこれらの類似体を含み得る。ヌクレオチドは、任意の三次元構造を含み得、公知または未知の任意の機能を行い得る。「ポリヌクレオチド」という用語は、単鎖および二本鎖、ならびに三重らせん分子を含む。「オリゴヌクレオチド」は一般に、約5~約100ヌクレオチドの単鎖または二本鎖 D N A のポリヌクレオチドを指す。しかし、この開示の目的のために、オリゴヌクレオチドの長さには上限が存在する。オリゴヌクレオチドはまた、オリゴマーまたはオリゴとして公知であり、遺伝子から単離し、または当技術分野において公知の方法によって化学的に合成し得る。

20

【0088】

下記は、ポリヌクレオチドの非限定的実施形態である。遺伝子または遺伝子断片、エキソン、イントロン、m R N A、t R N A、r R N A、リボザイム、c D N A、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離された D N A、任意の配列の単離された R N A、核酸プローブ、およびプライマー。核酸分子はまた、修飾された核酸分子、例えば、メチル化核酸分子および核酸分子類似体を含み得る。プリンおよびピリミジンの類似体は、当技術分野において公知である。核酸は、天然の、例えば、D N A もしくは R N A でよく、または当技術分野において公知のような合成類似体でよい。このような類似体は、アッセイ条件下での優れた安定性によって、プローブとして使用するために好ましくてもよい。骨格、糖または複素環塩基における変更を含めた天然構造における修飾は、細胞内の安定性および結合親和性を増加させることが示されてきた。骨格化学において有用な変化には、ホスホロチオエート；非架橋酸素の両方が硫黄で置換されているホスホロジチオエート；ホスホラミダイト ( p h o s p h o r o a m i d i t e s )；アルキルホスホトリエステルおよびボラノホスフェートである。アキラルホスフェート誘導体は、3' - O' - 5' - S - ホスホロチオエート、3' - S - 5' - O - ホスホロチオエート、3' - C H 2 - 5' - O - ホスホネートおよび 3' - N H - 5' - O - ホスホロアミデート ( p h o s p h o r o a m i d a t e ) を含む。ペプチド核酸は、全リボースホスホジエステル骨格をペプチド連結で置き換えている。

30

40

【0089】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用されて、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指し、これはコードされたアミノ酸およびコードされていないアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、および修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含むことができる。様々な

50

実施形態では、BCMAポリペプチドは、本明細書において開示されている診断用、予後予測用、またはモニター用の組成物および方法における使用のために企図される。この用語は、これらに限定されないが、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、異種および相同リーダー配列を有する融合体、N末端メチオニン残基を有する、または有さない融合体；免疫学的タグ化タンパク質などを含めた融合タンパク質を含む。

#### 【0090】

「実質的に単離された」または「単離された」物質は、天然でその関連する周囲の材料が実質的に存在しないものである。実質的に存在しないとは、天然で関連している材料の少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、さらにより好ましくは少なくとも90%が存在しないことを意味する。本明細書において使用する場合、「単離された」は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、細胞、試料、および抗体を指すことができる。

10

#### 【0091】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行うことができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを増加させる条件は、広く公知であり、当技術分野で公表されている。例えば、Sambrookら(1989年)を参照されたい。関連性のある条件の例は、(ストリンジェンシーを増加させるために)25、37、50および68のインキュベーション温度；10×SSC、6×SSC、1×SSC、0.1×SSCの緩衝液濃度(SSCは、0.15MのNaClおよび15mMのクエン酸緩衝液である)、ならびに他の緩衝系を使用したこれらの同等物；0%、25%、50%、および75%のホルムアミド濃度；5分から24時間のインキュベーション時間；1、2、またはそれ以上の洗浄ステップ；1分、2分、または15分の洗浄インキュベーション時間；ならびに6×SSC、1×SSC、0.1×SSCの洗浄液、または脱イオン水を含む。ストリンジェント条件の例は、50以上にて0.1×SSC(9mMのNaCl/0.9mMのクエン酸ナトリウム)中のハイブリダイゼーションおよび洗浄である。

20

#### 【0092】

「標的細胞」という用語は、個々の細胞、生体試料からの細胞、または細胞培養物を含む。標的細胞は、単一の標的細胞の子孫を含み、子孫は、自然、偶発的、または意図的な変異および/または変化によって、当初の親細胞と必ずしも完全に同一(形態学において、または総DNA補体において)であり得ない。特定の実施形態では、標的細胞は、多発性骨髄腫細胞、骨髄または末梢血単核細胞または血漿B細胞を含む。

30

#### 【0093】

多発性骨髄腫は、これらのタイプの細胞の単一のクローンの悪性形質転換によって特徴付けられる成熟形質細胞形態のB細胞悪性腫瘍である。これらの形質細胞は、BMにおいて増殖し、隣接骨、および時折血液に侵入し得る。多発性骨髄腫のバリエーション形態は、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞白血病、非分泌性骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、骨の孤立性形質細胞腫、および髄外性形質細胞腫を含む(例えば、Braunwaldら(編)、Harrison's Principles of Internal Medicine、第15版(McGraw-Hill、2001年)を参照されたい)。

40

#### 【0094】

慢性リンパ球性白血病(CLL)は、Bリンパ球、またはB細胞と称される未成熟白血球のゆっくりとした増加をもたらす緩徐進行型(遅い成長)のがんである。がん細胞は血液および骨髄を介して広がり、また、リンパ節または他の器官、例えば、肝臓および脾臓に影響を与えることができる。CLLは、骨髄の最終的な不全をもたらす。この疾患は、小リンパ球性リンパ腫と称されることがある。

#### 【0095】

非ホジキンリンパ腫は、リンパ球(白血球)のがんの大きな群を包含する。これらのタイプのリンパ腫は、任意の年齢において起こり得、正常より大きなリンパ節、熱、および

50

体重減少によって特徴付けられることが多い。多くの異なるタイプの非ホジキンリンパ腫が存在する。例えば、非ホジキンリンパ腫は、侵襲性（速い成長）および緩徐進行型（遅い成長）のタイプに分割することができる。非ホジキンリンパ腫は、B細胞およびT細胞に由来することができるが、本明細書において使用する場合、「非ホジキンリンパ腫」および「B細胞非ホジキンリンパ腫」という用語は、互換的に使用される。B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）は、パーキットリンパ腫、慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫（CLL/SLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、およびマントル細胞リンパ腫を含む。骨髄または幹細胞移植の後に起こるリンパ腫は通常、B細胞非ホジキンリンパ腫である。

10

## 【0096】

本発明の検出システムは、部分的に、結合剤がBCMAまたはBAFFに結合する能力に基づいている。一般に、本発明は、BCMAまたはBAFFを特異的に結合する結合剤の使用を企図し、BCMAまたはBAFFおよび結合剤の検出可能な複合体の形成をもたらす。一実施形態では、本発明は、2種の結合剤である捕獲結合剤および検出結合剤を利用し、これらの両方はBCMAに結合し、捕獲結合剤、BCMA、および検出結合剤を含む三元複合体の形成をもたらす。別の実施形態では、本発明は、2種の結合剤である捕獲結合剤および検出結合剤を利用し、これらの両方はBAFFに結合し、捕獲結合剤、BAFF、および検出結合剤を含む三元複合体の形成をもたらす。

20

## 【0097】

例えば、ポリペプチド、糖、および核酸を含めた種々の結合剤のいずれかを使用し得る。さらに別の実施形態では、本発明は、検出結合剤に結合するさらなる結合剤の使用をさらに含む。このようなさらなる結合剤は、例えば、結合した検出結合剤を検出することにおいて有用であり得る。したがって、このようなさらなる結合剤の一例は、検出可能な程度に標識し得、したがって、結合した検出結合剤を検出するために使用され、検出結合剤それ自体が標識の影響を容易に受けやすすくないときに特に有用である、抗体の断片、例えば、Fc断片に特異的な抗体である。ある種の実施形態では、結合剤は、細菌に特異的な抗体である。

## 【0098】

「特異的に結合する」という用語は、抗体結合の文脈で、特定のポリペプチドすなわち、BCMAまたはBAFFポリペプチドのエピトープに対する抗体の高い結合活性および/または高い親和性結合を指す。特定のポリペプチド上のエピトープ（また、本明細書において、「エピトープ」と称される）に結合する抗体は好ましくは、任意の他のエピトープ、特に、関連する分子中に、または同じ試料中に存在し得るものへの同じ抗体の結合より強い。これは、対象とする特定のポリペプチドは、例えば、異なるBCMAエピトープまたは非BCMAエピトープに対してより、特定のBCMAエピトープに対してより強く結合するためである。対象とするポリペプチドに特異的に結合する抗体は、弱くはあるが検出可能なレベル（例えば、対象とするポリペプチドに対して示される結合の10%以下、5%以下、1%以下）で他のポリペプチドを結合することができ得る。このような弱い結合、またはバックグラウンド結合は、例えば、適当な対照の使用によって、対象とする化合物またはポリペプチドへの特異抗体結合と容易に識別可能である。一般に、 $10^7$ モル/L以上、好ましくは $10^8$ モル/L以上の結合親和性を伴って特定のBCMAポリペプチドに結合する本発明の組成物および方法において使用される抗体は、特定のBCMAポリペプチドに特異的に結合すると言われる。一般に、 $10^7$ モル/L以上、好ましくは $10^8$ モル/L以上の結合親和性を伴って特定のBAFFポリペプチドに結合する本発明の組成物および方法において使用される抗体は、特定のBAFFポリペプチドに特異的に結合すると言われる。一般に、 $10^6$ モル/L以下の結合親和性を有する抗体は、現在使用される通常の方法論を使用して、検出可能なレベルで抗原を結合しないという点で有用ではない。

30

40

## 【0099】

50

一実施形態では、BCMAに対するBCMA結合剤の特異的結合の親和性、またはBAFFに対するBAFF結合剤の特異的結合の親和性は、バックグラウンド結合の約2倍、バックグラウンド結合の約5倍、バックグラウンド結合の約10倍、バックグラウンド結合の約20倍、バックグラウンド結合の約50倍、バックグラウンド結合の約100倍、またはバックグラウンド結合の約1000倍、またはそれ超である。

【0100】

別の実施形態では、特異的結合の親和性は、バックグラウンド結合の約2～約1000倍、バックグラウンド結合の約2～500倍、バックグラウンド結合の約2～約100倍、バックグラウンド結合の約2～約50倍、バックグラウンド結合の約2～約20倍、バックグラウンド結合の約2～約10倍、バックグラウンド結合の約5～約100倍、バックグラウンド結合の約5～約50倍、バックグラウンド結合の約5～約20倍、バックグラウンド結合の約10～約100倍、バックグラウンド結合の約10～約50倍、バックグラウンド結合の約50～約500倍、または任意のその間の範囲の親和性である。

10

【0101】

したがって、特異的結合は、結合剤とBCMAまたはBAFFとの間に起こり、ここではこの2つの間に相互作用が存在し、これによって抗体/抗原または酵素/基質相互作用の特徴を有する結合した複合体が生成される。特定の実施形態では、対の1つのメンバーが、特定の種に実質的に結合し、結合メンバーの対応するメンバーが属する化合物のファミリー内の他の種に結合しないとき、特異的結合が特徴付けられる。他の特定の実施形態では、対の1つのメンバーが、1種または複数の特定の種に実質的に結合し、結合メンバーの対応するメンバーが属する化合物のファミリー内の他の種に結合しないとき、特異的結合が特徴付けられる。他の特定の実施形態では、対の1つのメンバーが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超の特定の種に実質的に結合し、結合メンバーの対応するメンバーが属する化合物のファミリー内の他の種に結合しないとき、特異的結合が特徴付けられる。

20

【0102】

一般的に言えば、BCMAまたはBAFF(B)への本発明(A)の結合剤の結合親和性は一般に、下記の反応： $[A] + [B] \rightarrow [AB]$ からもたらされる化学平衡定数 $K_d$ によって表すことができる。次いで、化学平衡定数 $K_d$ は、 $K_d = [A] \times [B] / [AB]$ によって表される。結合剤の結合が特異的または非特異的であるかどうかは、BCMAまたはBAFFへの結合剤の結合親和性( $K_d$ 値)と、別のポリペプチドへの結合との間の差異から判断することができる。

30

【0103】

$K_d$ 値、および $K_d$ 値における差異は、例えば、*in vitro*もしくは*in vivo*の結合アッセイ、および/または他の材料、例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレートもしくは分析用バイオセンサー中の特殊化された表面上のアッセイを使用して測定することができる。一実施形態では、BCMAまたはBAFFに対する結合剤の $K_d$ 値と、望ましくないポリペプチドへの結合との間の差異は、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、50倍、100倍、1000倍、またはそれ超である。

40

【0104】

別の実施形態では、 $K_d$ 値は、 $10^{-4}$  M未満、 $10^{-5}$  M未満、 $10^{-6}$  M未満、 $10^{-7}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満であり、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M未満、 $10^{-13}$  M未満、 $10^{-14}$  M未満、 $10^{-15}$  M未満またはそれ未満であり得る。

【0105】

別の実施形態では、 $K_d$ 値は、約 $10^{-4}$  M～約 $10^{-15}$  M、約 $10^{-4}$  M～約 $10^{-12}$  M、約 $10^{-4}$  M～約 $10^{-10}$  M、約 $10^{-6}$  M～約 $10^{-15}$  M、約 $10^{-6}$  M～約 $10^{-12}$  M、約 $10^{-6}$  M～約 $10^{-10}$  M、約 $10^{-8}$  M～約 $10^{-15}$  M、約 $10^{-8}$  M～約 $10^{-12}$  M、約 $10^{-8}$  M～約 $10^{-10}$  M、約 $10^{-7}$  M～約 $10^{-10}$  M、

50

"  $10^0$  M、または任意のその間の範囲の親和性である。

【0106】

「抗体」という用語は、本明細書において最も広い意味で使用され、これらが所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2種のインタクトな抗体から形成される多特異的抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を特にカバーする。

【0107】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において使用する場合、実質的に均一な抗体の集団から得た抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る可能な自然変異を除いて同一である。一実施形態では、モノクローナル抗体は、抗BCMAモノクローナル抗体である。

【0108】

一実施形態では、モノクローナル抗体は、抗BAFFモノクローナル抗体である。

【0109】

モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して指向している。さらに、典型的には異なる決定基（エピトープ）に対して指向している異なる抗体を含む通常の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向している。これらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンに汚染されていないハイブリドーマ培養物によって合成されるという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得たという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されない。例えば、本発明によって使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature、256巻：495頁（1975年）によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製してもよく、または組換えDNA方法によって作製してもよい（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clacksonら、Nature、352巻：624～628頁（1991年）およびMarksら、J. Mol. Biol.、222巻：581～597頁（1991年）に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離し得る。

【0110】

モノクローナル抗体は、本明細書において、重鎖および/もしくは軽鎖の一部が、特定の種に由来し、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一もしくは相同であり、一方、鎖（複数可）の残りは、別の種に由来し、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一もしくは相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、ならびにこれらが所望の生物活性を示す限りこのような抗体の断片を特に含む（米国特許第4,816,567号；Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci.、USA、81巻：6851～6855頁（1984年））。キメラ抗体を作製する方法は、当技術分野において公知である。

【0111】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラの免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>または抗体の他の抗原結合性の部分配列）である。

【0112】

大部分は、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラットまたはウサギのCDRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によって、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体においても、移入したCDRまたはフレームワーク配列においても見出されな

10

20

30

40

50

い残基を含み得る。これらの修飾を行って、抗体の性能をさらに洗練および最大化する。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここでは高頻度可変性ループの全てまたは実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのこれらに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のこれらであるが、FR領域は、結合親和性を改善させる1つまたは複数のアミノ酸置換を含み得る。FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は典型的には、H鎖において6以下であり、L鎖において3以下である。ヒト化抗体はまた最適に、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含む。さらなる詳細については、Jonesら、Nature、321巻：522～525頁(1986年)；Reichmannら、Nature、332巻：323～329頁(1988年)；およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2巻：593～596頁(1992年)を参照されたい。ヒト化抗体は、霊長類化抗体を含み、抗体の抗原結合性領域は、例えば、マカクザルを対象とする抗原で免疫化することによって生じた抗体に由来する。ヒト化抗体を作製する方法は、当技術分野において公知である。

10

20

30

40

50

【0113】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含めた当技術分野で公知の様々な技術を使用して生成することができる。HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、227巻：381頁(1991年)；Marksら、J. Mol. Biol.、222巻：581頁(1991年)。ColeらおよびBoernerらの技術はまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である。Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁(1985年)；Boernerら、J. Immunol.、147巻(1号)：86～95頁(1991年)。

【0114】

本発明の結合抗体の「機能的断片」は、これらが由来するインタクトな完全鎖分子と実質的に同じ親和性を伴って抗原への結合を保持するこれらの断片である。

【0115】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から同定および分離および/または回収したものである。その天然環境の汚染物質成分は、抗体についての診断上または治療上の使用を妨げる材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。好ましい実施形態では、抗体は、(1)ローリー法によって決定して95重量%超の抗体まで、最も好ましくは99重量%超まで、(2)スピニングカップ配列決定装置を使用することによって、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、または(3)クマシーブルー、もしくは好ましくは銀染色を使用して還元条件もしくは非還元条件下でSDS-PAGEによって均一性となるまで精製される。抗体の天然環境の少なくとも1種の成分は存在しないため、単離された抗体は、組換え細胞内の*in situ*での抗体を含む。しかし通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。

【0116】

「検出可能な程度に標識された抗体」という用語は、付着した検出可能な標識を有する抗体(またはBCMAもしくはBAFFポリペプチドもしくはエピトープのための結合特異性を保持する抗体断片)を指す。検出可能な標識は、化学的コンジュゲーションによって通常付着しているが、標識がポリペプチドである場合、これは遺伝子工学技術によって代わりに付着させることができる。検出可能な程度に標識されたタンパク質の生成のための方法は、当技術分野で周知である。検出可能な標識は、これらに限定されないが、ハプテン、放射性同位体、フルオロフォア、常磁性標識、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)、もしくは検出可能なシグナル(例えば、放射能、蛍光、色)を放ち、またはその基質への標識の曝露の後に検出可能なシグナルを放つ他の部分もしくは化合物を含めて、当技術分野において公知の種々のこのような標識から選択し得る。様々な検出可能な標識/基質対(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ/ジアミノベンジジン、アビジン/

ストレプトアビジン、ルシフェラーゼ/ルシフェリン)、抗体を標識するための方法、および標識抗体を使用するための方法は、当技術分野で周知である(例えば、Harlow および Lane 編 (Antibodies: A Laboratory Manual (1988年)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.)を参照されたい)。

【0117】

1つの技術において、ポリペプチドを含む免疫原を、多種多様の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギ)のいずれかに最初に注射する。次いで、ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、このような抗血清から、例えば、適切な固体支持体にカップリングしたポリペプチドを使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製し得る。一実施形態では、抗体は、抗BCMAポリクローナル抗体である。一実施形態では、抗体は、抗BAFFポリクローナル抗体である。

10

【0118】

「生体試料」は、個体から得た種々の試料タイプを包含し、診断アッセイまたはモニタリングアッセイにおいて使用することができる。この定義は、血液および生物由来の他の液体試料、固体組織試料、例えば、生検標本または組織培養物またはそれに由来する細胞およびその子孫を包含する。この定義はまた、例えば、ある種の成分、例えば、ポリヌクレオチドについて試薬による処置、可溶化、または濃縮によって、これらの調達の後何らかの形で操作されてきた試料を含む。「生体試料」という用語は臨床試料を包含し、また培養物中の細胞、細胞上清、細胞ライセート、血清、血漿、尿、脳脊髄液、体液、および組織試料を含む。試料は、適当な緩衝溶液における希釈によって必要に応じて事前処置し、または必要であれば濃縮し得る。種々の緩衝液の1つ、例えば、ホスフェート、Trisなどを、好ましくは生理学的pHにて用いるいくつかの標準的な水性緩衝溶液のいずれかを使用することができる。生体試料は、周知の技術、例えば、静脈穿刺、腰椎穿刺、液体試料、例えば、唾液または尿、または組織生検などを使用して、患者に由来することができる。

20

【0119】

本明細書において使用する場合、「と関連する」または「と関連する」という用語は、生理的状态、例えば、疾患状況または疾患の程度、処置に対する応答、および生存と統計的に有意な相関を有する、対象の生体試料中のBCMAまたはBAFFのレベルを指す。BCMAまたはBAFFレベルと、特定の生理的状态が存在すること、または存在しないこととの間の相関の強さは、有意性統計試験によって決定し得る。統計スコアを相関に当てはめることによる、異なって発現した遺伝子の発現レベルと特定の生理的状态との間の相関の強さを決定するための方法は、これらのそれぞれが参照によりその全体が本明細書に組み込まれているHollowayら(2002年)、Nature Genetics Suppl.、32巻:481~89頁、Churchill(2002年)、Nature Genetics Suppl.、32巻:490~95頁、Quackenbush(2002年)、Nature Genetics Suppl.、32巻:496~501頁;Slonim(2002年)、Nature Genetics Suppl.、32巻:502~08頁;およびChuaquiら(2002年)、Nature Genetics Suppl.、32巻:509~514頁において概説されている。

30

40

【0120】

「コンジュゲート」とは、融合タンパク質、ならびにアミノ酸またはタンパク質部分、および非タンパク質部分の両方を含有する分子を含めた、別の分子、例えば、ハプテン、小分子、または標識に共有結合的または非共有結合的に結合または接合した任意の分子、例えば、抗体を指す。コンジュゲートは、例えば、固相合成、液相合成、有機化学物質合成技術またはこれらの技術の組合せを含めた種々の当技術分野で公知の技術によって合成し得る。合成の選択は、生み出される特定の分子によって決まる。

【0121】

50

「個体」、「対象」および「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用され、これらに限定されないが、マウス、サル、ヒト、哺乳動物の家畜、哺乳動物の競技用動物、および哺乳動物のペットを含めた哺乳動物を指す。「哺乳動物」という用語は、ヒト、飼育される動物および家畜、ならびに動物園の動物、競技用動物、またはペット動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含めた、哺乳動物に分類されている任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物は、本明細書において、ヒトである。

#### 【0122】

C. 多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、およびB細胞非ホジキンリンパ腫の診断、予後予測およびモニタリングの方法

B細胞成熟抗原(BCMA)のレベルは、これらのがんを有さない正常で健康な対象と比較して、MM、CLL、およびNHL患者の血清中で増加することを本発明者らは発見した。したがって、本発明の特定の実施形態は、例えば、患者の血流、血清、骨髄、または組織を含めた患者から得た生体試料中で観察されるBCMAのレベルに基づいた、多発性骨髄腫の診断、MM、CLL、またはNHLと診断された患者における生存の予後予測、および処置に対する疾患の応答をモニターするための方法および組成物を提供する。BCMAレベルを決定する種々の方法は公知であり、当技術分野で利用可能である。ある種の実施形態では、これらは、BCMA結合剤、例えば、BCMA特異抗体の使用が関与する。本明細書において他の場所で論じるように、当業者に公知であり、かつ試料中のポリペプチドマーカを検出する結合剤を使用するのに適した種々のアッセイフォーマットが存在する。例えば、ELISAアッセイ、ラテラルフローアッセイなど。また、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、1988年を参照されたい。

10

20

#### 【0123】

一般に、MM、CLL、またはNHLは、正常な対照対象におけるものと比較して、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、またはより高いレベルのBCMAの存在によって診断される。一般に、MM、CLL、またはNHLを診断する方法は、(a)対象から得た生体試料、例えば、血清中のBCMAの量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出した量と、所定のカットオフ値または対照生体試料中で検出された量とを比較するステップとを含み、所定のカットオフ値または(b)の対照生体試料中の量と比較した(a)の生体試料中のBCMAの増加した量は、MM、CLL、またはNHLの存在を示し、MM、CLL、またはNHLを有する対象を診断する。

30

#### 【0124】

一実施形態では、MM、CLL、またはNHLを有する対象の生存についての予後予測の方法を提供する。一般に、MM、CLL、またはNHLと診断され、かつ/あるいはこれについて処置を受け、かつMM、CLL、またはNHLについて処置されている対象の集団において検出される血清BCMAの中央値超の量の検出された血清BCMAを有する対象は、中央値以下の血清BCMAレベルを有する集団における対象と比較して生存のより乏しい可能性を有する。特定の実施形態では、MM、CLL、またはNHLについて処置されている集団における中央値より高い血清BCMAレベルを有する対象は、生存の可能性が約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%またはそれ以上低減する。

40

#### 【0125】

一般に、MM、CLL、またはNHLを有する対象の生存についての予後予測の方法は、(a)対象から得た生体試料、例えば、血清中のBCMAの量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出した量と、MM、CLL、またはNHLについて処置されている対象の集団における血清BCMAレベルの中央値とを比較するステップとを含み、(b)の処置された集団における中央値または対応する量と比較した(a)の生体試料中のBCMAの増加した量は、MM、CLL、またはNHLを有する対象について生存

50

の可能性の低減を示す。

【0126】

臨床医が対象の生存の可能性を増加させる期待において治療の過程を変化させることを可能とするため、生存の可能性の低減を予測できることは有利である。

【0127】

ある種の実施形態では、MM、CLL、もしくはNHLの進行、または処置に対する応答をモニターする方法を提供する。MM、CLL、もしくはNHLの進行、または処置に対する応答をモニターする方法は、(a)第1の時点における、MM、CLL、またはNHLと診断された対象から得た生体試料、例えば、血清中のBCMAの量を検出するステップと、(b)第2の時点または処置の後における、対象から得た生体試料中のBCMAの量を検出するステップと、(c)ステップ(a)において検出した量と、ステップ(b)において検出した量とを比較するステップとを含み、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAの増加した量は、前記MM、CLL、またはNHLが進行していることを示し、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAの減少した量は、前記MM、CLL、もしくはNHLは、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示す。

10

【0128】

BCMAを検出する方法の様々な実施形態では、生体試料は、血清、骨髄、および組織からなる群から選択される。特定の実施形態では、mRNAレベルを決定し、一方では、他の好ましい実施形態では、ポリペプチドレベルを決定する。一実施形態では、BCMAに特異的な1種または複数のプライマーを使用して検出を行う。別の好ましい実施形態では、BCMAに特異的な抗体を使用して検出を行う。

20

【0129】

一実施形態では、患者におけるMM、CLL、またはNHLが存在すること、または存在しないことは、(a)患者から得た生体試料とBCMA結合剤とを接触させ、(b)結合剤に結合したBCMAポリペプチドのレベルを試料中で検出し、(c)BCMAポリペプチドのレベルと、所定のカットオフ値または正常な対照対象から得た値とを比較することによって決定し得る。ある種の実施形態では、MM、CLL、またはNHLの検出のためのカットオフ値は、固定化された抗体を、MM、CLL、またはNHLを有さない患者からの試料と共にインキュベートしたときに得られる平均シグナルである。

30

【0130】

特定の実施形態では、所定のカットオフ値の3標準偏差超であるシグナルを生み出す試料は、MM、CLL、またはNHLについて陽性であると考えられる。代替りの好ましい実施形態では、カットオフ値は、Sackettら、Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine、Little Brown and Co.、1985年、106~7頁の方法によって受信者動作曲線を使用して決定する。手短に言えば、この実施形態では、カットオフ値は、診断試験結果についてのそれぞれの可能なカットオフ値に対応する、真性陽性率(すなわち、感度)および偽陽性率(100%-特異度)の対のプロットから決定し得る。プロット上で左上コーナーに最も近いカットオフ値(すなわち、最も大きなエリアを取り囲む値)は、最も正確なカットオフ値であり、この方法によって決定したカットオフ値より高いシグナルを生み出す試料は、陽性であると考え得る。代わりに、カットオフ値は、プロットに沿って左にシフトして偽陽性率を最小化し、または右にシフトして偽陰性率を最小化し得る。一般に、この方法によって決定したカットオフ値より高いシグナルを生み出す試料は、MM、CLL、またはNHLについて陽性であると考えられる。

40

【0131】

一実施形態では、アッセイは、BCMAポリペプチドに結合し、BCMAポリペプチドを試料の残りから取り除く、固体支持体上に固定化されたBCMA結合剤の使用が関与する。次いで、結合したBCMAポリペプチドは、レポーター基を含有し、かつ結合剤/ポリペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を使用して検出し得る。このような検出試

50

薬は、例えば、BCMAポリペプチドもしくは抗体に特異的に結合する結合剤、または結合剤、例えば、抗免疫グロブリン、タンパク質G5タンパク質Aもしくはレクチンに特異的に結合する他の作用剤を含み得る。

#### 【0132】

関連する実施形態では、アッセイは、本明細書において他の場所で論じるようにラテラルフローまたはストリップ試験フォーマットで行い、BCMA結合剤、例えば、抗体は、膜、例えば、ニトロセルロース上に固定化される。ラテラルフロー試験において、試料内のBCMAポリペプチドは、試料が膜を通過するにつれ固定化された結合剤に結合する。次いで、第2の標識した結合剤は、膜を流れて第2の結合剤を含有する溶液としてBCMA結合剤-ポリペプチド複合体に結合する。次いで、結合した第2の結合剤の検出を上記のように行い得る。ストリップ試験フォーマットにおいて、BCMA結合剤が結合する膜の一端を、試料を含有する溶液に浸す。試料は、膜に沿って第2の結合剤を含有する領域を通り、固定化された結合剤のエリアに移動する。固定化された抗体のエリアにおける第2の結合剤の濃度は、MM、CLL、またはNHLの存在を示す。

10

#### 【0133】

本発明は、MM、CLL、またはNHLの進行を病期分類し、またはモニターし、処置に対する応答を決定するための同様の方法を提供する。血清BCMAレベルは疾患の重症度または程度と関連するため、特定の病期と関連するレベルを決定し、対象の血清において観察されるものと比較し、対象の疾患の病期を決定する。同様に、疾患の進行、および処置または治療に対する応答を、疾患の過程の異なる時点、または処置レジメンの前および後において、対象の血清（または他の生体試料）中のBCMAレベルを比較することによってモニターする。特定の実施形態では、BCMA血清レベルは、MM、CLL、またはNHL患者において上昇し、BCMAのレベルは、疾患病期と関連し、すなわち、BCMAレベルは、進行性MM、CLL、またはNHLにおいてより高く、処置または寛解に入ったことに応答してより低くなる。このように、本発明は、対象の血流から得た血清試料を使用して、MM、CLL、もしくはNHL疾患の進行、または処置に対する応答を検出し、診断し、予後予測、病期分類し、モニターする急速で信頼できる方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、BCMAに特異的な抗体を使用して、ELISAアッセイ、ラテラルフローアッセイ、またはストリップ試験アッセイによって実施する。

20

#### 【0134】

本発明は、対象から得た生物試料、例えば、血清試料中のBCMAレベルに適し、またはこれを決定する試薬を含む、多発性骨髄腫を検出し、診断し、予後予測し、病期分類し、またはモニターするためのシステムおよびキットをさらに提供する。一実施形態では、キットは、ELISA、ラテラルフロー、またはストリップ試験アッセイを行うための試薬、例えば、BCMAに特異的な抗体を含む。本発明の検出システムおよびキットを、下にさらに詳細に記載する。

30

#### 【0135】

さらに、本発明者らは、BAFFレベルが、これらのがんを有さない正常で健康な対象と比較して、MM、CLL、およびNHL患者の血清中で減少することを発見した。したがって、本発明の特定の実施形態は、例えば、患者の血流、血清、骨髄、または組織を含めた患者から得た生体試料において観察されるBAFFのレベルに基づいた、多発性骨髄腫の診断、MM、CLL、またはNHLと診断された患者における生存の予後予測、および処置に対する疾患の応答をモニターするための方法および組成物を提供する。BAFFレベルを決定する種々の方法は公知であり、当技術分野で利用可能である。

40

#### 【0136】

一般に、MM、CLL、またはNHLは、正常な対照対象におけるものと比較して、少なくとも2分の1、少なくとも5分の1、少なくとも10分の1、少なくとも20分の1、少なくとも50分の1、少なくとも100分の1、少なくとも1000分の1、またはそれ未満のレベルのBAFFの存在によって診断される。一般に、MM、CLL、またはNHLを診断する方法は、(a)対象から得た生体試料、例えば、血清中のBAFFの量

50

を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出した量と、所定のカットオフ値または対照生体試料中で検出された量とを比較するステップとを含み、所定のカットオフ値または(b)の対照生体試料中の量と比較した(a)の生体試料中のBAFFの減少した量は、MM、CLL、またはNHLの存在を示し、MM、CLL、またはNHLを有する対象を診断する。

【0137】

一実施形態では、MM、CLL、またはNHLを有する対象の生存についての予後予測の方法を提供する。一般に、MM、CLL、またはNHLと診断され、かつ/あるいはこれについて処置を受け、かつMM、CLL、またはNHLについて処置されている対象の集団において検出される血清BAFFの中央値未満の量の検出された血清BAFFを有する対象は、中央値以上の血清BAFFレベルを有する集団における対象と比較して生存のより乏しい可能性を有する。特定の実施形態では、MM、CLL、またはNHLについて処置されている集団における中央値より低い血清BAFFレベルを有する対象は、生存の可能性が約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%またはそれ以上低減する。

10

【0138】

一般に、MM、CLL、またはNHLを有する対象の生存についての予後予測の方法は、(a)対象から得た生体試料、例えば、血清中のBAFFの量を検出するステップと、(b)ステップ(a)において検出した量と、MM、CLL、またはNHLについて処置されている対象の集団における血清BAFFレベルの中央値とを比較するステップとを含み、(b)の処置された集団における中央値または対応する量と比較した(a)の生体試料中のBAFFの減少した量は、MM、CLL、またはNHLを有する対象について生存の可能性の低減を示す。

20

【0139】

ある種の実施形態では、MM、CLL、もしくはNHLの進行、または処置に対する応答をモニターする方法を提供する。MM、CLL、もしくはNHLの進行、または処置に対する応答をモニターする方法は、(a)第1の時点における、MM、CLL、またはNHLと診断された対象から得た生体試料、例えば、血清中のBAFFの量を検出するステップと、(b)第2の時点または処置の後における、対象から得た生体試料中のBAFFの量を検出するステップと、(c)ステップ(a)において検出した量と、ステップ(b)において検出した量とを比較するステップとを含み、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAの減少した量は、前記MM、CLL、またはNHLが悪化していることを示し、(a)の生体試料中の量と比較した(b)の生体試料中のBCMAの増加した量は、前記MM、CLL、もしくはNHLは、寛解に入っており、または処置に対して応答していることを示す。

30

【0140】

BAFFを検出する方法の様々な実施形態では、生体試料は、血清、骨髄および組織からなる群から選択される。特定の実施形態では、mRNAレベルを決定し、一方では、他の好ましい実施形態では、ポリペプチドレベルを決定する。一実施形態では、BAFFに特異的な1種または複数のプライマーを使用して検出を行う。別の好ましい実施形態では、BAFFに特異的な抗体を使用して検出を行う。

40

【0141】

一実施形態では、患者におけるMM、CLL、またはNHLが存在すること、または存在しないことは、(a)患者から得た生体試料とBAFF結合剤とを接触させ、(b)結合剤に結合したBAFFポリペプチドのレベルを試料中で検出し、(c)BAFFポリペプチドのレベルと、所定のカットオフ値または正常な対照対象から得た値とを比較することによって決定し得る。ある種の実施形態では、MM、CLL、またはNHLの検出のためのカットオフ値は、固定化された抗体を、MM、CLL、またはNHLを有さない患者からの試料と共にインキュベートしたときに得られる平均シグナルである。

【0142】

50

特定の実施形態では、所定のカットオフ値の3標準偏差未満であるシグナルを生み出す試料は、MM、CLL、またはNHLについて陽性であると考えられる。

【0143】

一実施形態では、アッセイは、BAFFポリペプチドに結合し、BAFFポリペプチドを試料の残りから取り除く固体支持体上に固定化されたBAFF結合剤の使用が関与する。次いで、結合したBAFFポリペプチドは、レポーター基を含有し、かつ結合剤/ポリペプチド複合体に特異的に結合する検出試薬を使用して検出し得る。このような検出試薬は、例えば、BAFFポリペプチドもしくは抗体に特異的に結合する結合剤、または結合剤、例えば、抗免疫グロブリン、タンパク質G5タンパク質Aもしくはレクチンに特異的に結合する他の作用剤を含み得る。

10

【0144】

関連する実施形態では、アッセイは、本明細書において他の場所で論じるようにラテラルフローまたはストリップ試験フォーマットで行い、BAFF結合剤、例えば、抗体は、膜、例えば、ニトロセルロース上に固定化される。ラテラルフロー試験において、試料内のBAFFポリペプチドは、試料が膜を通過するにつれ固定化された結合剤に結合する。次いで、第2の標識した結合剤は、膜を流れて第2の結合剤を含有する溶液としてBCMA結合剤-ポリペプチド複合体に結合する。次いで、結合した第2の結合剤の検出を上記のように行い得る。ストリップ試験フォーマットにおいて、BAFF結合剤が結合する膜の一端を、試料を含有する溶液に浸す。試料は、膜に沿って第2の結合剤を含有する領域を通り、固定化された結合剤のエリアに移動する。固定化された抗体のエリアにおける第2の結合剤の濃度は、BAFFの存在を示す。

20

【0145】

本発明は、MM、CLL、またはNHLの進行を病期分類し、またはモニターし、処置に対する応答を決定するための同様の方法を提供する。血清BAFFレベルは疾患の重症度または程度と相関するため、特定の病期と関連するレベルを決定し、対象の血清において観察されるものと比較し、対象の疾患の病期を決定する。同様に、疾患の進行、および処置または治療に対する応答を、疾患の過程の異なる時点、または処置レジメンの前および後において、対象の血清（または他の生体試料）中のBAFFレベルを比較することによってモニターする。特定の実施形態では、血清BAFFレベルは、MM、CLL、またはNHL患者において減少し、BAFFのレベルは、疾患病期と相関し、すなわち、そのレベルは、進行性MM、CLL、またはNHLにおいてより低く、処置または寛解に入ったことに応答して増加する。このように、本発明は、対象の血流から得た血清試料を使用して、MM、CLL、もしくはNHL疾患の進行、または処置に対する応答を検出し、診断し、予後予測、病期分類し、モニターする急速で信頼できる方法を提供する。特定の実施形態では、方法は、BAFFに特異的な抗体を使用して、ELISAアッセイ、ラテラルフローアッセイ、またはストリップ試験アッセイによって実施する。

30

【0146】

本発明は、対象から得た生物試料、例えば、血清試料中のBAFFレベルに適し、またはこれを決定する試薬を含む、多発性骨髄腫を検出し、診断し、予後予測し、病期分類し、またはモニターするためのシステムおよびキットをさらに提供する。一実施形態では、キットは、ELISA、ラテラルフロー、またはストリップ試験アッセイを行うための試薬、例えば、BAFFに特異的な抗体を含む。本発明の検出システムおよびキットを、下にさらに詳細に記載する。

40

【0147】

D. 検出システムおよびキット

様々な実施形態では、本発明は、MM、CLL、またはNHLのための検出システムおよびキットを提供する。本発明の検出システムまたはキットは、生体試料、例えば、対象の血清中での、MM、CLL、またはNHL患者の診断、予後予測、またはモニタリングのために使用し得る。診断キットは、材料に加えて、抗原-抗体反応の検出のための方法を含むことができる。検出方法は好ましくは、フローサイトメトリー、免疫組織化学、お

50

よび酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、放射免疫アッセイ（R I A）、酵素免疫アッセイ（E I A）、蛍光免疫アッセイ（F I A）、発光免疫アッセイ（L I A）、ラテラルフローアッセイおよびストリップアッセイからなる群から選択される。抗原認識材料の反応性は、酵素反応、蛍光、発光、または放射を検出する装置を使用して確認することができる。一実施形態では、M M、C L L、またはN H Lの診断、予後予測、またはモニタリングは、抗B C M A抗体またはその抗原結合断片を含む、フローサイトメトリーキット、免疫組織化学キット、E L I S Aキットまたはラテラルフローまたはストリップキットで行うことができる。

【0148】

一実施形態では、M M、C L L、またはN H Lの診断、予後予測、またはモニタリングは、抗B A F F抗体またはその抗原結合断片を含む、フローサイトメトリーキット、免疫組織化学キット、E L I S Aキットまたはラテラルフローまたはストリップキットで行うことができる。

10

【0149】

一実施形態では、キットまたはシステムは、下記の成分の1つもしくは複数または全てを含み得る。1)本発明のバイオマーカー（複数可）の1つまたは複数、例えば、B C M AまたはB A F Fからなる1種または複数の標準物質；2)バイオマーカー（複数可）に特異的な結合剤、例えば、キットを使用するためにアッセイされる1種の抗体または複数の抗体；3)書面での説明書；4)試料および標準物質のための賦形剤；5)洗浄緩衝液；6)発色試薬；7)停止液；ならびに8)担体、例えば、抗体担体、例えば、結合した抗体、またはポリスチレンビーズを有するラテラルフロー装置、またはマイクロプレート。

20

【0150】

一実施形態では、M M、C L L、またはN H Lを診断し、予後予測し、またはモニターするために使用される検出システムまたはキットは、本発明によって具現される方法によってバイオマーカー（複数可）の濃度（複数可）を決定する定量的E L I S A（酵素結合免疫吸着アッセイ）である。アッセイの原理は、定量的サンドイッチ酵素免疫アッセイ技術を使用することであり、バイオマーカーについて選択的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体を、担体、例えば、そのウェル中へとマイクロプレート上に事前コーティングする。次いで、標準物質および試料をウェル中にピペットで移し、存在するバイオマーカーをこの固定化された抗体に結合させる。次に、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄し、バイオマーカーに特異的である酵素結合モノクローナルまたはポリクローナル抗体をウェルに加える。洗浄を再び行い、次いで、基質溶液をウェルに加える。引き続いて、第1のステップにおいて結合した本発明のポリペプチドの量に比例して色が発生する。色の発生を、停止液を使用して停止し、色の強度をマイクロプレートリーダーによって測定する。

30

【0151】

他の実施形態では、M M、C L L、またはN H Lの診断、予後予測、またはモニタリングは、例えば、ラテラルフローアッセイを使用して行い得る。このようなラテラルフローアッセイは、例えば、オンサイトのスクリーニングアッセイのための対費用効果の高い、速く単純であり、感受性の方法である可能性を有する。ラテラルフローアッセイは、ラテラルフローが起こることを可能とする担体を含み、試料または検出試薬は、担体上の1つの場所から別の場所まで移る。本発明によって具現される方法における使用に適したラテラルフローアッセイの多くのフォーマットが存在し、当業者は、特定のフォーマットをどのように選択し、最適化するかについて容易にわかる。本発明のラテラルフロー試験ストリップの一例は、例えば、下記の成分を含む。試料パッド；その上に試験試料を適用する吸収パッド；標的分析物に特異的であり、かつ有色の粒子（通常、金コロイド粒子、またはラテックスマイクロスフィア）にコンジュゲートしている抗体を含有する、コンジュゲートまたは試薬パッド；捕獲ゾーンまたは試験ラインとして、その上に膜に亘ってライン状に抗標的分析物抗体が固定化される反応膜、典型的には、疎水性ニトロセルロースまたは酢酸セルロース膜（コンジュゲート抗体に特異的な抗体を含有する対照ゾーンがまた存在

40

50

し得る) ; および給水または廃液レザバー、毛細管作用によって反応膜を横切って試料を引き抜き、これを集めるように設計されたさらなる吸収パッド。

【0152】

ラテラルフロー技術についていくつかのパリエーションが存在する。膜上の捕獲ゾーンは、抗体よりむしろ標的分析物によって、固定化された抗原または酵素を含有し得る。マルチプレックス試験を作成するために複数の捕獲ゾーンを適用することがまた可能である。例えば、特定の実施形態では、BCMAまたはBAFFを検出することができる試験ストリップ、および別々に同じ試料中で、多発性骨髄腫のさらなるバイオマーカー、例えば、2M、IL-6、C反応性タンパク質、および血清単クローン性タンパク質が意図される。ラテラルフロー免疫アッセイは、訓練されていないオペレーターが使用するのに単純であり、一般に、15分以内に結果が出る。これらは非常に安定的およびロバストであり、長い保存寿命を有し、通常冷蔵を必要としない。これらはまた、生産するのに相対的に安価である。これらのフィーチャーによって、ポイントオブケアにおける使用のために、ならびに現場において、および実験室において試料を試験するために、これらは理想的なものとなる。

10

【0153】

大部分のラテラルフロー免疫アッセイが定性的結果を実現することのみができる一方で、捕獲ゾーンに結合したコンジュゲートの量を測定することによってある程度の定量化を得ることが可能である。これは、有色の試験ラインの強度を測定するための専用の読取り機を使用して行うことができる。例えば、Neogen Corporationは、その一連のReveal (登録商標) アッセイキットと共に使用するためのAccuscan (商標) ラテラルフロー読取り機を開発し、Charm Sciencesはまた、そのRosa (登録商標) 範囲の試験ストリップのための読取り機を供給する。より洗練された技術、例えば、蛍光染料標識したコンジュゲートがまた開発されて、ラテラルフローアッセイの定量的な可能性が改善されてきた。

20

【0154】

キット形態での検出システムは、例えば、少なくとも1つのアッセイのために十分な量で、パッケージ化された試薬として、MM、CLL、またはNHLのための血清学的バイオマーカーを結合する抗体組成物またはモノクローナル抗体組成物を含むことができる。パッケージ化された試薬の使用のための説明書がまた典型的には含まれる。

30

【0155】

キット形態における検出システムはまた、例えば、試験試料と粘度制御剤および安定剤を含有する緩衝系(試薬1)とを反応槽中に合わせ、溶液を混合するための手段を含むことができる。キット形態での検出システムはまた、試料および緩衝液を有する反応槽のパラメータを読み取るための手段、ならびに試験試料および緩衝液混合物と、反応槽中の前記生物学的物質への蛍光標識リガンド(試薬2)とを合わせ、溶液を混合し、アッセイ溶液を生成するためのさらなる手段を含むことができる。さらに、試薬2を、さらなる希釈容量のアッセイ溶液を伴わずに反応槽に送達し得る。

【0156】

本明細書において使用する場合、「パッケージ」という用語は、定められた限度内に抗体組成物またはモノクローナル抗体組成物を保つことができる、固体マトリックスまたは材料、例えば、ガラス、プラスチック、紙、ホイルなどを指す。したがって、例えば、パッケージは、ミリグラム量の企図するポリペプチドを含有するのに使用されるガラス製バイアルでよく、またはマイクログラム量の企図するポリペプチドもしくは抗体が動作可能に添付されているマイクロタイタープレートウェルでよい。

40

【0157】

「使用のための説明書」は典型的には、試薬濃度または少なくとも1つのアッセイ法パラメーター、例えば、混合する試薬および試料の相対量、試薬/試料混合物のための保守期間、温度、緩衝液条件などを記載した具体的な表現を含む。

【0158】

50

特定の実施形態では、本発明の検出システムは、本発明のポリペプチドまたは抗体分子を含有する複合体の形成をシグナル伝達することができる標識または指示手段をさらに含む。

【0159】

「複合体」は、本明細書において使用する場合、特異的結合反応、例えば、抗体 - 抗原または受容体 - リガンド反応の産物を指す。例示的な複合体は、免疫反応生成物である。

【0160】

本明細書において使用する場合、「標識」および「指示手段」という用語は、これらの様々な文法的形態において、複合体の存在を示す検出可能なシグナルの生成に直接的または間接的に関与している単一の原子および分子を指す。任意の標識または指示手段は、本発明の抗体もしくはモノクローナル抗体組成物の部分である発現されたタンパク質、ポリペプチド、もしくは抗体分子に連結し、またはこれに組み込まれ、あるいは別々に使用されることができ、これらの原子または分子は、単独で、またはさらなる試薬と併せて使用することができる。このような標識はこれら自体が臨床診断化学において周知であり、これらが別に新規なタンパク質の方法および/またはシステムと共に利用される限りにおいてのみ、本発明の一部を構成する。

10

【0161】

標識化手段は、有用な免疫蛍光トレーサーである蛍光色素（染料）を形成するために抗体または抗原を変性することなく、抗体または抗原に化学的に結合する蛍光標識剤でよい。適切な蛍光標識剤は、蛍光色素、例えば、フルオレセインイソシアネート（FIC）、フルオレセインイソチオシアネート（isothiocyanate）（FITC）、5 - ジメチルアミン - 1 - ナフタレンスルホニルクロリド（DANSC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）、リサミン、ローダミン 8200 スルホニルクロリド（RB200SC）などである。免疫蛍光分析技術についての記載は、参照により本明細書に組み込まれている De Luca、「Immunofluorescence Analysis」、Antibody As a Tool、Marchalonis ら編、John Wiley & Sons, Ltd.、189 ~ 231 頁（1982 年）において見出される。

20

【0162】

ある種の実施形態では、指示基は、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、グルコースオキシダーゼなどである。主要な指示基が酵素、例えば、HRP またはグルコースオキシダーゼである場合、さらなる試薬は、受容体 - リガンド複合体（免疫反応体）が形成されたという事実を可視化することが必要とされる。HRP のためのこのようなさらなる試薬は、過酸化水素および酸化染料前駆体、例えば、ジアミノベンジジンを含む。グルコースオキシダーゼと共に有用なさらなる試薬は、2, 2' - アジノ - ジ - (3 - エチル - ベンゾチアゾリン (benzthiazoline) - G - スルホン酸) (ABTS) である。

30

【0163】

放射性元素はまた有用な標識剤であり、本明細書において例示的に使用される。例示的な放射標識剤は、 $\beta$  線放出を生じさせる放射性元素である。それ自体が  $\beta$  線を放つ元素、例えば、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{128}\text{I}$ 、 $^{132}\text{I}$  および  $^{51}\text{Cr}$  は、 $\beta$  線放出を生じさせる放射性元素指示基を表す。特に好ましいのは、 $^{125}\text{I}$  である。有用な標識化手段の別の基は、これら自体が  $\beta$  線を放つこれらの元素、例えば、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{15}\text{O}$  および  $^{13}\text{N}$  である。このように放たれた  $\beta$  線は、動物の体中に存在する電子との遭遇によって  $\beta$  線を生じる。また有用なのは、 $\beta$  放射体、例えば、 $^{11}\text{In}$  または  $^3\text{H}$  である。

40

【0164】

標識の連結、すなわち、ポリペプチドおよびタンパク質の標識化は、当技術分野で周知である。例えば、ハイブリドーマによって生成される抗体分子は、培養培地中の成分として提供される放射性同位体含有アミノ酸の代謝性組込みによって標識することができる。

50

例えば、Galfrera、Meth. Enzymol.、73巻：3～46頁(1981年)を参照されたい。活性化された官能基によるタンパク質のコンジュゲーションまたはカップリングの技術は特に適用可能である。例えば、全てが参照により本明細書に組み込まれている、Aurameasら、Scand. J. Immunol.、第8巻、Suppl. 7：7～23頁(1978年)、Rodwellら、Biotech.、3巻：889～894頁(1984年)、および米国特許第4,493,795号を参照されたい。

【0165】

本発明の検出システムまたはキットを、「ELISA」フォーマットにおいて使用して、例えば、体液試料、例えば、血流、血清、骨髄、または組織などにおけるBCMAまたはBAFFの存在または量を検出することができる。「ELISA」とは、固相に結合した抗体または抗原、および酵素-抗原または酵素-抗体コンジュゲートを用いて、試料中に存在する抗原または抗体の量を検出および定量化する、酵素結合免疫吸着アッセイを指す。このように、例えば、本発明のポリペプチド、抗体分子組成物またはモノクローナル抗体分子組成物は、固体マトリックスに添付して、対象診断システムにおけるパッケージを構成する固体支持体を形成することができる。試薬は典型的には、水性媒体からの吸着によって固体マトリックスに添付しているが、当業者には周知の他のモードの添付を使用することができる。

10

【0166】

有用な固体マトリックスはまた、当技術分野で周知である。このような材料は水不溶性であり、架橋デキストラン；アガロース；直径が約1ミクロン～約5ミリメートルのポリスチレンビーズのビーズ；ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースまたはナイロンをベースとするウェブ、例えば、シート、ストリップもしくはパドル；またはマイクロタイタプレートのチューブ、プレートもしくはウェル、例えば、ポリスチレンまたはポリ塩化ビニルから作製したものが含まれる。

20

【0167】

本明細書に記載されている任意の検出システムの試薬種、標識された特異的結合剤または増幅試薬は、溶液中、液体分散物として、または実質的に乾燥粉末として、例えば、凍結乾燥した形態で提供することができる。指示手段が酵素である場合、酵素の基質をまたシステムの別々のパッケージ中で提供することができる。固体支持体、例えば、前記のマイクロタイタプレートおよび1種または複数の緩衝液をまた、この検出アッセイシステムにおける別々にパッケージ化したエレメントとして含むことができる。

30

【0168】

検出システムに関連して本明細書において論じられている包装材料は、診断システムにおいて従来通り利用されるものである。このような材料は、ガラスおよびプラスチック(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレンおよびポリカーボネート)のボトル、バイアル、プラスチックおよびプラスチック-ホイルラミネートの封筒などを含む。一実施形態では、本発明の検出システムは、例えば、BCMAまたはBAFFの存在についてアッセイするのに有用である。このようなシステムは、キット形態で、例えば、BCMAまたはBAFFに対する抗体を含有するパッケージを含む。

40

【0169】

この明細書において引用されている全ての公開資料、特許出願、および発行された特許は、それぞれの個々の公開資料、特許出願、または発行された特許が参照により組み込まれていることが特におよび個々に示されているかのように、参照により本明細書に組み込まれている。

【0170】

上記の発明を、理解を明瞭化する目的のために例示および例として少し詳しく記載してきたが、添付の特許請求の範囲の精神または範囲を逸脱することなくある種の変化および修飾をこれに行い得ることは本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかであろう。限定としてではなく、例示のためのみに、下記の実施例を提供する。当業者は、変更また

50

は修正して本質的に同様の結果を生じさせることができる種々の重大でないパラメーターを容易に認識することができる。

【実施例】

【0171】

(実施例1)

MM患者からのBMMCはBCMA発現を示し、これらの細胞からの培養培地は、高いBCMA濃度を示した

多発性骨髄腫(MM)患者および健康な対象からの骨髄単核細胞(BMMC)( $1 \times 10^4$ 個の細胞)上の膜結合B細胞成熟抗原(BCMA)の発現を、フローサイトメトリー分析を使用して測定した。BCMAタンパク質は、健康な対象からのBMMCの非常に少ない割合で検出し、一方では、MM患者からの大部分のBMMCは強いBCMA染色を示した(図1)。BCMA発現はまた、形質細胞白血病を有する患者からの末梢血単核細胞(PBMC)において強かった(図1)。MM患者からの、CD138を発現し、かつ軽鎖に制限されるBMMCにおけるBCMAの存在(データは示さず)をまた確認した。

【0172】

活性疾患(n=12試料)または緩徐進行型疾患(n=2)を有するMM患者、2人のMGUS個体、および5人の健康な対象からのBMMC( $1.6 \times 10^6$ 個の細胞/ウェル)を72時間培養し、BMからのMM細胞が培養培地中にBCMAを放出することができるかどうかを決定した。MM患者からの上清は、高いBCMA濃度を示し、一方では、健康な対象からのものは無視できる量を示した(図2A)。BCMA上清レベルは、緩徐進行型MMまたはMGUSを有するものより、活性疾患を有するMM患者において著しくより高かった(図2A)。BCMAは、測定可能なモノクローナルIgの存在を失った形質細胞白血病を有する患者における非常に高い濃度( $1589 \mu\text{g/ml}$ )(データは示さず)を除いて、MM患者からのPBMCからの上清において検出可能でなかった。これらの知見は、大量のBCMAがPBまたはBM MC含有MMから放出されることを示す。

【0173】

(実施例2)

上清BCMAレベルは、MM形質細胞の百分率と相関する

培養培地中のBCMAの濃度は、BMMC中のMM形質細胞の百分率と相関する。H&Eならびに および 軽鎖染色を行い、悪性の形質細胞を同定した。有核細胞および形質細胞の総数を計数し、悪性細胞の割合を計算した。軽鎖染色を示す細胞の割合によって決定した高い百分率の悪性細胞(MM腫瘍細胞の $>70\%$ )を有する患者は、これらの培養培地において高濃度のBCMAを示し、一方では、僅かな軽鎖染色細胞を有する患者は、これらの培養培地において低いBCMAレベルを有した(図2B)。

【0174】

(実施例3)

血清BCMAレベルは、MM患者において上昇した

新規に診断されたMMを有する患者(n=50)、MGUS個体(n=23)、ならびに年齢および性別を一致させた健康な対照対象(n=40)からの血清中のBCMAレベルを測定した。MM患者は、IgG(n=24)、IgG(n=9)、IgA(n=6)、IgA(n=3)、IgM(n=1)、軽鎖のみ(n=4)、および軽鎖のみ(n=3)の疾患を有するものを含んだ。国際病期分類システム(Greippら、2005年)を使用した。30人、12人および7人の患者は、それぞれ、病期1、2、および3であり、1人は不明であった。健康な対照( $P < 0.0001$ )およびMGUS個体( $P = 0.0157$ ; 図3A)と比較したとき、MM患者におけるBCMAの血清レベルは上昇した。特に、MM、MGUSおよび対照における中央値血清BCMA濃度は、それぞれ、 $13.87 \text{ ng/ml}$ 、 $5.30 \text{ ng/ml}$ 、および $2.57 \text{ ng/ml}$ であった。

【0175】

10

20

30

40

50

緩徐進行型MM患者 (n = 16) は、活性MMを有するもの (n = 34、中央値 17.79 ng/mL) より低いレベル (中央値 11.60 ng/mL) を有した。さらに、MMまで最終的に進行した1人のMGUS患者は、MGUS患者の最も高い血清BCMAレベル (12.62 ng/mL) を有し、これはこの女性がMMを発症したとき 25.68 ng/mL へと倍増を超えて増えた。

【0176】

BCMAレベルは、血清クレアチニンレベルと相関しなかった (データは示さず)。高濃度のヒトIgG (1000 ng/mL) によるELISAの交差反応性は、0.015 ng/mL のみのBCMA読み取り情報を伴って無視できた (データは示さず)。

【0177】

(実施例4)

MM患者における血清BCMAレベルは、培養したMM BMMCからの上清、疾患状況および全生存期間と相関した

MM患者 (n = 14 試料) の培養したBMMCの血清および上清からのBCMAレベルは、強い相関を示した ( $r = 0.82$ ; 図4)。血清BCMAレベルの変化は、抗MM処置に応答した個々の患者の臨床状況の変化と相関することが見出された。

【0178】

応答性 (PR) 患者 (n = 80 試料) は、進行性疾患を示す個体 (n = 79 試料) (中央値 19.76 ng/mL;  $P = 0.0038$ ; 図3B) より低い血清BCMAレベル (中央値 4.06 ng/mL) を有した。さらに、完全応答 (CR) を達成した患者 (n = 26) は、非常に良好な部分応答 (VGPR) (n = 16、中央値 3.33 ng/mL) または進行性応答 (PR) (n = 38、中央値 5.44 ng/mL) を伴う患者より低いBCMAレベル (中央値、2.09 ng/mL) を有した。

【0179】

処置に対して応答する患者は、BCMAレベルの減少を示し、一方では、疾患の進行を伴う患者は、BCMAレベルの増加を示した (図5)。患者の臨床状況に関わらず、血清BCMAレベルは、投与された特異的抗MM剤の使用と相関しなかった (表1)。

10

20

【表 1】

表 1 : BCMA レベルおよび抗MM処置

応答性 (R)						
	ステロイド	アルキル 化剤	サリドマイド	レナリドミ ド	ボルテゾミ ブ	PLD*
BCMA、中央 値	3.90 0587	4.48 852	3.99 0236 5	4.30 7007	3.53 2681	4.21 8058
高い	229. 5743	42.7 3638	229. 5743	57.6 7272	57.6 7272	57.6 7272
低い	0	0.85 8652	0.34 7363	0	0	0.87 0104
試料の数	61	10	12	15	52	16
進行性 (P)						
	ステロイド	アルキル 化剤	サリドマイド	レナリドミ ド	ボルテゾミ ブ	PLD*
BCMA、中央 値	20.8 4389	12.9 8811	12.2 9372	20.5 0919	19.1 2083	38.8 1387
高い	701. 0412	42.7 2638	701. 0412	301. 1029	175. 3668	76.4 1552
低い	2.02 5315	0.85 8652	2.87 1958	2.23 7081	2.02 5315	7.88 947
試料の数	44	11	10	16	31	6
RおよびP						
	ステロイド	アルキル 化剤	サリドマイド	レナリドミ ド	ボルテゾミ ブ	PLD*
BCMA、中央 値	7.74 1305	7.59 9548	8.50 5564	8.74 9386	6.02 1121	6.95 5296
高い	701. 0412	42.7 3638	701. 0412	301. 1029	175. 3668	76.4 1552
低い	0	0.85 8652	0.34 7363	0	0	0.87 0104
試料の数	105	21	22	31	83	22

\* PLD—ペグ化リポソームドキシソルピシン

【0180】

11カ月の中央値経過観察（範囲、&lt;1~83カ月）を伴って、中央値（10.85n

10

20

30

40

50

g / m L ) 超の B C M A レベルを有する M M 患者 ( n = 1 6 2 ) は、中央値濃度未満の量を有するものと比較して生存の短縮を示した ( P = 0 . 0 0 1 4 ; 図 3 C ) 。さらに、最も高い四分位値 ( 2 4 . 5 6 n g / m L ) における患者は、患者の残りと比較して著しい生存の短縮を示した ( P = 0 . 0 0 0 3 ; 図 6 ) 。

#### 【 0 1 8 1 】

( 実施例 5 )

ポリクローナル抗 B C M A A b は、標準物質および M M 患者からの血清中で B C M A の検出を遮断した

M M 患者からの血清を、ポリクローナル抗 B C M A A b ( カタログ番号 A F 1 9 3 ; R & D S y s t e m s ) と共に 4 にて一晚インキュベートし、E L I S A を行った。抗 B C M A A b ( 4 0 0 n g / m L ) は、標準物質中で B C M A の検出を遮断し、一方では、同じ高濃度でのアイソタイプを一致させたポリクローナルヤギ対照 A b は、B C M A の検出に対して何らの影響も有さなかった ( 図 7 A 、左パネル ) 。10 分の 1 の濃度の遮断ポリクローナル抗 B C M A A b ( 4 0 n g / m L ) を使用したとき、B C M A は検出可能となったが、高濃度の標準物質が存在したときのみであった ( 図 7 A 、右パネル ) 。

#### 【 0 1 8 2 】

同様に、B C M A は、高濃度 ( 1 0 0 n g / m L ) の遮断抗 B C M A A b の存在下で、希釈および無希釈の M M 血清において検出されなかった ( 図 7 B ) 。B C M A レベルは、無希釈の M M 血清中で高く、試料単独を希釈すると減少した ( 図 7 B ) 。10 分の 1 の濃度の遮断ポリクローナル抗 B C M A A b ( 1 0 n g / m L ) を使用したとき、B C M A は検出可能となったが、遮断 A b を欠いている血清中より低いレベルであった ( データは示さず ) 。このように、外因的に加えられた抗 B C M A A b は、E L I S A において使用される標準的抗 B C M A A b で同定される B C M A の検出を遮断し、B C M A を検出するためのこのアッセイの特異性を示した。

#### 【 0 1 8 3 】

( 実施例 6 )

モノクローナル抗 B C M A A b は、ポリクローナル A b をベースとする E L I S A で検出するのと同様の血清 B C M A レベルを検出した

プレートを、捕獲 A b としてモノクローナル抗 B C M A A b ( S i g m a - A l d r i c h ) でコーティングした。R & D S y s t e m s キットからの B C M A 標準抗原、または患者の血清を、モノクローナル A b ( m A b ) をコーティングしたプレートと共にインキュベートし、次いで、R & D S y s t e m s キットに記載されている標準的プロトコルを使用した。B C M A は m A b で検出可能であり、B C M A 標準物質 ( 図 7 C ) ならびに M M および M G U S 患者からの血清試料 ( 図 7 D ) を評価するとき、レベルのパターンは、ポリクローナル A b で得た結果と一致した。

#### 【 0 1 8 4 】

( 実施例 7 )

ヒト M M 異種移植片を含有する S C I D マウスはこれらの血清中でヒト B C M A を含有し、B C M A レベルは、腫瘍容積および抗 M M 治療に対する応答と相関した

S C I D マウスにおいて成長したヒト M M 異種移植片を使用し、ヒト M M 血清、および培養した M M B M M C からの上清中に検出された B C M A が、実際は、悪性細胞に由来したかどうかを決定した。ヒト M M を有する S C I D マウスにおいて成長している唯一のヒト細胞タイプは、腫瘍細胞であった。M M 腫瘍 ( L A G - 2 、 L A G - 1 および L A G - 1 A ) を、免疫組織化学 ( I H C ) を使用してヒト B C M A 発現について分析した。B C M A タンパク質を、3 つの異種移植片において、マウス B C M A に結合しない抗 B C M A A b で検出した ( 図 8 ) 。他のマウスの組織染色は観察されなかった ( データは示さず ) 。

#### 【 0 1 8 5 】

血清 B C M A は、自然の腫瘍細胞代謝回転からまたは抗 M M 処置から、死細胞の結果と

して検出されなかった。マウスはパラプロテインを生成しないLAG - 2腫瘍を概ね1000mm<sup>3</sup>にまで成長させ、この時点でマウスをボルテゾミブおよびシクロホスファミドで処置した。マウスは、この併用療法に続いて8~12時間出血させ(n=7)、または未処置の対照(n=4)であった。未処置の動物と比較して、腫瘍容積(P=0.0006)および血清ヒトBCMAレベル(P<0.0001)の両方における減少が、薬物処置したマウスにおいて観察された(図9A、B)。薬物処置に続いて、死細胞からの膜結合タンパク質の可能な放出からの血清BCMAレベルの上昇は観察されなかった。このように、マウスの血清中のBCMAは、生きた形質細胞からであり、死にかけているMM細胞からのその放出の結果ではなかった。

#### 【0186】

血清ヒトBCMAレベルはまた、別のヒトMM異種移植片であるLAG - 1を担持するマウスにおいて腫瘍成長、IgGレベルおよび処置に対する応答と相関した。未処置のマウス(n=4)は、大きな腫瘍容積ならびに高い血清IgGおよびBCMAレベルを有した。i.p.注射によって週2回メルファラン(3mg/kg、n=4)を投与されたマウスは、未処置のマウスと比較してより小さな腫瘍容積、IgG、およびBCMAレベルを示した(腫瘍容積:P<0.0001;hIgG、P=0.0033;BCMA、P=0.0055;図10A~C)。ヒトBCMAは、腫瘍を担持しないSCIDマウスの血清中で検出されなかった(データは示さず)。

#### 【0187】

(実施例8)

材料および方法

血清収集物ならびにPBおよびBMMC培養物

PBおよびBM吸引液は、MM、MGUSを有する患者、ならびに年齢および性別を一致させた健康な対照対象から得た。研究は治験審査委員会(Western IRB BIO 001)によって承認され、インフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に従って得た。

#### 【0188】

International Myeloma Working Group(IMWG)の判断基準(International Myeloma Working Group、2003年;Rajkumarら、2011年)によって、患者はMGUSを有すると、MM患者は緩徐進行型MMまたは症候性疾患と、および処置された患者は進行性または応答性疾患(部分応答(PR)、非常に良好(VG)PR、または完全応答(CR))を示すと定義された。MM患者のカプラン-マイヤー生存は、最初の血清BCMA測定の時から死亡または最後の経過観察の日までで決定した。複数のBCMA試料を伴う個々の患者は、これらの最初の評価の時から分析した。

#### 【0189】

Corvac(商標)血清セパレーターチューブ(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、USA)からの血清を、遠心分離によって単離し、-80で貯蔵した。PBおよびBM吸引液をヘパリン処置したチューブ中に集め、MCを、Histopaque-1077(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)によって密度勾配遠心分離を使用して単離した。細胞を、10%ウシ胎仔血清、非必須アミノ酸、2mmol/Lのグルタミン、1mmol/Lのピルビン酸ナトリウム、25mmol/LのHEPES、200単位/mLのペニシリン、およびストレプトマイシンを補充したRPMI1640培地(Omega Scientific、Tarzana、CA、USA)中で37および5%CO<sub>2</sub>にて培養した。

#### 【0190】

血清、およびBMMC培養物からの上清液中のBCMA濃度の決定のための酵素結合免疫吸着アッセイ

血清および上清試料を、R&D Systems、Minneapolis、MN、USAから得たBCMA酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)(カタログ番号DY19

10

20

30

40

50

3 E) によって分析した。血清試料を 1 : 50 に希釈し、製造業者のプロトコルによって B C M A E L I S A アッセイを行った。E L I S A プレートを、K C J u n i o r ソフトウェアを伴う、450 nm に設定した  $\mu$  Q u a n t ( B i o t e k I n d u s t r i e s、W i n o o s k i、V T、U S A) プレートリーダーを使用して分析した。値は、各標本上の三連試料の平均を表す。この B C M A E L I S A キットは、組換えヒト A P R I L または B A F F、組換えヒト T A C I / F c または組換えマウス B C M A / F c またはマウス B C M A と交差反応しない。

#### 【0191】

ポリクローナル抗 B C M A 抗体 ( A b ) 遮断実験

B 細胞成熟抗原標準物質を、別のポリクローナルヤギ抗ヒト B C M A A b ( カタログ番号 A F 1 9 3 ; R & D S y s t e m s ) または対照 A b と共に、高濃度 ( 4 0 0 n g / m l ) または低濃度 ( 4 0 n g / m l ) で 4 にて一晩インキュベートした。ポリクローナルヤギ I g G A b を、アイソタイプ対照として使用した ( カタログ番号 A B - 1 0 8 - C ; R & D S y s t e m s ) 。本発明者らはまた、一晩のインキュベーションに続く M M 患者 1 0 5 6 の血清からの B C M A の検出をブロックするこのポリクローナル抗 B C M A A b の能力を試験し、上記の B C M A E L I S A プロトコルを使用して B C M A レベルを評価した。

10

#### 【0192】

モノクローナル抗 B C M A A b による B C M A の検出

M M 患者からの B 細胞成熟抗原標準物質または血清 ( 1 : 5 0 に希釈 ) を、B C M A E L I S A において使用されるポリクローナル「捕獲 A b」の代わりに、マウスのモノクローナル抗ヒト B C M A A b ( カタログ番号 W H 0 0 0 0 6 0 8 M 1 ; S i g m a - A l d r i c h ) を使用してインキュベートした。次いで、B C M A E L I S A プロトコルによって試料をアッセイした。

20

#### 【0193】

M M 異種移植片研究

6 週齢の C B 1 7 S C I D マウスは、C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s ( W i l m i n g t o n、M A、U S A) から得た。動物実験委員会によって承認されたプロトコルによって動物試験を行った。C D 3 8 および C D 1 3 8 を発現している L A G - 2 腫瘍を確立するために、I g G パラプロテインを示す M M 患者からの B M 生検を、S C I D マウスの後肢に埋め込んだ ( C a m p b e l l および B e r e n s o n、2 0 0 8 年 ) 。異種移植片を含有するマウスからの血清は、ヒト I g G または遊離軽鎖を示さなかった。したがって、この異種移植片は、非分泌性と特徴付けた。しかし、免疫組織化学的 ( I H C ) 染色を使用して、鎖が腫瘍細胞のサイトゾル中に観察された。L A G - 1 A 腫瘍は、レナリドミドに対して耐性である I g G 生成 M M を有する患者から発生した ( C a m p b e l l および B e r e n s o n、2 0 0 8 年 ) 。L A G - 1 腫瘍は、I g G パラプロテインを示した M M 患者から発生した ( C a m p b e l l および B e r e n s o n、2 0 0 8 年 ) 。異種移植片を切除し、2 0 ~ 4 0 m m <sup>3</sup> の小片に切開し、筋肉中に埋め込んだ。腫瘍埋込みの 7 日後、マウスを処置群に無作為化した。腫瘍が直径 2 . 5 c m に達したとき、動物を安楽死させた。

30

40

#### 【0194】

プロテアソーム阻害剤 ( P I ) ボルテゾミブ ( M i l l e n n i u m P h a r m a c e u t i c a l s、C a m b r i d g e、M A、U S A) を、1 m g / m l のストック溶液として使用し、0 . 9 % 塩化ナトリウム ( N a C l ) を使用して希釈した。ボルテゾミブを 0 . 7 5 m g / k g で週 2 回 i . v . 投与した。シクロホスファミド ( F l o r i d a I n f u s i o n、P a l m H a r b o r、F L、U S A) を、N a C l を有する 2 0 m g / m L のストック溶液から溶解し、1 0 m g / k g で経口胃管栄養法によって週 1 回投与した。3 m g のメルファラン ( S i g m a - A l d r i c h ) を、1 0 0  $\mu$  L の酸 - E t O H ( 4 7  $\mu$  l の濃 H C l および 1 m l の 1 0 0 % E t O H ) に溶解し、リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) で 1 m L に希釈し、3 m g / m L のストック溶液を生み出し

50

た。薬物を、3 mg / kg の用量で週 2 回腹腔内 ( i . p . ) 注射によって投与した。

【 0 1 9 5 】

標準的なカリパスを使用して腫瘍を測定し、楕円体積についての式を適用した (  $4 / 3 \times [幅 / 2]^2 \times [長さ / 2]$  )。腫瘍成長および I g G 曲線を、処置群の平均値および標準誤差に関して分析した。

【 0 1 9 6 】

マウスを、後眼窩洞を介して毎週出血させ、ヒト I g G および B C M A レベルを決定した。試料を 10,000 rpm で 5 分間スピンし、血清を集めた。ヒト I g G E L I S A キット ( B e t h y l L a b o r a t o r i e s , M o n t g o m e r y , T X , U S A ) を、製造業者の仕様書によって使用した。550 nm の参照波長を伴う 450 nm での吸光度を、K C J u n i o r ソフトウェア ( B i o - T e k I n s t r u m e n t s , W i n o o s k i , V T , U S A ) を伴う  $\mu$  Q u a n t マイクロプレート分光光度計で決定した。ヒト B C M A E L I S A キット ( R & D S y s t e m s ) を使用して、血清タンパク質レベルを決定した。

10

【 0 1 9 7 】

免疫組織化学分析

B 細胞成熟抗原タンパク質発現を、MM および正常な B M M C において、ならびに本発明者らのヒト MM 異種移植片において決定した。異種移植片について、4 % パラホルムアルデヒドに固定した後、5  $\mu$  m の切片を切り取った。B M M C について、細胞を 1 % パラホルムアルデヒドで固定し、 $1 \times 10^5$  個の細胞 / スライドをサイトスピンにかけた。スライドを、0.05 % T w e e n - 20 P B S ( P B S T ) および 3 % ウシ血清アルブミン ( B S A ) で室温にて ( R T ) 1 時間ブロッキングした。試料を、抗ヒト B C M A A b ( 5  $\mu$  g / m L ) に 4 にて一晚曝露した。スライドを T B S T で 3 回洗浄し、T B S T 中で 1 : 500 に希釈した抗マウス、抗ウサギまたは抗ヤギ抗体 ( K P L , G a i t h e r s b u r g , M D , U S A ) とコンジュゲートした西洋ワサビペルオキシダーゼで R T にて 2 時間処置した。スライドを、T B S T 中で 3 回洗浄し、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール ( A E C ) 緩衝液中に 5 分間入れ、A E C キット ( V e c t o r L a b o r a t o r i e s , B u r l i n g a m e , C A , U S A ) を使用して色を検出した。軽鎖染色のために、B M M C を、100  $\mu$  L の P B S に再懸濁させ、スライド上でサイトスピンにかけた。試料を 3 % B S A でブロッキングし、その後、A b を加えて、非特異的結合を防止した。ヤギ抗ヒト 軽鎖 A b ( S i g m a - A l d r i c h )、抗ヒト 軽鎖 A b ( S i g m a - A l d r i c h ) またはアイソタイプ対照 A b ( R & D S y s t e m ) を、対応する試料に加えた。これらの抗体を、一晚 4 にてインキュベートした。翌日、抗体を 0.05 mol / L の T B S T 緩衝液で洗浄した。次いで、試料を、二次 A b の前に、10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> メタノールで処置した。次いで、試料をペルオキシダーゼ標識したウサギ抗ヤギ A b ( K P L ) と共に 2 時間 R T にてインキュベートし、次いで、洗浄した。ペルオキシダーゼ基質 ( V e c t o r L a b o r a t o r i e s ) を、30 分間試料に加えた。細胞を、ヘマトキシリンで 1 分間染色し、試料をマウントした。B C M A ならびに および 軽鎖発現は、光学顕微鏡 ( O l y m p u s B X 5 1 ; O l y m p u s , S a n D i e g o , C A , U S A ) を使用して決定した。ヘマトキシリンおよびエオシン ( H & E ) 染色を、標準的な染色手順を使用して B M M C 上で行った。

20

30

40

【 0 1 9 8 】

統計分析

上清、血清および異種移植片の研究において観察される差異の統計的有意性は、スチューデント t 検定を使用して決定した。最小有意水準は、 $P < 0.05$  であった。統計解析は、Windows (登録商標) のための G R A P H P A D P R I S M バージョン 4.03 ( G r a p h P a d ソフトウェア、S a n D i e g o , C A , U S A ) を使用して決定した。

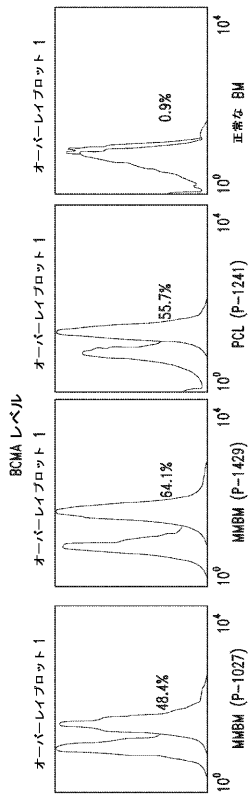
【 0 1 9 9 】

一般に、下記の特許請求の範囲において、使用される用語によって、特許請求の範囲を

50

、明細書において開示されている特定の実施形態、および特許請求の範囲に限定すると解釈すべきではないが、このような特許請求の範囲に与えられる完全な範囲の同等物と共に全ての可能な実施形態を含むと解釈すべきである。したがって、特許請求の範囲は、この開示によって限定されない。

【 図 1 】



MM = 多発性骨髄腫  
 BM = 骨髄  
 P = 患者  
 PCL = 形質細胞白血病

FIG. 1

【 図 2 A 】

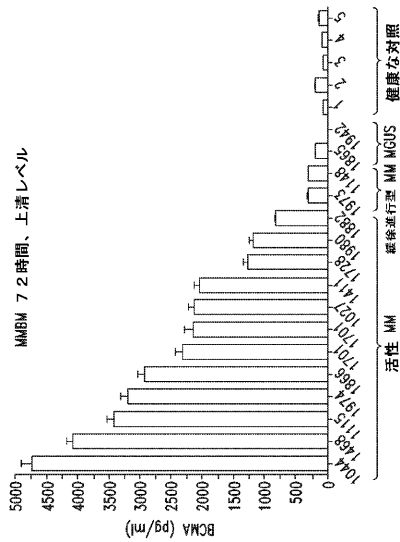
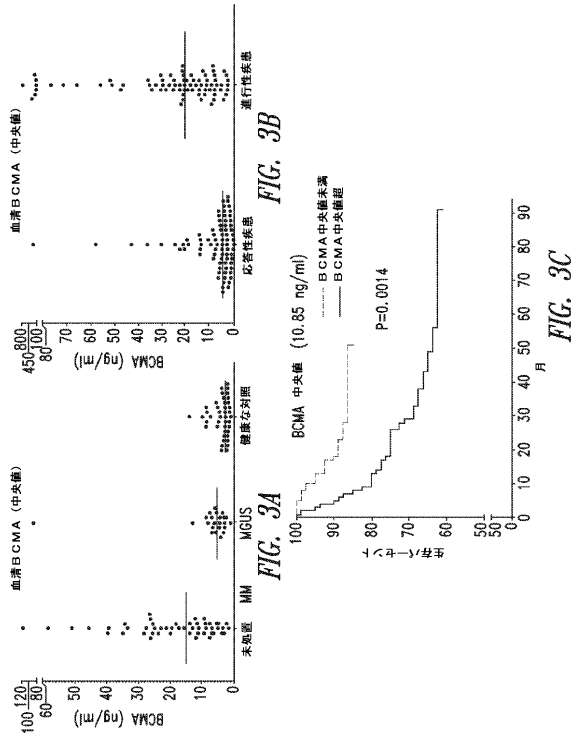


FIG. 2A

【 図 3 】



【 図 4 】

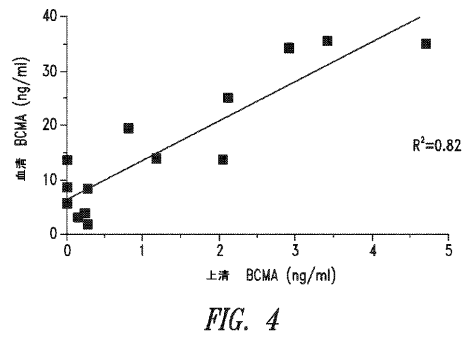


FIG. 4

【 図 5 - 1 】

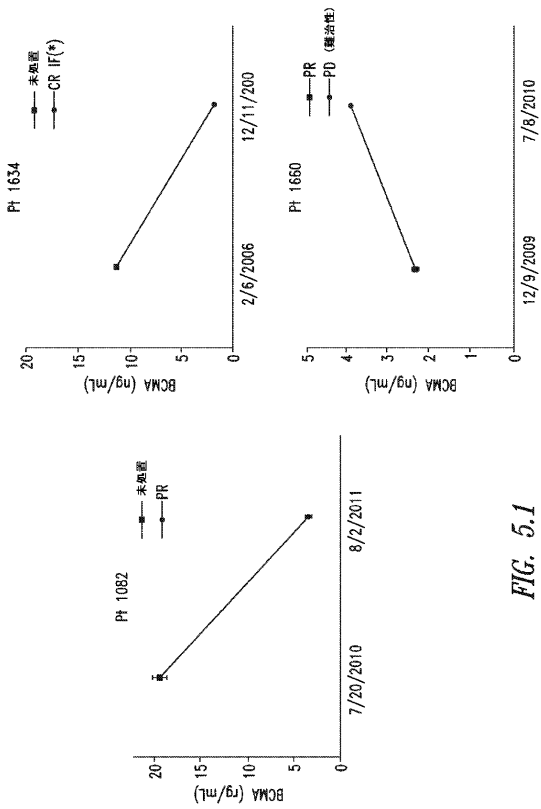


FIG. 5.1

【 図 5 - 2 】

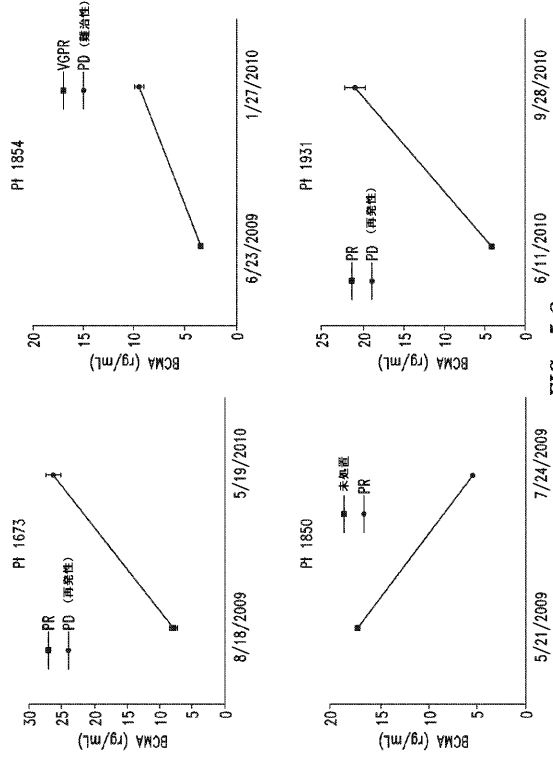


FIG. 5.2

【 図 5 - 3 】

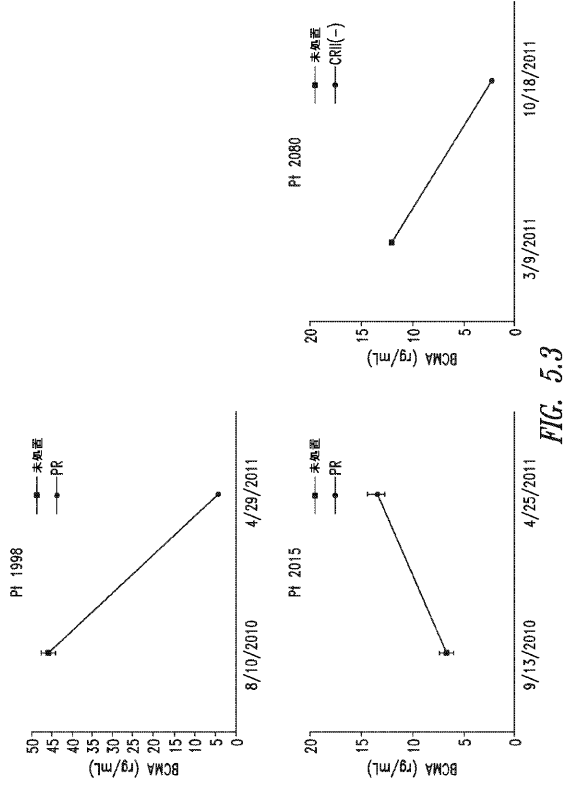


FIG. 5.3

【 図 6 】

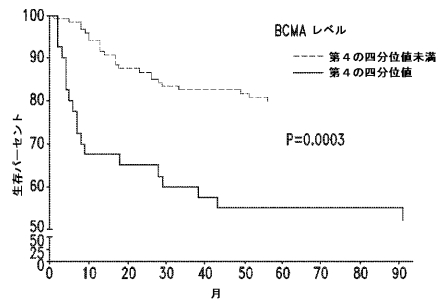


FIG. 6

【 図 7 - 1 】

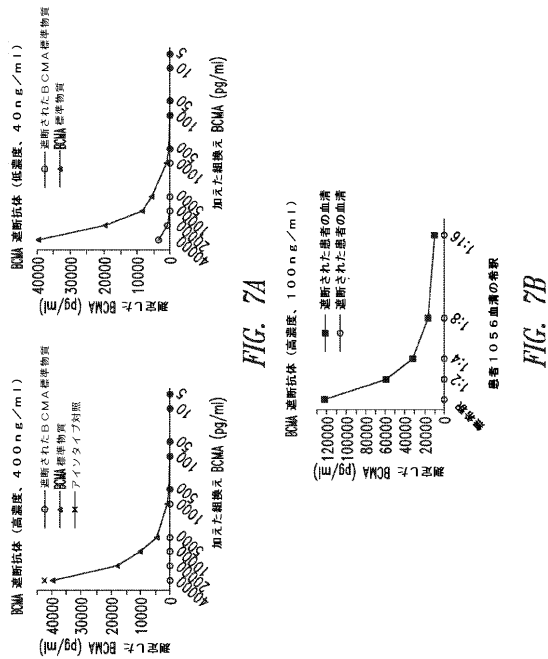


FIG. 7A

FIG. 7B

【 図 7 - 2 】

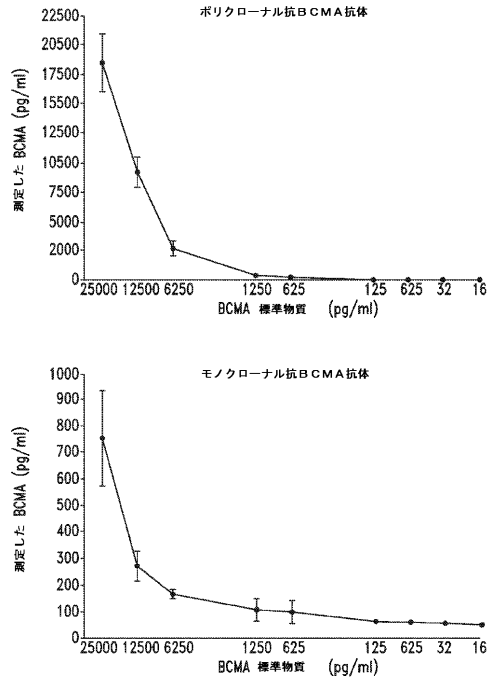


FIG. 7C

【 図 7 - 3 】

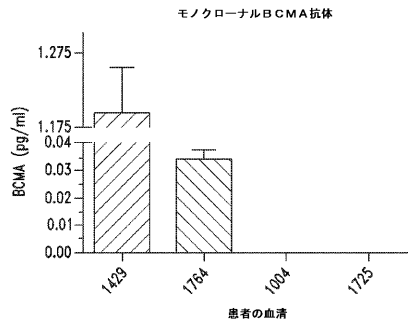
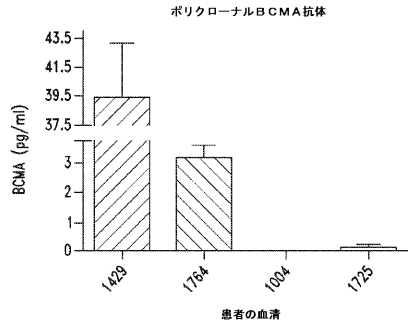


FIG. 7D

【 図 9 】

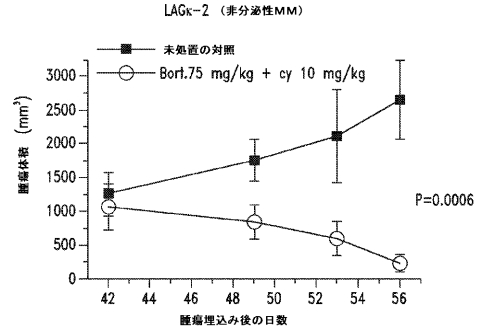


FIG. 9A

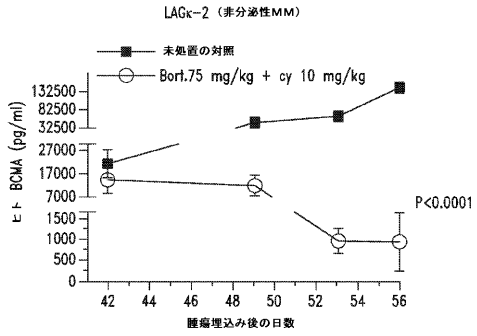


FIG. 9B

【 図 10 】

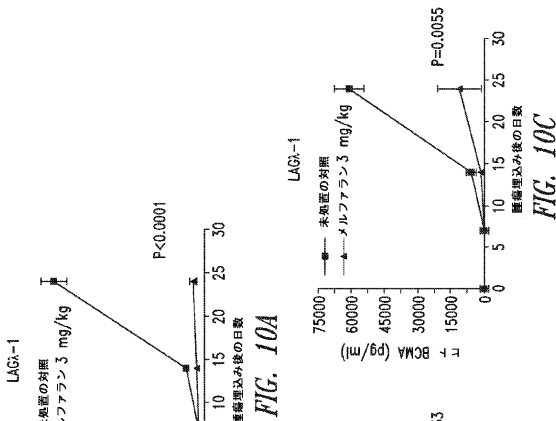


FIG. 10A

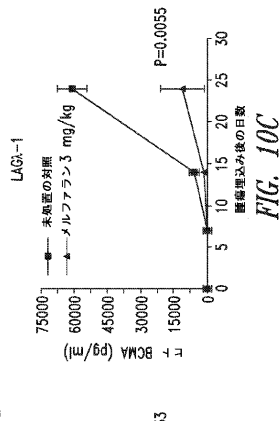


FIG. 10C

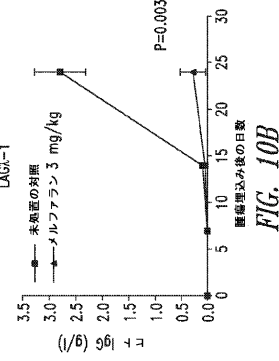


FIG. 10B

【 図 2 B 】

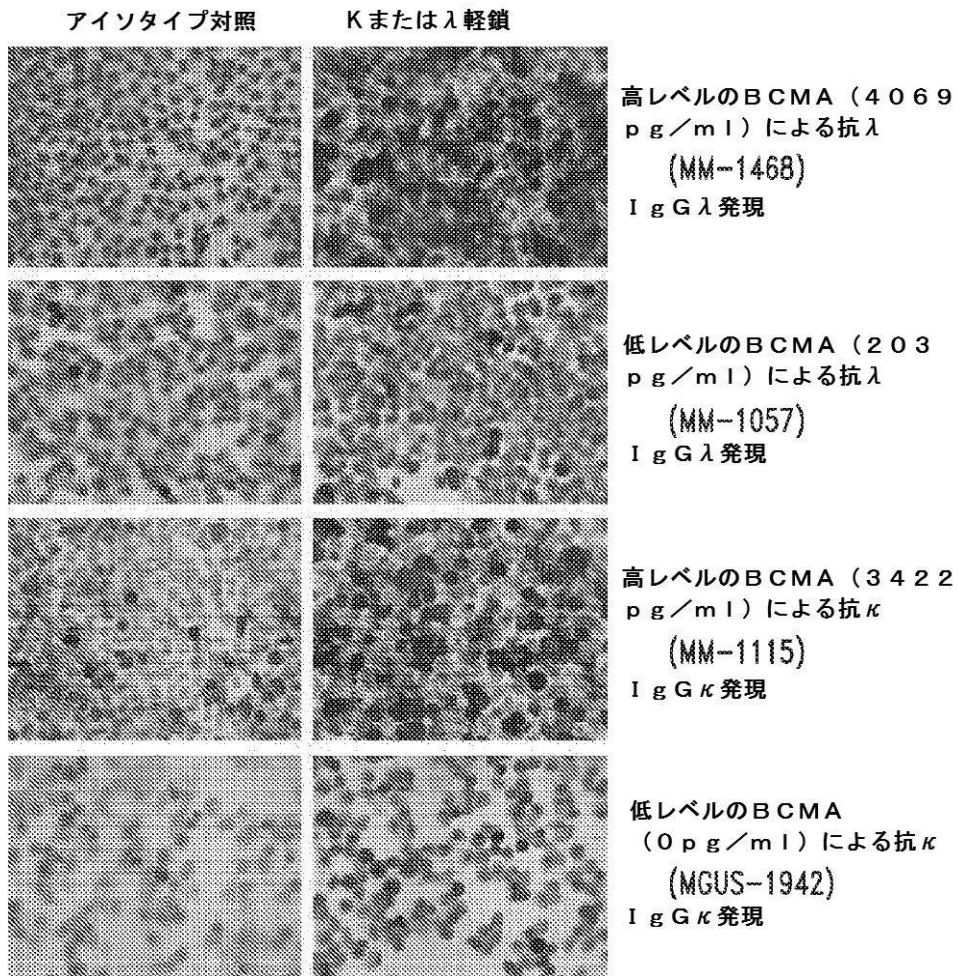


FIG. 2B

【 図 8 】

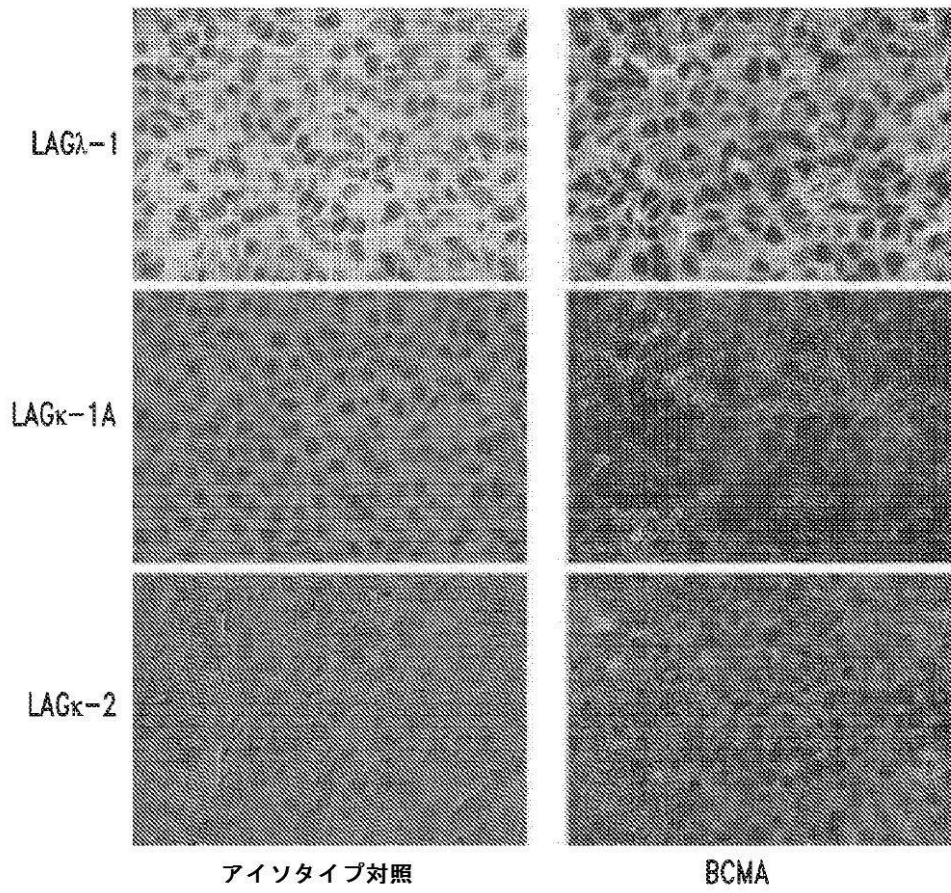


FIG. 8

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No.  PCT/US 2014/015338
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/574 (2006.01)</i> <i>G01N 33/487 (2006.01)</i>		
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 33/00, 33/487, 33/52, 33/53, 33/574, 33/68, C12Q1/00, 1/68		
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)		
PatSearch (RUPTO internal), EAPO, Espacenet, Patentscope, Depatisnet, K-PION, SIPO, PAJ, USPTO, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/163805 A1 (GLAXO GROUP LTD et al.) 06.12.2012, p.1, lines 23-25, 27-29, p.2, lines 12-15, p.20, lines 12-25, p.23, lines 10-13, 25-27, 38-40, p.24, lines 29-31, p.36, lines 34, p.47, lines 16-17, p.49, lines 24- 25, p.70-71, example 7, claims 1, 14	1, 4-6, 14, 17-22, 37, 40-42, 50-55
Y		2-3, 15-16, 23-26, 38- 39, 43
Y	BELLUCCI R. et al. Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor, Blood. 2005 May 15; 105(10): 3945-3950, especially abstract, p.3947, col. 1, p.3949, col.1	2-3, 15-16, 23-26, 38- 39, 43
X	US 2007/0207474 A1 (STEPHEN M.ANSELL et al.) 06.09.2007, paragraphs [0002], [0004], [0028], [0039], [0058], [0085], [0098], [0107], [0112], [0114]-[0115], [0117]-[0136], [0141], [0161]-[0164], claims 18, 23, 26	56-62, 66-73, 74, 82, 83, 85-88, 92-94, 96- 97
Y		74, 84, 95
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 June 2014 (26.06.2014)		16 July 2014 (16.07.2014)
Name and mailing address of the ISA/RU: FIPS, Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezhkovskaya nab., 30-1 Facsimile No. +7 (499) 243-33-37		Authorized officer  M.Prokusheva  Telephone No. 495 531 65 15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 2014/015338

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MOREAUX J. et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. Blood. 2004 Apr 15; 103(8): 3148-3157, especially p.3148, p.3149, col.1, p.3151	74, 84, 95

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US 2014/015338
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7-13, 27-36, 44-49, 63-65, 76-81, 89-91 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: According to Rule 13 of the Regulations under the PCT the claimed inventions does not meet the requirement of unity of invention <i>a priori</i> , therefore independent claims 1-3, 14-16, 37-39, 50, 56, 66, 86, 92 form several groups of inventions, with are not linked as to form a single general inventive concept. The special technical feature of independent claims 1-3, 14-16, 37-39, 50 are detecting an amount of BCMA polypeptide or a fragment thereof in a biological sample. The special technical features of independent claims 56, 66, 86, 92 are detecting an amount of BAFF polypeptide or a fragment thereof in a biological sample. Hence, claims comprise 2 groups of inventions, namely: 1 invention – claims 1-55. 2 invention – claims 56-97	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> 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.:
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ベレンソン, ジェイムズ アール.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90069, ウェスト ハリウッド, サンセット ブール  
バード 9201, スイート 300

(72)発明者 チェン, ハイミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90069, ウェスト ハリウッド, サンセット ブール  
バード 9201, スイート 300

(72)発明者 サンチェス, エリック

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90069, ウェスト ハリウッド, サンセット ブール  
バード 9201, スイート 300

Fターム(参考) 2G045 AA26 BB20 BB24 CA26 CB01 DA36 FB03

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016507066A5</a>	公开(公告)日	2017-03-09
申请号	JP2015557128	申请日	2014-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	研究所骨髓瘤和骨肿瘤研究		
申请(专利权)人(译)	ーミ工罗马and伯恩キャンサー調査		
[标]发明人	ベレンソングエイムズアール チェンハイミン サンチェスエリック		
发明人	ベレンソン, ジェイムズ アール. チェン, ハイミン サンチェス, エリック		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/57426 G01N33/57407 G01N33/57488 G01N2333/70578 G01N2333/7151 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/543.545.A G01N33/543.521		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/762753 2013-02-08 US		
其他公开文献	JP2016507066A		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种诊断多发性骨髓瘤 (MM) 的方法。在某些实施方案中，诊断的MM的方法是，在 (a) 检测从所述对象获得的生物样品中的BCMA多肽或其片段的量，(b) 步骤检测BCMA多肽 (a) 中肽或片段的量的方法，包括以下步骤：比较一个预定的截断值或对照血清样品中检测到的量，预定的切其中 (a) 的生物样品中BCMA多肽或片段的增加量与 (b) 的对照血清样品中的量相比表明存在MM，其中生物样品是血清从受试者的骨髓单核细胞或外周血单核细胞的培养物中获得的样品或上清液。